

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°/SNV/2019

THÈSE

Présentée par

KANOUNI LINA

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3^{ÈME} CYCLE

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: MICROBIOLOGIE

THÈME

Inhibition des champignons phytopathogènes par *Rhizobium*

Soutenue publiquement le **08/01/2019**

DEVANT LE JURY

President : M^r Med Mihoub ZERROUG

Pr UFA Sétif 1

Directeur : M^{me} Samia MEZAACHE-AICHOIR

MCA UFA Sétif 1

Examineurs : M^r Abdelhalim KHENCHOUCHE

MCA UFA Sétif 1

M^r Kamel AISSET

Pr U Batna

M^r El Hafid NABTI

Pr U Béjaia

Invité M^r Larbi LAROUS

Pr UFA Sétif 1

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

Remerciements

Le messager d'Allah dit :

« Celui qui emprunte un chemin pour y rechercher la connaissance, Allah lui fait emprunter un chemin parmi les chemins du Paradis. Les anges rabaissent leurs ailes en signe de satisfaction pour celui qui recherche la connaissance. Tout ceux qui sont dans les cieux et la terre, jusqu'aux poissons dans l'eau, implorent le pardon d'Allah pour le savant» Ibn Hibbân,

Le Prophète (paix et bénédictions d'Allah soient sur lui) a dit: "Quiconque ne remercie pas les gens ne remercie pas Allah." al-Tirmidhi

Un remerciement spécial à mes très chers parents, qui m'ont toujours soutenu, mes mots ne suffisent jamais. Sans eux et bien sure après dieu, je ne serais certainement pas là où j'en suis aujourd'hui, Merci mes parents pour le fait d'être toujours avec moi, que dieu vous bénisse, vous accorde santé, longue vie et vous offre le paradis. Je tiens également à remercier ma sœur, son mari et ses deux petits enfants, mes frères, ma cousine Chafia, ma famille et tous mes amies surtout Asma.

Je tiens à remercier, ma directrice de thèse, docteur Mezaache Samia pour sa disponibilité, sa patience, ses précieux conseils et son appui scientifique, je suis ravi d'avoir travailler en sa compagnie. Mes remerciements s'étendent au professeur Larous qui m'a accueilli dans son laboratoire et ma reconnaissance au professeur Zerroug pour son aide et d'avoir accepter de présider mon jury, merci également au docteur Chabbi Rabah de l'université de Constantine qui a mis à ma disposition les souches de référence.

Mes sincères remerciements sont adressés au Pr Aissat Kamel, ainsi qu'au Pr Nabti El hafid et enfin au Dr Khenchouche Abdelhalim pour m'avoir fait l'honneur d'examiner et de juger ce modeste travail.

Je voudrais remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, et à différents moments, m'ont apporté leur aide même avec des invocations. Enfin, mes remerciements à tous ceux qui ont directement ou indirectement, participé à ce travail, les auteurs des articles et des thèses citées, et à tous ceux que j'ai oublié de citer et qui le mériteraient.

الملخص

اجريت هذه الدراسة لتقييم التأثير العدائي المقاوم لعشرة عزلات من بكتيريا *Rhizobium* معزولة من اربعة انواع من البقوليات وثلاث سلالات مرجعية ضد الفطريات التالية *Fusarium*، *Aspergillus*، *Penicillium*، *Alternaria*، *Humicola* و *Cladosporium* المعزولة بدورها من نباتات مصابة. وجدنا ان بكتيريا *Rhizobium* المعزولة مقاومة للبنسلين وأموكسيسيلين مع تراوح وقت التضاعف بين 1.9 إلى 6.4 ساعة، وتمكنت من النمو عند درجات حرارة تتراوح بين 37 و 4 درجات مئوية، وتحملت تراكيز ملح بين 0.5 و 2% كما انتجت حاملات الحديد وانزيم البروتياز. أظهرت النتائج فعالية عزلات *Rhizobium* والسلالات المرجعية ضد عزلات الفطريات في المختبر وفي النبات، في المختبر، كل العزلات تثبط نمو الفطريات و قد تم الحصول على أفضل سيطرة على المرض بالعزلة F3 المستخرجة من الفول و التي منعت نمو الفطريات بأكثر من 70%، و تم الحصول ايضا على أعلى معدل للتثبيط ضد *Alternaria* spp.2، *Penicillium* spp.2 و *Cladosporium* spp. و *Humicola* spp. مع نسبة تثبيط تتراوح بين 90 إلى 96% و بنسبة 97% ضد فطر *Fusarium* spp.2. في التجارب على النبات، خفضت عزلات *Rhizobium* المعزولة من الحمص والعدس والفول نسبة الفطريات بشكل كبير في جميع حالات الإصابة بأكثر من 75%؛ حيث لوحظت أفضل نسبة في نباتات العدس، بينما لوحظت عدم وجود نباتات ذابلة في الفول. وأظهرت البذور التي تم تلقيحها بـ *Rhizobium* والفطريات في أطباق بيتري أن العزلات الأكثر فعالية في الحد من حالات الإصابة بالفطريات وجدت في الفول والعدس.

الكلمات المفتاحية: المكافحة البيولوجية، *Rhizobium*، الفول، العدس، الحمص، البازلاء، الأمراض النباتية، الفطريات.

Résumé

Cette étude a été réalisée pour évaluer l'effet antagoniste de dix *Rhizobium* sp isolés et caractérisés de quartes légumineuses poussant dans le Nord-Est de l'Algérie et de trois souches référencées envers des champignons comme *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Humicola* et *Cladosporium* qui ont aussi été isolés des plantes infectées dans le nord de l'Algérie. Les Rhizobia isolés étaient résistants à la pénicilline et l'amoxicilline avec des temps de génération qui variaient entre 1.9 et 6.4 h ; ils ont été capables de se développer à des températures allant de 4 à 37 °C, toléraient une concentration d'NaCl comprise entre 0.5 et 2%, et produisaient des sidérophores et des protéases. Les résultats ont démontré l'efficacité des isolats de *Rhizobium* et des souches de référence envers les isolats fongiques *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, tous les Rhizobia inhibaient la croissance mycélienne des agents pathogènes. Le meilleur contrôle de la maladie a été obtenu avec l'isolat F3 de la fève qui a inhibé plus de 70% des espèces fongiques. La plus forte inhibition fongique a été obtenue contre *Alternaria* spp.2, *Penicillium* spp.2, *Cladosporium* spp. Et *Humicola* spp. avec un taux allant de 90 à 96%. Et avec un pourcentage de 97% envers *Fusarium* spp.2. Dans des expériences en pots, *Rhizobium* isolé du pois chiche, des lentilles et des fèves a réduit de manière significative toute incidence de la maladie avec plus de 75%, où le meilleur pourcentage a été observé chez les plantes de lentilles, alors que chez la fève, aucune plante flétrie n'a été observée. Les graines traitées avec *Rhizobium* et inoculées de champignons dans des boîtes de Pétri ont montré que les isolats issus des fèves et des lentilles ont été les plus efficaces pour réduire l'incidence des maladies fongiques.

Mots clé : Contrôle biologique, *Rhizobium*, fève, lentille, pois chiche, petit pois, maladies des plantes, champignons .

Abstract

This study was carried out to evaluate the antagonistic effect of ten isolated characterized *Rhizobium* sp. isolates and three referenced strains against aggressive fungi *Fusarium*., *Aspergillus*, *Penicillium* ,*Alternaria*,*Humicola* and *Cladosporium*.isolated from infected and wilted plants. The isolated Rhizobia were resistant to penicillin and amoxicillin with generation time ranged from 1.9 to 6.4 h, they were able to grow temperatures from 4°C to 37°C, tolerate salt concentration (0.5–2%) and produce siderophores and proteases. The results demonstrated the effectiveness of the Rhizobia isolates and the referenced strains against the fungi isolates *in vitro* and *in vivo*. In dual culture, all Rhizobia isolates inhibited the mycelial growth of the pathogens. The best disease control was obtained with isolate F3 from faba bean which inhibited the fungal growth with more than 70%. The highest inhibition growth was obtained against *Alternaria* spp.2, *Penicillium* spp.2, *Cladosporium* spp and *Humicola* spp.with an inhibition rate ranging from 90 to 96%. And with a percentage of 97% towards *Fusarium* spp.2.In pot experiments, Rhizobia isolates from chickpea, lentil and faba bean reduced significantly all disease incidence with more than 75%; where the best fight was observed in lentil plants, while in faba bean no wilted plants were observed. Seeds inoculated with Rhizobia and fungi in petri dishes showed that isolates from faba bean and lentil were the most effective in reducing fungi disease incidence.

Keywords: Biological control, *Rhizobium*, fababean,lentil, chickpea, pea, plant diseases, fungi

Liste des figures

Figure 1	A. Nodule de <i>fabaceae</i> B. <i>Rhizobium leguminosarum</i> sous microscope électronique	5
Figure 2	Représentation schématique des mécanismes d'action directs et indirects employés par les PGPR	15
Figure 3	A. les légumineuses utilisées pour la collecte des nodules de Rhizobia B. Les nodules des légumineuses utilisés pour l'isolement des bactéries	22 23
Figure 4	Conservation des nodules	24
Figure 5	Aspect macroscopique des Rhizobia sur milieu YEMA	28
Figure 6	Les plantes infectées utilisées pour l'isolement des champignons .	39
Figure 7	Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Alternaria</i> spp. 1 et spp. 2 isolés de l'olivier et de l'amandier	42
Figure 8	Aspect de macroscopique et microscopique <i>Cladosporium</i> spp. isolé des feuilles de rose violette	43
Figure 9	Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus</i> spp. Isolé sur vigne	44
Figure 10	Aspect macroscopique et microscopique des <i>Penicillium</i> spp. 1 et spp. 2 isolés du coing et du blé.	45
Figure 11	Aspect macroscopique et microscopique des <i>Fusarium</i> spp. 1 et spp. 2 isolés de fèves.	46
Figure 12	Aspect microscopique et microscopique d' <i>Humicola</i> spp. isolé du lierre.	47
Figure 13	Effet de Rhizobia sur l'incidence du flétrissement du pois chiche infectés par les champignons	57
Figure 14	Effet de Rhizobia sur l'incidence du flétrissement du fèves infectés par les champignons	57
Figure 15	Effet de Rhizobia sur l'incidence du flétrissement du petit pois infectés par les champignons	58
Figure 16	Effet de Rhizobia sur l'incidence du flétrissement du lentilles infectés par les champignons	60
Figure 17	Suppression fongique par inoculation de Rhizobia sur graines de pois chiche.	61
Figure 18	Suppression fongique par inoculation de Rhizobia sur graines de petit pois.	62
Figure 19	Suppression fongique par inoculation de Rhizobia sur graines de lentille.	62
Figure 20	Suppression fongique par inoculation de Rhizobia sur graines de fève.	63

Liste des tableaux

Tableau 1	Les souches de <i>Rhizobium</i> référencées isolées des légumineuses et leurs origines	21
Tableau 2	Les souches de Rhizobia isolées des légumineuses et leurs origines	27
Tableau 3	Tolérance de Rhizobia aux différentes Températures de croissance	29
Tableau 4	Tolérance de Rhizobia aux différentes concentrations de salinité	31
Tableau 5	Tolérance de Rhizobia aux différents antibiotiques	32
Tableau 6	Tolérance de Rhizobia aux différentes sources de carbone	34
Tableau 7	Certains caractères des Rhizobia isolés	37
Tableau 8	Pourcentage d'inhibition des champignons par Rhizobia	53

Liste des abréviations

atpD : gène de la ATP synthase.

BOX : élément BOX.

CAS : chrome azurol sulfate

ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus): les empreintes des séquences inter géniques répétitives des entérobactéries.

glnA : gène de la Glutamine synthetase.

HCN : cyanure d'hydrogène.

IAA : l'acide indole acétique.

IGS-RFLP : le polymorphisme de la longueur du fragment de restriction de l'espace inter génique.

ISR : résistance systémique induite.

LMR : limite maximale de résidus en pesticides.

ML : maximum-vraisemblance des gènes.

MLSA : analyse de séquence multi locus.

NJ : phylogénies voisines.

nodA : gène de nodulation de *Rhizobium*.

PHB : polymère β -hydroxybutyrate.

recA : gène de la recombinaison A.

REP : éléments palindromiques répétitifs.

RFLP-PCR : le polymorphisme de la longueur du fragment de restriction de réaction en chaîne par polymérase

Tg: temps de génération

thrC : gène de la Threonine synthase.

Sommaire

Résumés	i
Liste des figures et tableaux	ii
Liste des abréviations	iii
Introduction générale	1
Chapitre I : Les Rhizobia et la lutte biologique par les différents genres	
1 .Découverte et Evolution de leurs taxonomie	4
1.1. Historique	4
1.2.Taxonomie des Rhizobia	5
2. La lutte biologique par les différents genres de <i>Rhizobium</i>	14
2.1. Activité antimicrobienne	15
2.2. Activité nématocide	19
Chapitre II : Isolement et identification des bactéries antagoniques	
Introduction	20
1. Matériel et méthodes	21
1.1. Matériel biologique	21
1.2. Méthodes	22
1.2.1. Méthode de désinfection du matériel biologique (feuilles, graines...)	22
1.2.2. Isolement et identification phénotypique des souches de <i>Rhizobium</i>	22

a. Collecte des nodules	23
b. La conservation des nodules	23
c. Désinfection des nodules	24
d. Isolement des bactéries à partir des nodules	24
e. Conservation des isolats	24
1.2.3. Identification des souches bactériennes	25
a. Effet de la température	25
b. Tolérance au NaCl	25
c. Résistance aux antibiotiques	25
d. Utilisation de la source de carbone	25
e. Temps de génération	26
f. Production de protéases	26
g. La production de sidérophores	26
2. Résultats et discussion	27
2.1. Caractères phénotypiques de <i>Rhizobium</i>	27
2.1.1. Caractères morphologiques et culturaux	28
a. Température de croissance	28
b. Tolérance au chlorure de sodium	31
c. Résistance intrinsèque aux antibiotiques	32
d. Utilisation de la source de carbone	33
e. Temps de génération	35
f. Production de sédérophores et de protéases impliqués dans l'antagonisme	36
Chapitre III : Isolement et identification des champignons qui infectent les plantes	
Introduction	38
1. Isolement des champignons	39
1.1. Echantillonnage des souches fongiques	39
1.2. Pré traitement et mise en culture des échantillons	39
1.3. Purification des isolats fongiques	40
1.4. Conservation des isolats	40
1.5. Identification	40
2. Résultats et discussion	41

a. Identification des champignons	41
b. Etude macroscopique et microscopique	41
<i>Alternaria</i> spp. 1 et 2	41
<i>Cladosporium</i> spp.	43
<i>Aspergillus</i> spp.	44
<i>Penicillium</i> spp. 1 et 2	45
<i>Fusarium</i> spp. 1 et 2	46
<i>Humicola</i> spp.	47
Chapitre IV : L'antagonisme entre bactéries et champignons isolées <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	
Introduction	49
1. Méthodes	50
1.1. Tests d'antagonisme <i>in vitro</i>	50
1.2. Activité antagoniste <i>in vivo</i>	50
1.3. L'antagonisme sur graine en boîte de Pétri	51
1.4. Analyse statistique	51
2. Résultats et discussion	52
2.1. Activité antagoniste <i>in vitro</i>	52
2.2. Activité antagoniste de <i>Rhizobium</i> <i>in vivo</i>	56
2.3. Antagonisme sur graines <i>in vitro</i>	61
Conclusion générale	64
Références bibliographiques	66
Annexes	

I. Les Rhizobia et la lutte biologique par les différents genres

II. Isolement et identification des bactéries antagoniques

III. Isolement et identification des champignons qui infectent les plantes

IV.L'antagonisme entre bactérie et champignons isolées *in vitro* et *in* *vivo*

Partie Pratique

Introduction générale

Les agronomes ont remarqué depuis longtemps, que les légumineuses amélioraient les terres dans lesquelles elles étaient cultivées. Elles sont capables de se développer dans les milieux dépourvus d'azote (Leysen et Goffart, 1977), puisqu'elles ne nécessitent pas d'engrais pour leurs croissances (Duke, 1981), sont faciles à cultiver, et sont relativement importantes pour les pays en développement. Elles représentent une bonne source de protéines, de minéraux et de vitamines, aussi bien pour l'alimentation animale que pour la consommation humaine (Morsy et Tarrad., 2005). D'autre part, elles fixent l'azote de l'air (Solargo, 2001) par un processus important qui se réalise grâce à un nombre réduit d'organismes procaryotes que l'on peut séparer du point de vue écologique en deux grands groupes : les symbiotiques et les non symbiotiques (Tena et Magallanes, 1985). Cette fixation par *Rhizobia* chez les légumineuses est la principale voie d'entrée de l'azote dans l'écosystème sol/plante (Newton *et al.*, 1983). Et elle est médiée par les bactéries symbiotiques appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* (Ndoye, 1990), où la symbiose *Rhizobium*/légumineuses est gouvernée par un échange de signaux moléculaires très spécifiques entre les deux partenaires. La réussite de l'infection des légumineuses par *Rhizobia* et la nodulation dépendent des facteurs de l'environnement et de la survie de ces bactéries et de leurs tolérances aux différents stress : salin, thermique et nutritionnel (Berrada *et al.*, 2012).

Plusieurs espèces fongiques d'*Alternaria*, de *Fusarium*, de *Penicillium*... (Thilagam *et al.*, 2018) sont des microorganismes ubiquistes affectant les plantes, ces organismes pathogènes sont les plus destructeurs, qui causent des pertes considérables aux cultures (Javier *et al.*, 2014). Selon Oerke (2006), 70% des dommages des cultures agricoles sont d'origine fongique. Cependant, les champignons phytopathogènes sont devenus incontrôlables suite à leurs résistances aux fongicides chimiques, qui sont à leur tour néfastes pour l'environnement (pollution des sols ; déséquilibre écologique ...) et pour l'humain. La plupart de ces fongicides dangereux interdits dans les pays développés sont encore utilisés dans les pays en voie de développement dans le monde (UNEP, 2000; Venkateswara *et al.*, 2005); cela est dû à l'analphabétisme et au manque de sensibilisation chez les agriculteurs de ces pays (Venkateswara *et al.*, 2005).

À titre d'exemple, dans une étude de l'Union européenne en 1996, sur 9700 échantillons de fruits et légumes (pommes, tomates, laitues, fraises et raisins), la limite maximale de résidus en pesticides (LMR) tels que : l'acéphate, chlopyriphos, chlopyriphos-méthyl, méthamidophos, iprodione, procymidone et le chlorothalonil étaient largement dépassés. Auparavant en Inde (Kerala en 1958), et dans le premier rapport d'empoisonnement dû aux pesticides, plus de 100 personnes sont décédées après avoir consommé de la farine de blé contaminée par le parathion (Karunakaran, 1958), d'où l'intérêt de trouver des solutions alternatives. Celles-ci peuvent faire appel à la rationalisation des pratiques agricoles par stérilisation en horticulture, désinfection des graines, et à l'utilisation de variétés végétales tolérantes par modification ou insertion de gènes (Abbes *et al.*, 2010).

Néanmoins, d'autres approches de contrôle doivent être appliquées comme des stratégies de lutte biologique ; qui sont sans inconvénients pour les cultures et les humains avec une protection de l'environnement, passant par une gestion optimale des champignons phytopathogènes et des mauvaises herbes arrivant à des sols fertiles exempt de bioagresseurs (UNEP, 2000). C'est pourquoi, des recherches sérieuses ont été menées pour identifier ces méthodes pour la protection des végétaux (Prapagdee *et al.*, 2008). Pour cela, une idée intéressante pour lutter contre les agents pathogènes consiste en l'utilisation d'agents microbiens antagonistes, comme biopesticides, cela offre un potentiel très prometteur et viable par la diversité des agents microbiens (Laird *et al.*, 1990). De plus, ces antagonistes 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 (Fravel, 2005 ; Lee *et al.*, 2006). Ils sont aussi reconnus pour avoir un effet bénéfique sur le développement des plantes résultant d'une activité antagoniste envers certains agents pathogènes par la production de substances antimicrobiennes (Whipps, 2001), en plus de leur rôle dans la promotion de la croissance des plantes (El-Tarabily et Sivasithaparam., 2006).

Les Rhizobia sont considérés comme des antagonistes très efficaces des champignons phytopathogènes. Ils ont été signalé comme des inhibiteurs significatifs de la croissance des champignons pathogènes tels que : *Pythium*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* et *Phytophthora* (Bardin et al., 2004 ; Kumar et al., 2006 ; Hemissi et al., 2011 ; Ozgonen et Gulcu, 2011). D'où l'intérêt d'étudier l'action des souches de Rhizobia sur la croissance et l'inhibition de certains champignons phytopathogènes.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antagoniste *in vitro et in vivo* des Rhizobia isolés des nodules de légumineuses poussant principalement dans la région de Sétif envers des champignons aussi isolés de la même région.

Cette thèse est élaborée en quatre chapitres : (i) **Le Premier Chapitre** consiste en une revue bibliographique traitant la taxonomie des Rhizobia et les effets antagonistes des différents genres déjà décrits. Les trois autres chapitres sont consacrés à la partie pratique et les résultats obtenus : (ii) **le Second Chapitre** est consacré à l'isolement et l'identification phénotypique des bactéries rhizobiennes, (iii) **le Troisième Chapitre** décrit l'isolement et identification des champignons de différentes plantes infectées , et (iv) **le Dernier Chapitre** traite de l'antagonisme entre ces bactéries rhizobiennes et les champignons isolés *in vitro* et *in vivo*.

I .1.Découverte et Evolution de la taxonomie des Rhizobia

I .1.1.Historique

En 1888, Beijerinck a rapporté l'isolement de «bactéries» dans les radicelles des papilionacées cultivées, puis a infecté avec ces cultures les racines de *Vicia faba*. Il a appelé ces bactéries *Bacillus radicicola*. Plus tard, en 1889, Frank a changé ce nom en *Rhizobium*, avec à l'origine une seule espèce *Rhizobium leguminosarum* (Oke et Long , 1996).

À partir du début des années 1960, les bactériologistes ont commencé à utiliser une grande variété de caractères morphologiques, nutritionnels et métaboliques (Graham, 1964, Moffet et Colwell, 1968), ainsi que sérologique (Graham, 1963; Vincent, 1970); ce qui conduisit à une distinction claire entre Rhizobia à croissance rapide et ceux à croissance lente (Graham, 1964 ; Elkan, 1992). À partir des années 80, avec l'introduction des méthodes génétiques, la diversité des Rhizobia a été mise en évidence. Ce qui a conduit à une augmentation progressive du nombre de genres. Parallèlement, il y a eu aussi augmentation significative du nombre de validation des espèces publiées. L'amélioration et le développement dans les méthodes d'étude des cellules rhizobiennes a permis de proposer une classification appropriée (Graham *et al.*, 1991; Vandamme *et al.*, 1996).

Actuellement un nombre croissant de génomes bactériens totaux deviennent disponibles pour beaucoup de microorganismes. Cela a eu un impact majeur sur la taxonomie des bactéries (Willems, 2006). L'isolement et la caractérisation de nouvelles bactéries nodulaires chez différentes plantes hôtes ont conduit à nommer de nombreuses espèces de Rhizobia.

En 1990, il n'y avait qu'une seule espèce bactérienne connue pour noduler le haricot commun dans le monde : *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, une espèce qui nodulait la féverole *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* et deux espèces qui nodulaient le soja *Bradyrhizobium japonicum* et *Rhizobium fredii*. Aujourd'hui, le nombre d'espèces capables de noduler respectivement le pois, la fève, les lentilles, le pois chiche, l'arachide, le niébé, le soja et le haricot commun est de 2, 3, 4, 5, 5, 6, 11 et 14 (Fig 1 A ; Shamseldin *et al.*, 2017).

I .1.2 .Taxonomie des Rhizobia

Les Rhizobia sont des bactéries fixatrices d'azote qui forment des nodosités radiculaires sur les plantes légumineuses (Fig.1 : A). Ce sont des bâtonnets (Fig.1 : B), à Gram négatif, aérobies, non sporulés (Jordan, 1984). Ces symbiotes des légumineuses appartiennent à deux sous-classes phylogénétiques distinctes: les α et β -protéobactéries. Plus de 100 espèces regroupées en 13 genres : (i) 11 appartenant à la sous-classe α - Protéobactéries et comprenant les genres: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* actuellement *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrhobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia* et *Shinella*. (ii) Deux genres appartenant à la sous-classe β -Proteobactéries, l'ordre des *Burkholderiales* dont *Burkholderia* et *Cupriavidus* anciennement *Ralstonia* (Zakhia et de Lajudie, 2001 ; Rüberg *et al.*, 2003; Velázquez *et al.*, 2017).

Les premières classifications des Rhizobia étaient basées sur des tests d'inoculations croisées entre Rhizobia et leurs plantes hôtes (Fred *et al.*,1933). Ensuite, la validité de la classification a été orientée vers la taxonomie polyphasique moderne qui a conduit à la description claire et vaste de nombreux microorganismes (Willems et Collins, 1993). Celle-ci fait intervenir les méthodes comparatives telles que la sérologie, le coefficient de Chargaff, l'hybridation ARN / ADN ou ADN / ADN, le séquençage de l'ADN ribosomique 16S, l'analyse des plasmides etc..., en plus des différentes analyses phénotypique et biochimique afin d'identifier des bactéries symbiotiques (Velázquez *et al.*, 2017).

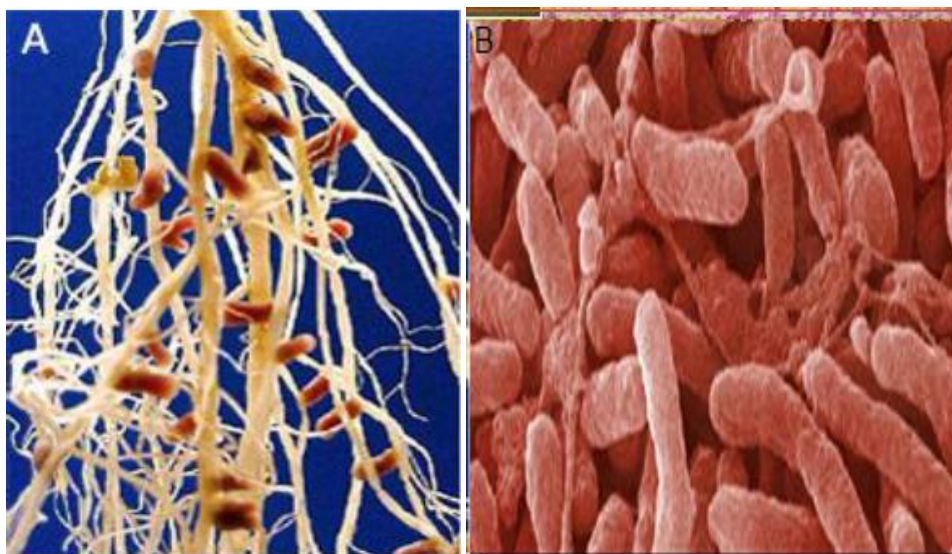


Figure 1. A.Nodule de *fabaceae* (Site web 1,2014)

B.*Rhizobium leguminosarum* sous microscope électronique (Site web 2, 2010)

La classification des Rhizobia subit des changements perpétuels en raison du rattachement de plusieurs nouveaux genres et espèces à ce groupe bactérien (Wang *et al.*, 1999). En effet, si la classification polyphasique a permis de mettre en évidence de nombreuses espèces de Rhizobia associées aussi bien aux plantes légumineuses qu'aux non légumineuses (Diouf *et al.*, 2000). Cependant, la caractérisation génotypique de cette classification est considérée comme un obstacle pour la description de nouvelles espèces (Coenye *et al.*, 2005). D'où l'intérêt pour d'autres paramètres tels que les gènes de ménage (Wertz *et al.*, 2003). Ces derniers comportant des séquences conservées, dont certaines seront ensuite utilisées par MLSA (multi locus séquence analysis pour analyse de séquence multi locus) pour construire des arbres phylogénétiques à partir desquels la phylogénie est déterminée (Glaeser et Kämpfer, 2015).

1.2.1 .La classe des α - *Proteobacteria*

a.Le genre *Rhizobium*

Pendant longtemps, ce genre regroupait tous les Rhizobia. Certaines espèces ont ensuite été rattachées à de nouveaux genres suite aux analyses phylogénétiques. Les membres de ce genre sont de courts bâtonnets, de 0.5 à 0.9 μm de large et de 1.2 à 3 μm de long, souvent avec une zone incolore en raison de la présence de cristaux du polymère β -hydroxybutyrate (PHB). Ces bactéries ne forment pas d'endospores mais sont mobiles avec des flagelles polaires ou péritriches (4 à 6), aérobies, chimio-organotrophes (de Lajudie *et al.*, 1994).

Au cours des dernières décennies, on a assisté à une croissance vertigineuse d'identification d'espèces affiliées à ce genre : *Rhizobium tropici* (Martinez-Romero *et al.*, 1991), *Rhizobium etli* (Segovia *et al.*, 1993), *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii* (Amarger *et al.*, 1997), *Rhizobium hainanense* (Chen *et al.*, 1997), *Rhizobium mongolense* (Van Berkum *et al.*, 1998), *Rhizobium undicola* (deLajudie *et al.*, 1998), *Rhizobium huautlense* (Wang *et al.*, 1998), *Rhizobium daejeonense* (Quan *et al.*, 2005), et *Rhizobium lusitanum* (Valverde *et al.*, 2006).

Au cours d'une étude de Garcia-Fraile *et al.* (2007) deux souches ont été isolées à partir de *Populus alba*, ayant la capacité d'hydrolyser les polysaccharides, la caractérisation de ces deux souches confirme qu'elles appartenaient à une nouvelle espèce, pour laquelle le nom de *R. cellulosilyticum* sp. est proposé.

Cependant, et suite à la taxonomie polyphasique quelques changements de nomenclature ont été relevés. C'est ainsi que certaines sous espèces de *Rhizobium leguminosarum* sont actuellement rattachés à *R. trifoli* et *R. pisi* (Ramirez-Bahena *et al.*, 2008).

Plusieurs études menées en Chine ont mis en évidence de nouvelles espèces. Gu *et al.* (2008) ont isolés dix-sept souches de la plante lespédéza, désormais appelé *R. miluonense* sp. Treize autres nouvelles souches identifiées comme une seule espèce ont été isolées à partir de trois différentes espèces de légumineuses des genres *Albizia*, *Kummerowia* et *Dalbergia* ; où le nom *R. mesosinicum* sp. est donné à cette nouvelle espèce (Lin *et al.*, 2009). D'autre part, Ren *et al.* (2011) utilisant une approche polyphasique des analyses phylogénétiques, incluant l'analyse (RFLP-PCR), l'espaceur intergénique 16S-23S, les tests phénotypiques et physiologiques, les comparaisons de gènes et profils d'acides gras cellulaires; ont mis en évidence une nouvelle espèce isolée de nombreuses légumineuses, pour laquelle ils ont proposé le nom de *R. vignae* sp.

b. Le genre *Mesorhizobium*

Ce genre a été décrit pour la première fois par Jarvis *et al.* en 1997. Plusieurs espèces de Rhizobia ont été transférées à ce genre. Ce sont des bactéries mobiles par un flagelle polaire ou subpolaire, assimilant le glucose, le rhamnose et le saccharose avec production d'acides (de Lajudie *et al.* ; 1998).

Ce genre comprenant les espèces à croissance intermédiaire comprend actuellement 21 espèces. Parmi les Mesorhizobia citons d'abord ceux portant anciennement la nomenclature *Rhizobium*: c'est le cas de *M. loti* (Jarvis *et al.*, 1982), *M. huakuii* (Chen *et al.*, 1991), *M. ciceri* (Nour *et al.*, 1994), *M. mediterraneum* (Nour *et al.*, 1995), *M. tianshanense* (Chen *et al.*, 1995); et ceux identifiés après la description du genre: *M. tianshanense* (Jarvis *et al.*, 1997), *M. plurifarum* (de Lajudie *et al.*, 1998), *M. amorphae* (Wang *et al.*, 1999), *M. muleiense* (Zhang *et al.*, 2012b), *M. tamadayense* (Ramirez-Bahena *et al.*, 2012) et *M. qingshengii* (Zheng *et al.*, 2013).

La distribution subtropicale, l'origine de l'hôte, les profils PCR-RFLP des gènes de l'ARNr 16S, le profil des acides gras ont été utilisés comme caractéristiques distinctives d'un nouveau groupe de *Mesorhizobium* associé à *Albizia kalkora* qui est donc proposé comme une nouvelle espèce, *M. albiziae* sp. (Wang *et al.*, 2007).

Plus tard, Han *et al.*(2008) ont caractérisé par une approche polyphasique, vingt-quatre souches de *Mesorhizobium* isolées des sols de Xinjiang en Chine, regroupées en trois clusters qui se distinguent par le polymorphisme de la longueur du fragment de restriction de l'espace inter génique(IGS-RFLP), correspondant aux espèces génomiques V, VI et VII. L'espèce génomique VII était définie comme *M. septentrionale* et les deux autres espèces sont *M. gobiense* sp. représenté par l'espèce génomique V et *M. tarimense* sp. représenté par l'espèce génomique VI.

Une approche taxonomique polyphasique a aussi été utilisée pour caractériser 31 isolats de *Rhizobium* obtenus à partir d'*Anthyllis vulneraria* en France. Ces isolats représentaient une nouvelle espèce du genre *Mesorhizobium*, pour laquelle le nom de *M. metallidurans* sp est donné (Vidal *et al.*, 2009).

A partir de nodules de *Caragana bicolor* et de *Caragana erinacea*, Lu *et al.* (2009) avaient isolé cinq souches qui ont été rattachés au genre *Mesorhizobium* par méthodes polyphasiques, pour lesquelles ils ont proposé le nom *M. shangrilense* sp. De même et d'une autre plante d'*Alhagi sparsifolia*. Chen *et al.*(2010) ont isolé et identifié onze souches pour lesquelles le nom de *M. alhagi* sp. est donné. Par contre, ces mêmes auteurs ont proposé le nom de *M. camelthorni* sp. pour les neuf souches isolées à partir de la même plante en 2011 en utilisant des analyses phylogénétiques. Dans une étude de Zhou *et al.* (2010), cinq souches rhizobiennes formant une nouvelle lignée isolées à partir de nodules de *Robinia pseudoacacia* ont été rattachées au même genre sur la base des méthodes précédemment cités qu'ils ont nommés *M. robiniae* sp. Elles se distinguent des espèces définies de *Mesorhizobium* par les profils des empreintes des sequences intergéniques répétitives des entérobactéries(ERIC). Une bactérie a même été isolée dans des sédiments prélevés des eaux océaniques, et qui représente une nouvelle espèce du genre *Mesorhizobium*, pour lequel le nom *M. sediminum* sp. nov. est proposé (Yuan *et al.*, 2016).

Récemment, une nouvelle espèce pour laquelle le nom de *M. zhangyense* sp. est désigné a été isolée à partir d'un nodule du *Thermopsis lancéolé* cultivé (Xu *et al.*, 2018). Toutes ces nouvelles souches ont été isolées en chine.

c. Le genre *Ensifer* (formelement *Sinorhizobium*)

Le genre *Sinorhizobium* a été décrit par Chen *et al.* en 1988. Des études plus récentes ont montré que *Sinorhizobium* et le genre *Ensifer* décrit par Casida en 1982 appartenaient à un seul taxon (Young, 2010).

Cependant, le rattachement des espèces de *Sinorhizobium* au genre *Ensifer* a fait couler beaucoup d'encre. Selon Young (2003) *Ensifer* est le synonyme qui a été proposé en premier, et est donc prioritaire par rapport à *Sinorhizobium*. Alors que Willems (2006) a demandé qu'une commission judiciaire tranche dans cette proposition. Malgré une similitude significative entre les gènes, et qui soutient la proposition d'unifier *Ensifer* et *Sinorhizobium* dans un seul genre ; la proposition préservant les deux genres est moins pertinente. Et en prenant en considération des opinions exprimées par la Commission judiciaire, le nom du genre devrait être *Ensifer*, comme il a déjà été proposé par Young en 2003.

Un test d'analyse de séquence multilocus (MLSA) a été réalisé par Martens *et al.* (2007) sur des souches d'*Ensifer* (en plus des espèces précédemment classé dans le genre *Sinorhizobium*) par phylogénies voisines (NJ) et une vraisemblance maximum (ML) des gènes. Les résultats de cette analyse confirmeront que le potentiel de distinction des espèces d'*Ensifer* est plus grand en utilisant la MLSA des gènes de ménage que celle des gènes ARNr 16S. La commission judiciaire proposa que toutes les espèces précédemment publiées comme *Sinorhizobium* garderaient cette nomenclature pour éviter la confusion, alors que toutes les nouvelles espèces non publiées porteraient désormais cette nomenclature en l'occurrence *Ensifer* spp. (Young, 2010).

Les cellules du genre *Ensifer* ont des mensurations similaires à celles de *Rhizobium*, mobiles par des flagelles polaires ou péritriches. La croissance optimale de ce genre est comprise entre 25-30°C (à 10-35 °C), un pH de 6 à 8 mais tolère des pH allant de 5 à 10.5, et une concentration de 10 g / l de NaCl (Young, 2010).

Le genre comprend actuellement 17 espèces. Parmi ces espèces certaines sont identifiées comme : *E. fredii* et *E. xingianense* (Chen *et al.*,1988), *E. sahelense* (de Lajudie *et al.*,1994), *E. kostiense* et *E. arboris* (Nick *et al.*,1999), *E.kummerowiae* (Wei *et al.*,2002), *E. americanum* (Toledo *et al.*,2003) , et *E.medicae* (Reeve *et al.*,2010).

Une autre lignée d'*Ensifer* nodulant la légumineuse américaine *Acacia angustissima* au Mexique à laquelle le nom d'*Ensifer mexicanus* sp. a été attribué. En utilisant des tests phénotypiques, l'analyse phylogénétique, et l'hybridation ADN-ADN, il est apparu que cette lignée est apparentée à l'*Ensifer terangae* d'origine Africaine (Lloret *et al.*, 2007).

Merabet *et al.* (2010) ont analysé six isolats précédemment isolés de Tunisie par Zakhia *et al.* (2004) à partir d'*Argyrolobium uniflorum*, du *Lotus creticus* et de *Medicago sativa* ; et trois qu'ils ont isolés du *Lotus arabicus* (Sénégal). En plus de l'ARN r 16S, les isolats ont été analysés par MLSA des cinq gènes de ménage (*recA*, *atpD*, *glnA*, *gltA* et *thrC*), le gène *nodA* et aussi par des tests auxanographiques utilisant la galerie API 100. Ces deux derniers permettraient la détermination du biovar. Ces analyses ont démontré que ces souches constituaient trois groupes A, B et C, tous appartenant au genre *Ensifer*, où les espèces des groupes A et C représentaient deux nouvelles espèces du genre en l'occurrence *Ensifer numidicus* sp.nov et *Ensifer garamanticus* sp. nov.; alors que les espèces du groupe B appartiennent à *Ensifer adhaerens*. L'analyse génomique effectuée sur les souches bactériennes isolés des légumineuses des zones arides et chaudes d'Asie'(Inde), d'Afrique (Maroc) et d'Amérique (Mexique) appartiennent à une nouvelle espèce dont le nom *Ensifer aridi* est proposé (Quéré *et al.*, 2017).

d.Le genre *Bradyrhizobium*

Le genre *Bradyrhizobium* a été décrit par Jordan en 1982 pour inclure tous les Rhizobia à croissance lente. Ce sont des bactéries avec un seul flagelle polaire ou subpolaire. Ces bactéries symbiotiques utilisent de nombreux sucres et acides organiques mais préfèrent les pentoses avec production de mucus polysaccharidique. Il comprend actuellement 9 espèces.

Ce genre a pendant longtemps inclus une seule espèce: *Bradyrhizobium japonicum* regroupant toutes les souches nodulant le soja (*Glycine max* ; Smith et Wollum ,1989). De nombreuses souches isolées de nodules de soja ont été proposés comme *Bradyrhizobium* :

(i) *B. elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992), (ii) les espèces de *B. liaoningense* (Xu *et al.*,1995) et (iii) *B. huanghuaihaiense* a été définie comme une nouvelle espèce pour regrouper les souches rhizobiennes isolées des nodules de *Glycine max* L. (Zhang *et al.*,2012a).

Une nouvelle espèce, *B. yuanmingene*, a été isolée du genre *Lespedeza* (Yao *et al.*, 2002 ; Euzéby et Findall, 2004). En plus d'une souche de *Bradyrhizobium* nodulant une plante sauvage du genre *Phaseolus* a été signalée par Parker (2002).

Les autres espèces reconnues de ce groupe sont *Bradyrhizobium betae* des racines de *Beta vulgaris* atteintes de déformations tumorales (Rivas *et al.*, 2004), et *Bradyrhizobium canariense* des légumineuses génistoïdes des îles Canaries (Vinuesa *et al.*, 2005). Une étude polyphasique a été réalisée pour déterminer la taxonomie d'une souche isolée à partir d'*Entada koshunensis* au Japon. L'analyse phylogénétique du gène de l'ARNr 16S a montré que la souche appartenait au genre *Bradyrhizobium* pour laquelle le nom de *B. iriomotense* sp. a été proposé (Islam *et al.*, 2008).

Plusieurs souches isolées de la légumineuse *Pachyrhizos* ont été caractérisées sur la base des données génotypiques et phénotypiques, ces nouvelles souches représentent deux nouvelles espèces pour lesquelles les noms de *B. pachyrhizi* sp. et *B. jicamae* sp. ont été attribués (Ramírez-Bahena *et al.*, 2009). Plus tard, de nouvelles espèces, à savoir *B. cytisi* de *Cytisus villosus* (Chahbourne *et al.*, 2011), et *B. daqingense* provenant de *Glycine max* (Wang *et al.*, 2013) ont été rapportés.

e. Le genre *Azorhizobium*

Le genre *Azorhizobium* a été décrit par Dreyfus *et al.* en 1988. Il comporte actuellement deux espèces (Velázquez *et al.*, 2017). Les membres de ce genre sont les seuls à utiliser les alcools comme source de carbone et dégradent également les acides et les acides gras organiques. Leur croissance est intermédiaire entre les deux genres précédents, avec un temps de génération compris entre 7 et 9 h. Aucun isolat n'est dénitrifiant, tolèrent jusqu'à 43°C et possèdent l'arginine dihydrolase et la lysine décarboxylase.

Leurs particularité est qu'ils sont incapables d'utiliser le mannitol, par contre le lactate donne de bons rendements de croissance. Mais forment aussi des nodules sur les parties aériennes de *Sesbania rostrata* (Dreyfus *et al.*, 1988).

f.Le genre *Methylobacterium*

Le genre *Methylobacterium* a été découvert par Patt *et al.* en 1976, et ne comprend qu'une seule espèce de *Rhizobium* : *Methylobacterium nodulans* qui nodule le crotalaria (Sy *et al.*, 2001 ; Jourand *et al.*, 2004). Ces bactéries sont des chimio-organotrophes méthylotrophique facultatifs (Hourcade, 2007).

Les bactéries de ce genre sont des bâtonnets (0.8 – 1.0 x 1.0 à 3.0 µm), avec une pigmentation rose typique due à la présence de caroténoïdes (van Dien *et al.*, 2003). Elles sont mésophiles et ont des températures optimales de croissance situées entre 25 et 30 ° C. Leurs cellules contiennent souvent des inclusions de poly-β-hydroxybutyrate et parfois des inclusions de polyphosphates (Hourcade, 2007).

g.Le genre *Devosia*

Le genre *Devosia* a été identifié en 1996 par Nakagawa *et al.* Et ne comprenait qu'une seule espèce rhizobienne. En étudiant des isolats en provenance de nodules de la légumineuse aquatique *Neptunia natans* poussant en Inde, Rivas *et al.* (2003) ont isolé des bactéries à croissance rapide. Cette nouvelle espèce a ensuite été nommée *Devosia neptuniae*. Mais récemment, sur la base de données chimiotaxonomiques et des propriétés moléculaires, une autre espèce du genre a été isolée à partir des racines de *Nitraria sibirica* au nord-ouest de la Chine, pour laquelle le nom *Devosia nitraria* sp. est proposé (Xu *et al.*, 2017).

h.Le genre *Microvirga*

Le genre *Microvirga* contient actuellement trois espèces de Rhizobia. Sur la base des données génotypiques, phénotypiques et de parenté ADN, trois nouvelles espèces de *Microvirga* ont été isolées et identifiées. Celles-ci proviennent des nodules des légumineuses indigènes *Listia angolensis* (de Zambie) et *Lupinus texensis* (États-Unis) dont les noms: *Microvirga lupini* sp., *Microvirga lotononidis* sp. et *Microvirga zambiensis* sp. sont proposés (Ardley *et al.*, 2012).

De même, dernièrement, une souche a été isolée du sol et qui représente une nouvelle espèce du genre *Microvirga*, pour laquelle le nom *Microvirga soli* sp. est proposé (Dahal et Kim, 2017).

i. Les genres *Shinella*, *Ochrobactrum*, et *Phyllobacterium*

Lin *et al.* (2008) ont isolé une souche bactérienne à partir de nodosités radiculaires de *Kummerowia stipulacea* cultivées en Chine. Cette souche est désormais une nouvelle espèce nommée *Shinella kummerowiae* sp. Zurdo-Pineiro *et al.* (2007) ont isolées deux souches bactériennes à partir de nodules de *Cytisus scoparius* en Espagne. Ces souches appartiennent à une nouvelle espèce appelée *Ochrobactrum cytisi* sp. alors que le genre *Phyllobacterium* contient actuellement trois espèces (Velázquez *et al.*, 2017).

1.2.2. La classe des β -Proteobacteria

a. Le genre *Burkholderia*

Le genre *Burkholderia* a été proposé par Yabuuchi *et al.* en 1992. Il comprend actuellement trente espèces rhizobiennes identifiées alors que d'autres sont toujours sous le nom de *Burkholderia* sp. (Martins *et al.*, 2015). Les espèces de ce genre peuvent croître en utilisant comme seule source de carbone le glucose, le glycérol, l'inositol, le galactose, le sorbitol ou le mannose. Ce sont aussi des bactéries fixatrices d'azote comme *Burkholderia vietnamiensis* (Gillis *et al.*, 1995) et *Burkholderia kururiensis* (Zhang *et al.*, 2000).

Deux souches rhizobiennes, ont été isolées à partir des racines de *Mimosa caesalpiniiifolia* du Brésil. Sur la base des similitudes des séquences du gène de l'ARNr 16S, d'une approche polyphasique, comprenant des hybridations ADN-ADN, électrophorèse en champ pulsé des profils d'ADN du génome entier, analyses de protéines entières, analyse des esters méthyliques d'acides gras et caractérisation biochimique extensive, la position taxonomique de ces souches; est une nouvelle espèce de *Burkholderia*, nommé *Burkholderia sabiae* sp. nov. (Chen *et al.*, 2008). Utilisant la même plante pour mettre en évidence de nouvelles espèces par Martins *et al.* (2015), en compilant une caractérisation morpho-physiologique, BOX, ERIC et REP, ont pu amélioré la distinction entre les isolats en comparant la séquence ARN r 16S et ont démontré une préférence des *Mimosa* pour les *Burkholderia* diazotrophes.

b. Le genre *Cupriavidus*

Cupriavidus anciennement *Wautersia* ou *Ralstonia* a été créé en 1995 par Yabuuchi *et al.* Le genre a subi récemment plusieurs révisions taxonomiques, dont l'espèce *Cupriavidus taiwanensis* est identifiée (Klonowska *et al.*, 2012). Une classification bactérienne sur la base d'une approche polyphasique a été réalisée sur trois souches bactériennes isolées en Malaisie. Ces souches sont considérées comme représentant une nouvelle espèce pour laquelle le nom de *Cupriavidus malaysiensis* sp. est proposé (Ramachandran *et al.*, 2017).

I .2. La lutte biologique par les différents genres de Rhizobia

Les Rhizobia sont des microorganismes qui ont la capacité à coloniser les surfaces des racines et à former des associations symbiotiques avec les plantes légumineuses (Ndoye, 1990). Non seulement ils jouent un rôle majeur dans la fixation biologique de l'azote, dans l'amélioration de la croissance des plantes mais également réduisent l'incidence des maladies dans diverses cultures (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Les Rhizobia et leurs différents genres ont un potentiel important pour contrôler la croissance de nombreux champignons phytopathogènes (Chao, 1990). L'activité antagoniste des Rhizobia est principalement attribuée à la production d'antibiotiques, d'enzymes mycolytiques et de sidérophores dans des conditions limitantes en fer (Fig. 2 ; Ongena *et al.*, 1999; Mishra *et al.*, 2006). En plus de la compétition et l'induction de résistances systémiques liées à la défense des plantes (El badry *et al.*, 2006).

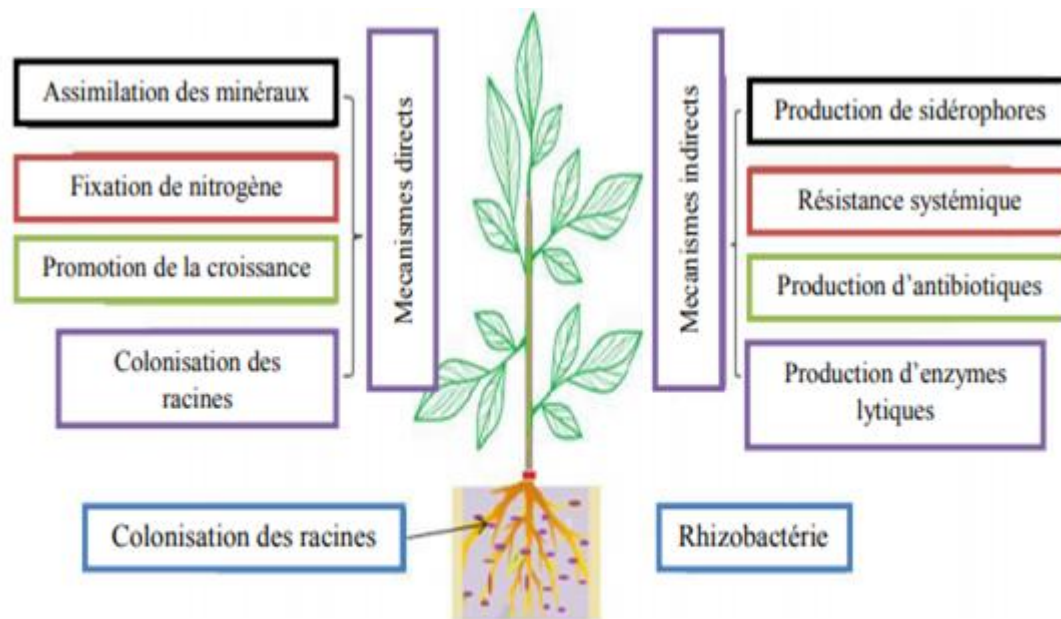


Figure 2. Représentation schématique des mécanismes d'action directe et indirecte employés par les PGPR (Ngoma *et al.*, 2012).

I .2.1. Activité antimicrobienne

a. *Mesorhizobium*

Seize isolats de *Mesorhizobium* sp. ont inhibé la croissance de *Fusarium oxysporum* l'agent causal de la fusariose du pois chiche, *in vitro*, avec des valeurs d'inhibition variant de 34.2 à 59.3% ; alors que la variation dans la production de composés antifongiques volatils était de 20 à 46.3% . Sur tous les *Mesorhizobium* sp., 88% étaient capables de produire des sidérophores et des protéases et 64% étaient capables de produire du cyanure d'hydrogène (HCN) et la cellulase (Bhagat *et al.*, 2014).

Mesorhizobium ciceri isolés à partir de pois chiches, ont été criblés pour leurs effet antagonistes envers *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. Sept isolats ont montré une inhibition envers ce pathogène, parmi eux trois isolats ont produit des sidérophores (Suman et Yadav, 2015).

b. *Sinorhizobium*

Le *Sinorhizobium meliloti* microsymbionte de *Medicago* spp. a été utilisé dans un test d'antibiose contre *Phoma medicaginis* dans des tests de bioprotection de *Medicago truncatula* du pathogène. Parmi les 17 souches de *S. meliloti* isolées à partir de nodules radiculaires de *M. truncatula* et de *M. laciniata* cultivées dans des sols tunisiens, six ont présenté une inhibition de croissance de 60% de cinq souches de *Phoma medicaginis* isolées de *M. truncatula* infectées. L'inoculation de la souche antagoniste *S. meliloti* à *M. truncatula* infectée par *P. medicaginis* était associée à une diminution significative de 65% de l'infection racinaire de la plante et une diminution de 80% de la mortalité des plantes (Mrabet *et al.*, 2011).

Récemment, Gao *et al.* (2018) ont montré que l'association des champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) et de *Sinorhizobium medicae* a réduit de 18% la décoloration des branches de la luzerne due à la pourriture des racines causé par *Microdochium tabacinum*.

c. *Ensifer*

Testant cinq souches bactériennes issues de fenugrec *Trigonella foenum-graecum* sur *Fusarium oxysporum*, les souches TR1, TR3 et TR5 ont été identifiées comme *Ensifer meliloti* et TR2 comme *Rhizobium leguminosarum* alors que TR4 n'a pas été identifiée. Kumar *et al.* (2011) ont montré que trois d'entre elles (TR1, TR2 et TR4) pouvaient inhiber la croissance de *F. oxysporum*, causant ainsi la perte de l'intégrité structurelle du mycélium, la perforation, la lyse, la fragmentation et la dégradation des hyphes. Cette activité est le résultat de la production d'acide indole acétique (IAA), de sidérophores et de chitinases par les souches TR1 et TR4 alors que TR2 montrait une activité β -1,3-glucanase.

d. *Bradyrhizobium*

Les propriétés antagonistes contre *Macrophomina phaseolina* des souches de *Bradyrhizobium* sp. ont été démontré par Deshwal *et al.* (2003b), où trois souches isolées de l'arachide, produisaient des sidérophores et de l'IAA, et présentaient une solubilisation du phosphate *in vitro*.

e.Ochrobactrum

Ochrobactrum anthropi a présenté également une activité antifongique *in vitro* contre six pathogènes testés. Mais a également diminué la pourriture brune du thé causée par *Phellinus noxius* sur les plants de thé à partir desquels elle a été isolée.

Une augmentation d'activités multiples a aussi été observée chez des plants de thé lors de l'application d'*O. anthropi* sur le sol suivie d'une inoculation avec *P. noxius*. C'est le cas, des activités enzymatiques tels que la chitinase, la β -1,3-glucanase, la peroxydase et la phénylalanine ammonia lyase, la phosphatases et la production des sidérophores et de l'IAA (Chakraborty *et al.*, 2009).

Parmi 316 isolats testés par Sowndhararajan *et al.* (2012), trois ont été désignés comme antagonistes vis-à-vis de *Pestalotiopsis theae* et *Exobasidium vexans in vitro*. Où l'application foliaire d'une culture de 36 h d'un des trois isolats et identifié comme *Ochrobactrum anthropi* a réduit de manière significative l'incidence de *Pestalotiopsis theae* comparativement aux autres isolats.

f.Methylobacterium

Les méthylobactéries ont un pouvoir d'antagonisme envers différents phytopathogènes. Le potentiel de biocontrôle de *Methylobacterium extorquens* a été testé en Inde contre des agents pathogènes fongiques *in vitro*, où quatre isolats ont significativement réduit la croissance mycélienne linéaire de *Fusarium udum*, *F. oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* et *Sclerotium rolfsii*. Deux isolats ont produit un antibiotique volatil très efficace sur la croissance mycélienne de *F. oxysporum* et *F. udum* (Poorniammal *et al.*, 2009).

g.Phylobacterium

Une souche appartenant au genre *Phyllobacterium* isolé chez *Epimedium brevicornu* a inhibé *in vitro* *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea* et *Botrytis fabae* (He *et al.*, 2009).

h. *Burkholderia*

Criblant le potentiel antagoniste de deux isolats de *Burkholderia cepacia*, il a été démontré qu'un isolat (BC-S) avait inhibé de 70.8 et 77% la croissance mycélienne de *Schizophyllum commune* et de *Colletotrichum dematium* respectivement; alors qu'un second isolat (BC-TM) était plus efficace pour inhiber de 62, 66.6 et 72.5% la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Ganoderma boninense* et *Fusarium solani* respectivement (Sijam et Dikin, 2005).

Un dépistage systématique de l'activité antifongique d'une collection de 397 espèces de *Burkholderia* a été réalisé vis-à-vis de *Candida albicans* et plusieurs basidiomycètes décomposeurs de bois: *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor*, *Hypholoma fasciculare*, *Resinicium bicolor* et *Phanerochaete velutina*. Parmi les isolats examinés, l'activité antifongique était plus importante chez: *B. ambifaria*, *B. cepacia*, *B. cenocepacia* et *B. contaminans*, où 47.85% des isolats étaient anti-candidiques, tandis que 48.10% étaient actifs contre *B. adusta*. Les isolats actifs de *Burkholderia* ont produit entre 1 et 10 métabolites antifongiques comme : l'énacyloxine, la pyrrolnitrine, la bactoboline et les quinoléines, en plus de nouveaux composés et de nouveaux dérivés de la bactoboline (Othman, 2012).

La production d'un antibiotique par *Burkholderia cepacia* serait responsable d'une inhibition d'une variété de champignons responsables de la fonte des semis comme celle du coton causé par *Rhizoctonia solani* (Kang et al., 1998). Cet antibiotique identifié comme la pyrrolnitrine est aussi étroitement lié à la suppression de la pourriture des tiges du poinsettia causée par *Rhizoctonia solani* (Wang et al. 2002). En plus de la pyrrolnitrine, *Burkholderia cenocepacia* aussi produit de la pyrroloquinoline quinone, actifs contre le flétrissement fusarien du bananier (Ho et al., 2015). De même, dans cette dernière étude et lors d'un essai sur le terrain où des plantules de culture tissulaire de bananier ont été inoculées avec *Burkholderia cenocepacia*, l'incidence de la fusariose *in planta* a été réduite à 3.4% contre 24.5% de plantes non inoculées infectées.

I .2. 2. Activité nématocide

Le filtrat de *Methylobacterium fujisawaense* a inhibé l'éclosion des œufs de nématodes à galles *Meloidogyne incognita* avec un taux de 99,6 à 100% en 24 heures et causant la mort chez les juvéniles (Prabhu *et al.*, 2009). Khan *et al.* (2018) ont rapportés les mêmes résultats par l'inoculation de *Rhizobium* sur les nématodes cécidogènes sur pois chiche, haricot mungo et pois cajun.

Introduction

Durant les dernières décennies, les légumineuses et leurs symbiotes ont attiré l'attention, en raison de leur tolérance aux conditions environnementales extrêmes, telles que la sécheresse, la salinité et les températures élevées. De plus, les *Rhizobia* symbiotiques des légumineuses à croissance naturelle établissent avec succès des symbioses efficaces dans ces conditions (Zahran, 2001).

La rhizosphère ou la zone d'influence autour des racines des plantes comprend des *Rhizobia* qui infectent les racines de légumineuses et induisent la formation de nodules. Antoun *et al.* (1998) ont révélé que les espèces de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* sont des rhizobactéries favorisant la croissance même des plantes non légumineuses, en particulier les radis. *Rhizobium* augmente la croissance des plantes par des moyens variés tels que la production des phytohormones comme l'acide indole acétique, les sidérophores, la solubilisation des phosphates, l'induction de la résistance aux maladies systémiques et l'amélioration de la résistance au stress (Hussain *et al.*, 2009), tels que la sécheresse (Athar, 1998). Les inoculants rhizobiens ont été fréquemment utilisés comme biofertilisants ayant une activité antagoniste (Yaquub et Shahzad, 2011).

Le présent chapitre est consacré à l'isolement et la caractérisation phénotypique des *Rhizobia* à partir des nodules de quatre espèces de légumineuses importantes ainsi qu'à la détermination, de quelques métabolites impliqués dans l'antagonisme.

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1. Matériel biologique

Les souches de référence de *Rhizobium* nous ont été offertes par le Pr Benguedouar, Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Université Mentouri Constantine (Algérie). Où, *Rhizobium sullae* sp. RHA6 et *Rhizobium leguminosarum* ont été identifiés à Constantine (Algérie) par l'équipe du Pr. Benguedouar et *R. sullae* RHF identifié à Pise (Italie) par le Dr S. Casella (Tableau 1).

Alors que, les graines utilisées dans cette étude (fève, petit pois, pois chiche et lentille) sont des graines du commerce.

Tableau 1. Les souches de *Rhizobium* référencées isolées des légumineuses et leurs origines.

Code des souches	Souches	Plante hôte	Origine
A6	<i>Rhizobium sullae</i> sp	<i>Hedysarum coronarium</i>	Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire de Pr Benguedouar, Constantine, Algérie
Sam12	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	
F	<i>Rhizobium Sullae</i> RHF	<i>Hedysarium coronarium</i>	Pise, Italie

F et A6 : isolés d'*Hedysarum*. Sam12 isolé du pois chiche.

II.1.2. Méthodes

1.2.1. Méthode de désinfection du matériel biologique (feuilles, graines...)

Les échantillons des plantes (fragmentés) et les graines des légumineuses sont trempées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5% pendant 2 min, ensuite ont été abondamment rincées à l'eau distillée stérile trois fois successivement.

1.2.2. Isolement et identification phénotypique des souches de Rhizobia

Les différentes étapes d'isolement des Rhizobia sont celles décrites par Vincent (1970), Somasegaran et Hoben (1985 et 1994) et Beck et *al.* (1993), et sont les suivantes : collecte des nodules, conservation et enfin isolement et conservation des souches.



Figure 3.A. les légumineuses utilisées pour la collecte des nodules des Rhizobia

a.petit pois b.pois chiche c.fève

Les légumineuses utilisées pour la collecte des nodules proviennent de la ferme expérimentale de UFA Sétif 1, alors que les nodules d'une souche bactérienne issues de fève proviennent d'une ferme de M'sila (région de Magra).

a. Collecte des nodules

La collecte des nodules est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent (1970), Beck *et al.* (1993) et Somasegaran et Hoben (1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet et les nodules sont ensuite détachés de leurs points d'attaches (Fig.3).

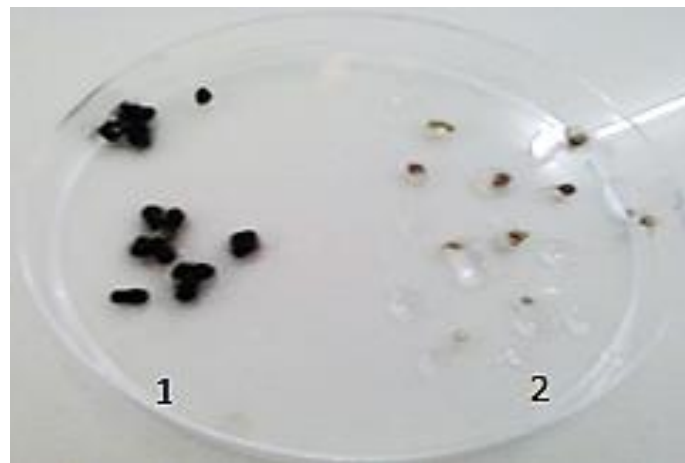


Figure 3.B. Les nodules des légumineuses utilisés pour l'isolement des bactéries

1 : nodule de fève, 2 : nodule de petit pois.

b. La conservation des nodules

En vue d'un usage immédiat, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C pour une durée ne dépassant pas les 48h après leur séparation des racines de la plante. Alors que pour une longue conservation la dessiccation des nodules est recommandée. Elle est réalisée dans des flacons en verre contenant un déshydratant en l'occurrence le CaCl_2 . Le quart d'un flacon en verre (Fig.4) est rempli par du CaCl_2 et par une couche de coton sur laquelle sont déposés les nodules et sont conservés immédiatement au réfrigérateur à 4° C. Ainsi les nodules peuvent être conservés de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

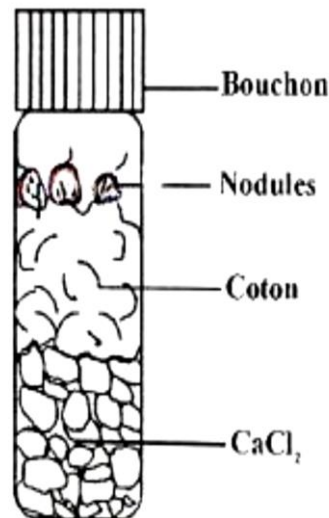


Figure 4. Conservation des nodules (Vincent,1970).

c. Désinfection des nodules

La technique d'isolement des *Rhizobium* consiste à désinfecter superficiellement les nodules par passages successifs dans de l'éthanol à 95%, puis ils sont transférés dans une solution de Chlorure de Mercure (HgCl₂) acidifiée à 0.1%, et sont ensuite rincés plusieurs fois à l'eau distillée stérile (Vincent, 1970).

d. Isolement des bactéries à partir des nodules

L'isolement est réalisé dans des conditions d'asepsie selon la méthode décrite par Vincent (1970). Les nodules désinfectés sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri à l'aide d'une anse de platine, le broyat du nodule est ensemencé en stries sur le milieu spécifique Yeast-Extract-Mannitol-Agar (YEMA). L'ensemencement est alors réalisé selon la technique des cadrans de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser. Les boîtes sont incubées trois jours à 28°C, et trois subcultures sont réalisées pour la purification.

e. Conservation des isolats

Les isolats sont conservés sur YEMA tamponné avec du CaCO₃ (3g/l) en tube incliné (Vincent, 1970; Beck *et al.*, 1993) sous forme de stries. Après incubation à 28°C pendant 48 h, les souches sont stockées à 4°C. Le CaCO₃ est utilisé pour neutraliser l'acidité du milieu (Beck, 1993).

1.2.3. Identification des souches bactériennes

Les souches isolées ont été examinées sur milieu YEMA quand à leurs forme, couleur et l'aspect des colonies selon Ahmad *et al.*(1984). En plus, de leur aspect morphologique quelques caractères physiologiques ont été recherchés pour compléter cette identification phénotypique par détermination de : (i) la température optimale de croissance, (ii) de la salinité tolérée, (iii) la résistance aux antibiotiques, (iv) du temps de génération et (v) la production de protéases et de sidérophores.

a. Effet de la température:

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, la tolérance des souches à différentes températures a été réalisée sur milieu solide YEMA aux températures 4, 37 et 50°C avec un témoin incubé à 28°C (Maatallah *et al.*, 2002 ; Hung *et al.*, 2005).

b.Tolérance au NaCl:

La capacité des souches à croître à différentes concentrations de NaCl, a été réalisée sur milieu solide YEMA contenant 0.5, 1 et 2% de NaCl. Après 3 jours d'incubation à 28°C, la croissance est comparée au témoin avec 0.1% de NaCl (Sadowsky *et al.*, 1983).

c.Résistance aux antibiotiques:

La résistance intrinsèque a été déterminée sur YEMA contenant 100µg/ml d'un antibiotique déterminé. Pour cela trois lots recevant chacun un antibiotique ont été préparé comme suit:(i) Ampicilline, (ii) Pénicilline G et (iii) Amoxicilline, le lot témoin étant exempt d'antibiotique (Alexandre *et al.*, 2006).

d.Utilisation de la source de carbone

Pour évaluer leurs capacités à utiliser différentes sources de carbone, les souches sont cultivées sur le milieu YEMA où le mannitol est remplacé par l'un des sucres : galactose, saccharose ou glucose. Un milieu YEMA contenant du mannitol est utilisé pour une croissance témoin. Les boîtes inoculées sont incubées à 28°C pendant 72 heures (Jordan, 1984).

e. Temps de génération :

Le temps de génération est déterminé en suivant la variation de l'absorbance d'une suspension bactérienne dans un intervalle de temps déterminé. En effet, la souche de *Rhizobium* est inoculée dans 50ml de milieu liquide YEM et est incubée à 28°C pendant 24h sous une agitation de 150 rpm.

La turbidité correspondant à la croissance bactérienne a été obtenue par l'absorbance des échantillons en phase exponentielle à 610 nm toute les 2h, et le temps de génération a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$\text{Temps de Génération} = (T2 - T1) / 3.3 (\log_{10} DO2 - \log_{10} DO1)$$

Où (T2-T1) est la différence de deux intervalles à deux points de la phase exponentielle en courbe de croissance; ($\log_{10} DO2 - \log_{10} DO1$) est la différence entre la valeur $\log_{10}$ de la DO2 au temps T2 et DO1 au temps T1 (Deshwal et Chaubey, 2014).

f. Production de protéases

La production de protéases a été déterminée sur milieu gélose au lait inoculé par les isolats de Rhizobia et incubé à 28°C pendant 72h. L'apparition de zones transparentes sous forme de halos autour des colonies bactériennes signifie la présence de protéases (de Oliveira et al., 2010).

g. La production de sidérophores

La production de sidérophores a été étudiée en utilisant le Chrome Azurol Sulfate (CAS) 0.012g/l (Schwyn et Neillands, 1987) qui est mélangé à 2.5 ml de perchlorate ferrique donnera une couleur orange en présence de sidérophores ou bleu en leurs absence (Carson et al., 1992).

Tous les essais ont été réalisés en triplicata.

II. 2. Résultats et discussion

Après isolement et purification dix isolats provenant des différentes plantes utilisées ont été retenus (Tableau 2).

Tableau 2. Les souches de Rhizobia isolées des légumineuses et leurs origines

Code des souches	Plante hôte	Origine
F ₃	<i>Vicia faba</i>	Msila, Algérie
F _{2m}	<i>Vicia faba</i>	Sétif, Algérie
Fmd	<i>Vicia faba</i>	Sétif, Algérie
P	<i>Pisum sativum</i>	Sétif, Algérie
P ₃	<i>Pisum sativum</i>	Sétif, Algérie
Pd	<i>Pisum sativum</i>	Sétif, Algérie
Pcx	<i>Cicer arietinum</i>	Sétif, Algérie
Pcd	<i>Cicer arietinum</i>	Sétif, Algérie
Pc ₃	<i>Cicer arietinum</i>	Sétif, Algérie
L	<i>Lens culinaris</i>	Sétif, Algérie

Pcx, Pcd et Pc₃ souche du pois chiche ; F₃, F_{2m} et Fmd souche de la fève ; P, P₃ et Pd souche du petit pois ; L souche du lentille.

II.2.1.Caractères phénotypiques de Rhizobia

La plupart des bactéries ont un hôte spécifique, les racines des légumineuses sont colonisées par des espèces bactériennes spécifiques appelées *Rhizobium*. Celles-ci sont subdivisées en deux groupes sur la base de leurs taux de croissance (Deshwal et Chaubey, 2014).

Le premier regroupe celles à croissance rapide et le second regroupe celles à croissance lente (Lohis et Hansen, 1921) in Elkan(1992). Les bactéries à croissance lente ont un temps de génération moyen de plus de 6 h et les bactéries à croissance rapide ont un temps de génération inférieur à 6 h (Elkan, 1992). D'autre part, il y a quelques différences entre les Rhizobia et leurs tolérances aux températures, salinité,...

2.1.1. Caractères morphologiques et cultureux

La détermination des caractères morphologiques et physiologiques des souches bactériennes obtenues rappelle les Rhizobia. Ces isolats se développent après 48 à 72 heures sur milieu YEMA(Fig.5). Elles sont toutes de texture homogène et de couleur crème, avec des colonies circulaires légèrement bombées et lisses, avec une texture translucide. Elles sont mucilagineuses et gommeuses. L'observation microscopique montre des cellules en bâtonnets courts, à Gram négatif et qui n'ont pas absorbé la couleur rouge une fois cultivées sur YEMA contenant le rouge Congo. Shetta *et al.* (2011) ont mentionné que Rhizobia n'absorbe pas le rouge Congo. D'après ces caractéristiques morphologiques, les souches se sont montrées en accord avec la description de Vincent (1970) et Jordan(1984) pour les Rhizobia.

Presque la totalité des colonies de Rhizobia isolées sont visqueuses avec formation des filaments signe de la production de lipopolysaccharides (Dupont,1998; Gharzouli *et al.*,2012). La production de polysaccharides est une autre caractéristique des Rhizobia qui sont impliqués dans des processus importants comme l'infection et la formation de nodules (Teixeira *et al.*, 2010).



Figure 5. Aspect macroscopique des Rhizobia sur milieu YEMA

a. Température de croissance

Presque la totalité des isolats sont capables de croître à des températures variant de 4 à 37°C. Toutefois 30% des isolats sont capables de pousser à 50°C. Parmi les souches qui se développent entre 4 et 37°C, 70% ont été isolées du petit pois, du pois chiche et des lentilles alors que celles qui vont jusqu'à 50°C proviennent des fèves (Tableau 3).

Tableau 3. Tolérance de Rhizobia aux différentes Températures de croissance

Souche Température	F ₃	F _{2m}	F _{md}	P	P ₃	Pd	Pcx	Pcd	Pc ₃	L
4°C	+	++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	++
37°C	+	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	++
50°C	+	++	++	–	++	+	+	+	+	–

(F₃, F_{2m}, F_{md}) souche de fève, (P, P₃, Pd) souche de petit pois, (Pcx, Pcd, Pc₃) souche de pois chiche, L souche de lentille.

La croissance et la survie des Rhizobia dans le sol sont négativement affectées par la température (Bhargava *et al.*, 2016). Par conséquent, le bénéfice potentiel de l'association légumineuse/*Rhizobium* n'est pas pleinement exploité lorsque les températures du sol deviennent limitées, comme on c'est le cas généralement dans les régions tropicales et subtropicales, où les températures dépassent 45°C dans les couches supérieures du sol pendant la saison estivale (Yadav et Nehra, 2013).

En effet, des températures élevées conduisent à une perte accrue d'eau par transpiration (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Cette contrainte thermique altère la perméabilité des membranes et provoque la dénaturation de certaines protéines entraînant un effet délétère sur les Rhizobia (Bhargava *et al.*, 2016). Ceci peut conduire à une réduction de la croissance rhizobienne, affectant la colonisation et donc les événements infectieux aboutissant à la formation de nodules. Et dans certains cas elle peut même retarder la nodulation ou encore restreindre les nodules à la région proche de la surface (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). La sélection de souches tolérantes à la température aide à leur survie dans le sol et à l'établissement d'une symbiose efficace (Bhargava *et al.*, 2016).

Auparavant, il a été rapporté que dans les régions arides, la température élevée du sol affecte à la fois la vie libre et la vie symbiotique de *Rhizobium*. Certaines souches de *Rhizobium* survivant à un stress thermique peuvent perdre leur infectivité, en raison du durcissement du plasmide ou à des altérations dans les polysaccharides cellulaires nécessaires pour l'infection (Zahran, 1999).

Plusieurs études ont montré que *Rhizobium* peut croître à des températures de l'ordre de 45°C et plus (Nour *et al.*, 1995; Abdelgadir et Alexander, 1997; Graham et Vance, 2003 ; Legesse et Assefa, 2014). D'autre part, Belay et Assefa (2011) et Shetta *et al.* (2011) ont noté que les Rhizobia isolés successivement d'une légumineuse ligneuse de l'Arabie saoudite et des fèves d'Ethiopie se sont développés à des températures comprises entre 15 et 35°C, et sont donc considérées comme des souches mésophiles (Somasegaran et Hoben, 1994).

Cependant, Berrada *et al.* (2012) ont montré que parmi les Rhizobia qu'ils ont isolé à partir de multiples espèces de légumes au Maroc, certaines pouvaient se développer à 4°C (55%) ; alors que d'autres peuvent aller jusqu'à 55°C (22%).

Ahmad *et al.* (1981) avaient auparavant suggéré que les souches de *Rhizobium* isolées des zones chaudes pouvaient mieux survivre à des températures élevées que les souches isolées des régions froides. Les régions d'isolement de nos Rhizobia sont relativement chaudes, il s'agit en l'occurrence de Sétif et M'sila où les températures peuvent osciller entre 38 à 44°C. Ceci explique en partie leurs tolérances à de hautes températures. Certaines souches de *Rhizobium* (*R. leguminosarum*) sont tolérantes à la chaleur et forment des symbioses efficaces avec leurs légumineuses hôtes. Ces associations seront plus pertinentes pour la croissance des légumineuses inoculées dans les climats arides (Hungria *et al.*, 1993).

D'autre part, Belay et Assefa (2011) et Ouslim *et al.* (2015) ont même noté que quelques isolats de *Rhizobium* isolés successivement de fèves d'Ethiopie et d'haricots d'Algérie se sont développés à des températures comprises entre 5 et 10°C. Dans une étude plus récente, Manasa *et al.* (2017) ont démontré que parmi les 15 souches de *Rhizobium* isolées de sols rhizosphériques, deux isolats toléraient toutes les températures testées (28, 37 et 45 °C).

La croissance et la survie des Rhizobia dans les sols et leur association symbiotique avec les légumineuses sont affectées par les températures élevées du sol. Des Rhizobia isolés des milieux chauds et secs de la savane du Sahel sont connus pour tolérer des températures de l'ordre de 45°C, cependant leurs capacités infectieuses se trouvent affectées (Hartel et Alexander 1984; Karanja et Wood, 1988).

b. Tolérance au chlorure de sodium

Toutes les souches ont une croissance appréciable à des concentrations comprises entre 0.5 et 2% de NaCl (Tableau 4); c'est le cas des souches isolées du petit pois, du pois chiche et des lentilles. Cependant, dans le cas des isolats de la fève ceux-ci tolèrent des concentrations de 1 à 2%.

Tableau 4. Tolérance de Rhizobia aux différentes concentrations de salinité

Souche concentration de NaCl (g/l)	F ₃	F _{2m}	F _{md}	P	P ₃	Pd	Pcx	Pcd	Pc ₃	L
0.5	+++	+	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++

L'un des problèmes majeurs de l'agriculture dans les régions semi-arides est la salinité du sol. Parmi les traits phénotypiques recherchés pour la distinction des Rhizobia, leur tolérance à des concentrations élevées de NaCl. L'application des Rhizobia tolérants de hauts niveaux de salinité dans les cultures de légumineuses contribuerait à une fixation efficace de l'azote par la formation de nodules efficaces (Bhargava *et al.*, 2016).

Des résultats similaires à nos résultats ont été rapportés par Nour *et al* (1995) et Jarvis *et al.* (1997). Maatallah *et al.* (2002) ont montré que les Rhizobia nodulant le pois chiche (*Cicer arietinum*) pouvaient tolérer des concentrations en NaCl allant de 1 à 2 %. Alors que Berrada *et al.* (2012) avaient rapporté que 31% des souches de *Rhizobium* qu'ils avaient testé étaient tolérantes à 2% de NaCl. Deshwal et Chaubey(2014) ont par ailleurs constaté que seulement 16% des Rhizobia du petit pois avaient toléré 2% de NaCl. Dans la présente étude toutes les souches isolées du petit pois étaient tolérantes à 2% de sel. Alors que, des isolats d'espèces de lotus cultivés dans une région infra-aride de Tunisie tolèrent des concentrations de NaCl allant de 1.39 à 3.48%, et environ 22% de ces isolats continuent de croître à 3.48% (Rejili *et al.*, 2009). Cependant, des concentrations élevées de chlorure de sodium conduisent à des changements marqués dans le modèle de croissance des plantes (Singleton *et al.*, 1982 ; Yelton *et al.*, 1983).

c. Résistance intrinsèque aux antibiotiques

La plupart des souches de *Rhizobium* isolés dans la présente étude montrent une résistance élevée en présence de pénicilline G et d'amoxicilline et 70% résistent à l'ampicilline (Tableau 5). Dans la présente étude 88 à 92% des *Rhizobium* isolés des fèves, du petit pois, des lentilles et des pois chiche sont résistants aux antibiotiques testés. Près de 67 % des souches provenant du pois chiche et des fèves sont résistants à l'ampicilline.

Tableau 5. Tolérance de Rhizobia aux différents antibiotiques

Souche ATB(100µl/ml)	F ₃	F ₂ m	Fmd	P	P ₃	Pd	Pcx	Pcd	Pc ₃	L
Penicilline G	+++	+++	+++	+	+++	++	++	+++	+	+++
Ampicilline	—	+++	+++	+++	+	—	—	+	+++	+
Amoxicilline	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	++	+++

Les souches rhizobiennes montrent différents degrés de sensibilité aux antibiotiques en raison de la variation génétique des gènes ciblés, cette résistance est acquise par transfert horizontal de gènes (Bhargava *et al.*, 2016). Nombreuses sont les études qui ont souligné l'importance de la résistance intrinsèque en tant que caractère phénotypique pour la discrimination et l'identification des souches rhizobiennes (Beck, 1993 ; Diouf *et al.*, 2008 ; Bhargava *et al.*, 2016). Vu l'immense hétérogénéité qui existe entre les populations de symbiotes de la même légumineuse et/ou faisant partie de la même espèce (Beynon et Josey, 1980 In Diouf *et al.*, 2008).

Benselama (2015) a cité la résistance aux antibiotiques comme faisant partie des facteurs environnementaux affectant la fixation symbiotique de l'azote. Et donc, la présence d'antibiotiques dans le milieu affecterait les Rhizobia dans leurs capacités à infecter leurs plantes hôtes.

Ceci s'accorde aussi relativement avec les travaux d'Içgen *et al.* (2002) sur la résistance de la souche *Rhizobium* aux antibiotiques utilisés notamment, l'ampicilline. En effet, la résistance à la pénicilline et l'ampicilline des *Rhizobia* isolées des nodosités de *Cicer arietinum* dans la région méditerranéenne a été rapportée par différentes études (Alexandre *et al.*, 2006 ; Ouarts et Chekireb, 2011). Toutefois, Maatallah *et al.* (2002) ont constaté que seulement 14 à 25% des isolats du pois chiche étaient résistantes à l'ampicilline, alors que Berrada *et al.* (2012), Legesse et Assefa(2014) ont montré que tous les isolats de *Rhizobium* issus des fèves étaient résistants à l'ampicilline. Dans une étude plus récente des souches de *Rhizobium* isolées de la fève et du soja de l'ouest de l'Ethiopie se sont avérées résistantes aux antibiotiques suivants : l'amoxicilline, l'ampicilline et la cloxacilline (Abera *et al.*, 2015).

Comme pour toutes les bactéries utilisées comme inoculant, la résistance aux antibiotiques est fréquemment utilisée comme moyen de différenciation des souches de *Rhizobium*. De plus, il a été démontré qu'il n'y avait pas de différences quand à la résistance intrinsèque aux antibiotiques entre les *Rhizobia* à croissance lente et rapide (Bhargava *et al.*, 2016). Considérant les modes d'action des antibiotiques employés, et la résistance affichée par certains isolats à des concentrations plus élevées indique la variation des déterminants de perméabilité aux antibiotiques. Ces derniers interfèrent avec la synthèse de la paroi cellulaire. Cependant, les isolats à croissance lente présentant une résistance à tous les antibiotiques, produisent une grande quantité d'EPS qui peut empêcher l'absorption de l'antibiotique par les cellules (Bhargava *et al.*, 2016). Toutefois, les souches de petit pois, de fève et de lentille sont des *Rhizobia* à croissance rapide avec un Tg allant de 2.9 à 5.3 h, mais sont résistantes aux antibiotiques testés.

d. Utilisation des sources de carbone

Les résultats obtenus indiquent que la plupart des souches de *Rhizobia* sont capable d'assimiler les hydrates de carbone étudiés (Tableau 6), avec cependant un optimum de croissance en présence du mannitol. Ces résultats rejoignent ceux qui ont été rapportés par Deshwal et Chaubey(2014).

Tableau 6. Tolérance de Rhizobia aux différentes sources de carbone

Souche Source de carbone	F ₃	F _{2m}	Fmd	P	P ₃	Pd	Pcx	Pcd	Pc ₃	L
glucose	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++
galactose	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
saccharose	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++

Comme toutes les bactéries colonisant les rhizosphères, les Rhizobia sont dotés de grandes capacités métaboliques. Les souches de *Rhizobium* des légumineuses méditerranéennes utilisent une grande variété de glucides comme seules sources de carbone et d'énergie (Ouslim *et al.*, 2015).

De nombreuses études ont montré que sur le plan nutritionnel les Rhizobia à croissance rapide ne sont pas exigeantes et peuvent utiliser différentes sources de carbone, alors que les Rhizobia à croissance lente semblent être difficiles sur le plan nutritionnel (Stowers, 1985).

En fait, le genre *Rhizobium* se caractérise par la capacité d'utilisation du mannitol, du glucose, du fructose et du saccharose comme sources de carbone (Vincent, 1970 ; Werner, 1992). Par ailleurs, Ouslim *et al.* (2015) ont prouvé que trente souches de *Rhizobium* issues de fèves de différentes régions d'Algérie se sont bien développées sur un milieu contenant le glucose, six parmi elles ont métabolisé le saccharose, seulement deux souches se sont développées en présence du galactose, et le reste utilisent le sorbitol, le cellobiose et le maltose. Chandra *et al.* (2007) ont constaté que dans la rhizosphère de *Brassica campestris* la population de *Mesorhizobium loti* MP6 a considérablement augmenté, ce qui reflète sa potentialité à utiliser les exsudats des racines (acides aminés libres, protéines, glucides, alcools, vitamines ou hormones) comme sources de carbone. D'autre part, il a été démontré que la population de *Bradyrhizobium* est très élevée dans la rhizosphère d'arachide, car elle utilise comme substrat les produits de dégradation des nodules (Deshwal *et al.*, 2003b).

e. Temps de génération(Tg)

Les isolats de Rhizobia testés dans la présente étude ont un temps de génération compris entre 1.9 et 6.4 h (Tableau 7), donc un pourcentage de 92% des isolats sont des Rhizobia à croissance rapide où le Tg est inférieur à 6h et 8% à croissance lente où le Tg est supérieur à 6h.

En 1921, Lohis et Hansen ont caractérisé et subdivisé les Rhizobia en deux groupes en fonction de leurs taux de croissance. Le premier groupe comprend les Rhizobia à croissance rapide, et le second ceux à croissance lente.

Dans un milieu synthétique au laboratoire, les bactéries à croissance lente ont un temps de génération moyen supérieur à 6 h illustré par les Rhizobia associés au soja et au niébé (Elkan, 1992). Alors que, les bactéries à croissance rapide ont un temps de génération inférieur à 6 h (Elkan, 1992; Rejili *et al.*, 2009) ; et sont illustrées par les Rhizobia associées à la luzerne, au trèfle, haricots et pois, où le temps de génération est inférieur à la moitié du temps nécessaire pour les lents (Elkan, 1992).

Maatallah *et al.* (2002) ont constaté que les temps de génération des Rhizobia isolés de pois chiche était compris entre un minimum de 50 min et un maximum de 9 heures, alors que les Tg pour les isolats obtenus à partir du pois chiche dans notre étude étaient compris entre 1.98 et 6.41h. Les espèces appartenant à *Mesorhizobium* peuvent avoir un Tg allant de 1 à 8 h (Kamble *et al.*, 2006), celui des *Sinorhizobia* est par contre compris entre 3 et 5h (Abdelaziz *et al.*, 2008). C'est pourquoi, en fonction de leurs Tg, certains de nos isolats peuvent appartenir soit à *Mesorhizobium* ou encore à *Sinorhizobium*. Toutefois, Shetta *et al.* (2011) ont prouvé que le Tg des Rhizobia isolés d'une légumineuse (*Acacia*) poussant dans la région de Riyadh (en Arabie Saoudite) est compris entre 2.07 et 3.85h ; par contre les Tg pour les souches testées (A6 et F) de *Hedysarum* (légumineuse poussant en Algérie et en Italie) est de 2.22 et 2.78h respectivement. Par ailleurs, le Tg des isolats obtenus des plants de fèves de la présente étude sont semblable à ceux rapportés par Belay et Assefa (2011) avec un temps de génération de 1.9 à 4.3h. D'autre part, dans leur étude Deshwal et Chaubey (2014), ont constaté que les Rhizobia isolés du petit pois ont un temps de génération moyen compris entre 3.0 à 3.6 h; tandis que dans la présente étude nous avons constaté que le Tg de celles-ci est compris entre 3.1 et 5.3h.

f. Production de sidérophores et de protéases impliqués dans l'antagonisme

Les isolats testés ont donné des halos orange en présence de CAS indiquant ainsi la production de siderophores (Tableau7). En effet, certains isolats exhibent des halos transparents sur gélose au lait, preuve d'une activité protéolytique. deOliveira et *al.*(2010) ont prouvé que deux souches des *Rhizobium* isolées des sols d'Amazonie centrale ont produit des quantités appréciables de protéase alcaline.

Le fer est un élément essentiel à la croissance de la plupart micro-organismes. Il agit comme un cofacteur pour certaines enzymes impliquées dans la plupart des processus cellulaires, y compris le transfert d'électrons, la photosynthèse, la fixation d'azote

Dans les conditions d'aérobiose, la disponibilité du fer libre est limitée par sa très faible solubilité. Les bactéries et les champignons ont donc développé des agents chélateurs d'ions ferriques efficaces, appelés sidérophores pour la récupération de fer de l'environnement extracellulaire (Baakza *et al.*, 2004).

Antoun *et al.* (1998) ont montré que 181 isolats de *Rhizobium* spp. parmi les 196 testés sont producteurs de sidérophores. Alors qu'Arora *et al.*(2001), avaient constaté que seulement quelques isolats de *Rhizobium meliloti* isolés de la plante médicinale *Mucuna pruriens* étaient capable de produire des siderophores. Cependant, Samavat *et al.* (2011) ont prouvé que les sidérophores sont produits par tous les Rhizobia examinés. Récemment, il a été rapporté qu'un isolat de *Rhizobium nepotum* produit aussi des sidérophores (Ghorpade et Gupta., 2016). Ceci leurs fournit un avantage supplémentaire entraînant l'exclusion des pathogènes en les privant de fer (Deshwal *et al.*, 2003a).

La production de sidérophores a aussi été rapporté comme facteur de colonisation de la rhizosphère chez certains PGPR comme : *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum* et *Sinorhizobium meliloti* (Carson *et al.* 2000; El-Tarabily et Sivasithamparam 2006). En plus des sidérophores, la synthèse d'enzymes extracellulaires hydrolysant les parois cellulaires fongiques ont été décrites comme faisant partie de la stimulation indirecte induite par les PGPR (Zahir *et al.*, 2004; van Loon, 2007).

Partie Pratique

Tableau 7 .Certains caractères des Rhizobia isolés

souche	A6	Sam12	F	F ₃	F _{2m}	Fmd	P	P ₃	Pd	Pcx	Pcd	Pc ₃	L
Tg(h)	2.22	3.46	2.78	2.39	4	2.90	5.18	5.30	3.10	1.98	6.41	2.80	5.20
Protease	+	+	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+
siderophore	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): production, (-): pas de production, Tg (h): temps de génération en heure ; A6, F, Sam12 :souches de référence de *Hedysarum* et pois chiche ; F₃ ,F_{2m} et Fmd: souches de fève ; P ,P₃ et Pd: souches de petit pois ; Pcx ,Pcd et Pc₃: souche de pois chiche ; L: souche de lentille .

Introduction

Les maladies des plantes sont parmi les principales contraintes affectant la productivité des cultures tant en termes de qualité que de quantité. Les organismes causant les maladies comprennent les champignons, les bactéries, les virus, et les nématodes....

Le nombre d'organismes fongique capables d'infecter les plantes est estimé entre dix mille et quinze mille espèces, contre environ 50 infectant l'homme (Javier *et al.*, 2014). Ces microorganismes sont responsables de 70% de pertes agricoles par le monde (Oerke , 2006).

L'infection des plantes par un champignon phytopathogène est un processus appelé "cycle de la maladie ", dont la complexité varie selon les espèces, mais cela comprend toujours un certain nombre d'étapes obligatoires (inoculation, adhésion, germination, pénétration et invasion ; Javier *et al.*, 2014), où les champignons utilisent des nutriments de leurs hôtes, et produisent plus de spores pendant leur croissance, ce qui contribue à la propagation de l'agent pathogène. Les symptômes courants causés par ce dernier comprennent les taches, les flétrissements, les brûlures, et les chancres touchant les feuilles; alors que les pourritures et les dépérissements touchent les fruits.

Ce chapitre s'intéresse à l'isolement et l'identification des champignons à partir de plantes annuelles et pérennes, en fonction de leurs morphologies et de la présentation de leurs organes fructificateurs ; en vue de leurs utilisation dans les tests d'antagonisme par *Rhizobium*.

III.1. Isolement des champignons

III.1.1. Echantillonnage des souches fongiques

Les échantillons fongiques sont isolés de différentes parties (feuilles, graines et tiges) de plantes (fève, blé, cognassier, vigne, olivier, amandier, eucalyptus, lierre, rose violette et framboise) montrant des symptômes de maladies ; issues de deux régions d'Algérie : Sétif et Bejaia (Fig.6). Tous les échantillons sont recueillis dans des sacs stériles et sont acheminés directement au laboratoire pour être analysés ou bien conservés au congélateur à -6°C jusqu'à analyse.



Figure 6. Les plantes infectées utilisées pour l'isolement des champignons

1 : Lierre ; 2 : Cognassier ; 3 : Vigne ; 4 : Olivier

III.1.2. Pré traitement et mise en culture des échantillons

Les échantillons des plantes (fragmentées) sont désinfectés (comme cela est décrit plus haut en chapitre II) ensuite sont séchés sur papier filtre stérile (Zehhar *et al.*, 2006). La mise en culture des champignons issue des fragments suspects est réalisée sur milieu PDA. La durée d'incubation est de sept jours à 28°C. Pour chaque échantillon, trois boîtes sont réalisées.

III.1.3.Purification des isolats fongiques

Les isolats obtenus sont purifiés par un repiquage successif sur milieu PDA jusqu'à l'obtention de cultures pures. Cette pureté est contrôlée par observation microscopique des cultures. Les isolats ont été identifiés selon leurs caractères morphologiques, microscopiques et macroscopiques selon Leslie et Summerell (2006).

III.1.4.Conservation des isolats

Les isolats fongiques sont ensuite conservés sur du PDA en tubes inclinés à 4°C (Botton *et al.*,1990).

III.1.5.Identification :

Les champignons isolés et purifiés sur les milieux de culture, ont été par la suite examinés à l'œil nu. L'identification des champignons est basée sur des critères macroscopiques (critères culturaux), et microscopiques. Les caractères ainsi étudiés sont:

a.Caractères macroscopiques :

Couleur des colonies : blanche, crème ou colorée (verte, brune, orangée, violette, grises...).

Couleur de l'envers des boîtes.

Texture ou aspect du thalle (velouté, laineux, poudreux, glabre, duveteux, cotonneux etc.).

b.Caractères microscopiques :

L'observation des échantillons s'est fait en rajoutant une goutte de lacto phénol afin d'avoir une bonne résolution. L'examen microscopique des champignons a été effectué sur des préparations à l'état frais, à l'aide des objectifs(X 40) et (X100).

Lors de l'analyse microscopique des colonies, plusieurs structures des champignons filamenteux sont considérées comme :

* La spore: endogène ou exogène.

*Le mycélium: couleur, absence ou présence de cloisons, ornementation des parois, largeur, mode de ramification.

* La nature des organes différenciés tels que : zygosporés, sporocystes, conidiophore.

III.2.Résultats et discussion

a.Identification des champignons isolés des plantes infectées

L'identification des genres fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de Leslie et Summerell(2006), en se basant sur les caractères macroscopiques culturaux et ceux retenus après l'observation au microscope optique. En effet, certains genres fongiques purifiés et identifiés au cours de cette étude sont représentés par deux espèces c'est le cas des genres *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., et *Penicillium* spp ; alors que les genres *Cladosporium* spp., *Humicola* spp. et *Aspergillus* spp. ne sont représentés que par une seule espèce.

b.Etude macroscopique et microscopique

Alternaria spp. 1et 2

Les deux isolats d'*Alternaria* spp. 1et 2 ont été purifiés respectivement de l'olivier et de l'amandier, où il y avait des lésions jaune à marron foncé sur les feuilles d'olivier et marron sur ceux de l'amandier. L'isolat spp.1, présente une colonie poudreuse et laineuse, de couleur brune foncée (Fig.7 : a1) ; alors que, l'isolat spp.2 présente une colonie poudreuse, de couleur vert à noir (Fig.7 : a2), leurs revers sont noir et leurs croissances sont rapide de 4cm/semaine.

Les deux souches présentent un mycélium cloisonné associé à la présence de conidies pluricellulaires (Fig.7 : b1 et b2) en chaines brunes irrégulières ; souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement avec des conidiophores à croissance sympodiale foncées, simples ou ramifiés. Ces caractéristiques morphologiques rappellent ceux du genre *Alternaria* (Kapoee et Hingorani, 1958).

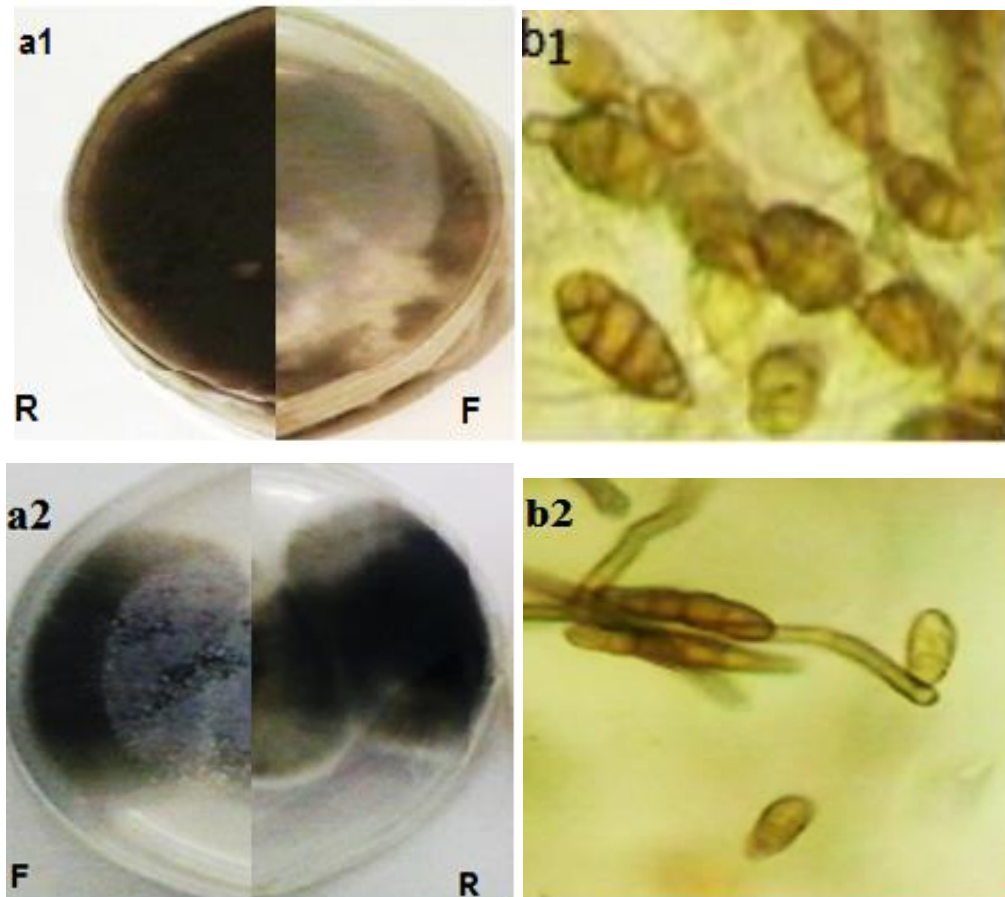


Figure 7. Aspect macroscopique (a1, a2) et microscopique (b1,b2)d'*Alternaria* spp.1 et spp. 2 isolés de l'olivier et de l'amandier respectivement

F : fond R : revers

L' *Alternaria* est retrouvé chez les solanacées, sur tomate dans les zones humides du monde et dans les parties les plus arides (Kapooe *et al.*, 1958 ; Thilagam *et al.*,2018), et aussi dans les champs de pommes de terre de la province de l'Azerbaïdjan occidental (Jarchelou *et al.*,2013). Par ailleurs, une étude menée en Argentine a montré que l'*Alternaria* était aussi présent dans des échantillons de céréales (Patriarca *et al.*, 2007).

En effet, Mmbaga *et al.* (2011) ont clairement démontré que l'*Alternaria* est un agent pathogène primaire de la famille des oleacées causant une brûlure des feuilles du lilas (*Syringa* sp.). De même ces champignons affecteraient les racines de carotte dans les provinces d'Ankara dont 60 isolats ont été obtenus à partir des lésions nécrotiques (Tulek et Dolar, 2015).

***Cladosporium* spp.**

Cladosporium a été isolé de la rose violette où il présentait des lésions jaunes. Ce champignon aussi se caractérise par une colonie poudreuse mais velouté, de couleur crème à brune noire, à revers noir (Fig.8 : a) ; et à croissance moyenne de 2.4 cm/semaine. Le mycélium de cette souche est cloisonné avec des conidiophores ramifiés et allongés (Fig.8 : b), contenant des conidies en chaîne unicellulaires septées acropétale, avec plusieurs sites conidiogènes, en plus de petites colonies de conidies en chaînes globulaires et lisses. Les différents caractères présentés par cette souche se rapprochent énormément de ceux correspondant au genre *Cladosporium* rapporté par Sutton *et al.* (1970).

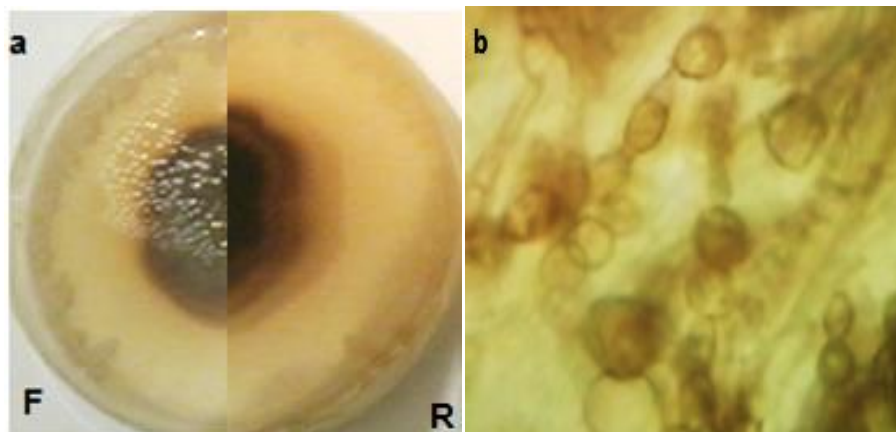


Figure 8. Aspect de *Cladosporium* spp. isolé des feuilles de rose violette

a : macroscopique , b : microscopique , F : fond , R :revers

Ce genre est retrouvé chez de nombreuses plantes. Lors des études sur les champignons , Schubert *et al.*(2007) ont identifié le *Cladosporium* chez la pivoine (*Paeonia* spp.), aussi en Corée de nombreuses espèces de ce genre résidant sur les conifères comme le pin, ont été rencontrés (Paul et Yu, 2008). Zhang *et al.* (2011) l'ont isolé à partir des feuilles de *Huperzia serrata*, aussi été isolé par Laib (2014) du laurier rose (*Nerium Oleander* L). Et plus récemment, il a même été isolé de pustules de rouille de chrysanthème dans une serre commerciale de Villa Guerrero, à Mexico (Torres *et al.*, 2017).

***Aspergillus* spp.**

Les *Aspergillus* sont ubiquistes formant des moisissures sur les denrées alimentaires, dans la nature, en particulier dans la végétation comme les feuilles. Les conidies sont communément présentes dans l'air et dans l'eau (Brand ,2008).

Dans la présente étude, il a été isolé à partir des extrémités des feuilles de vigne qui avaient une couleur marron clair. Caractérisé par une colonie poudreuse à duveteuse, plate, ayant une couleur verte claire, avec un revers jaune vert et une croissance rapide de 4.3cm/semaine (Fig.9 : a). Cette souche présente un mycélium cloisonné et hyalin avec des conidiophores nombreux, dressés et non ramifiés, lisses, terminés par des vésicules contenant des conidies en chaîne divergentes unicellulaires et circulaires ou sphériques avec des têtes conidiennes unisériées ou bisériées noires (Fig.9 : b). Les phialides, formées directement sur la vésicule. Ces caractéristiques morphologiques correspondent au genre *Aspergillus* (Pitt et Hocking, 2009).

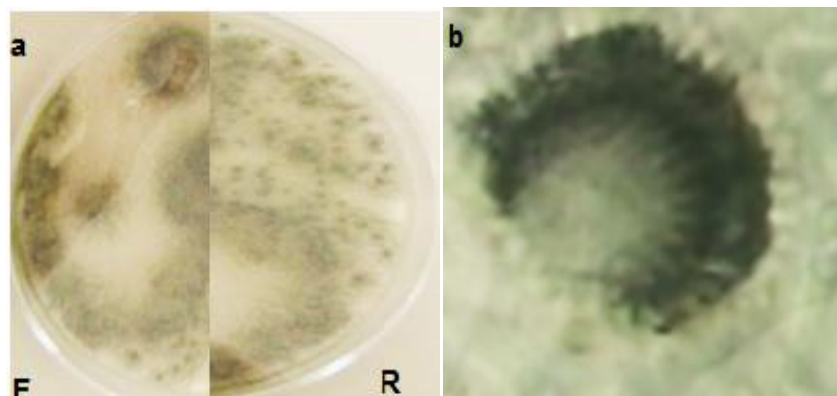


Figure 9. Aspect d'*Aspergillus* spp. isolé du vigne

a : macroscopique b : microscopique , F :fond , R :revers

Par ailleurs, ce genre a été isolé et identifié à partir des poacées tels que le sorgho (Satish *et al.*, 2007), et le maïs (Nyongesa et Okoth, 2015 ; Thilagam *et al.* , 2016). Aussi pour leurs identifications les caractéristiques macro-morphologiques et les structures microscopiques ont été considérés. Ce pathogène est aussi rencontré chez les fabacées telles que l'arachide (Ouattara-Sourabie *et al.* , 2011 ; Thilagam *et al.* , 2016).

***Penicillium* spp.1 et 2**

Le *Penicillium* a été isolé des feuilles de cognassier et des graines de blé où les lésions étaient de petites taches marron à jaune. Le premier isolat se caractérise par une colonie, cotonneuse et floconneuse, verte grise, à revers orangé et croissance rapide de 4.5cm/semaine (Fig.10:a1), alors que le second possède une colonie poudreuse et veloutée, bleue verte, à revers jaune à vert et croissance rapide de 4cm/semaine (Fig.10 :a2). Les deux isolats possèdent un mycélium cloisonné hyalin portant de nombreux conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille qui est constitué de phialides cylindriques branchées directement à l'extrémité du conidiospore (Figure.10 :b1 et b2). Les conidies sont ellipsoïdales à sub-globuleuses ou ovoïdes, lisses et forment de longues chaînes irrégulières. Cette description rappelle celle du genre *Penicillium* (Hawksworth *et al.*, 1976).

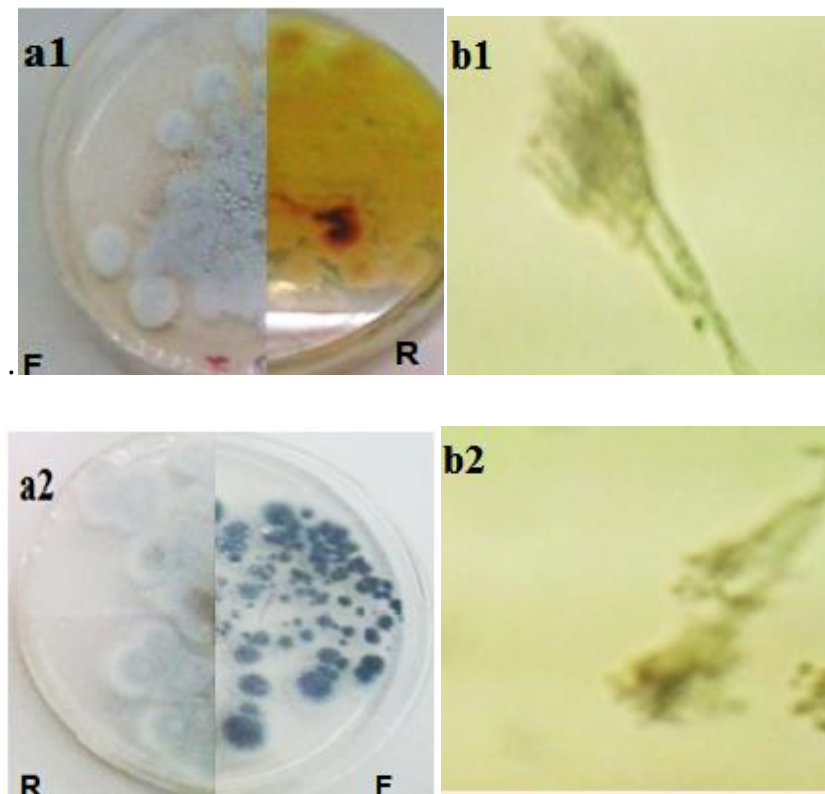


Figure 10.Aspect macroscopique (a1, a2) et microscopique (b1, b2)des *Penicillium* spp.1 et spp. 2 isolés du cognassier et du blé respectivement.

F : fond R : revers

Le *Penicillium* est aussi ubiquiste, il a été identifié en utilisant les caractéristiques morphologiques sur les bulbes d'ail : *Allium sativum* (Valdez *et al.*, 2009).

***Fusarium* spp. 1 et 2**

Ce champignon a été isolé des feuilles de fève où il avait occasionné des lésions noires. La première espèce possède une colonie cotonneuse, blanche, à revers jaune à blanc (Fig.11 :a1). Alors que pour la seconde espèce la colonie est muqueuse, rose, à revers rose foncé (Fig.11 :a2) et les deux espèces sont à croissance rapide (4cm/semaine). Les mycéliums des deux espèces présentent des hyphes fins, cloisonnés qui présentent de nombreuses ramifications, et des macroconidies fusiformes (figure.11 :b1 et b2...), septés, courbées et pointues avec des logettes. Les macroconidies sont formées à partir des monophialides sur des conidiophores courts et ramifiés, et des microconidies abondantes, elliptiques ou cylindriques et solitaires qui sont typiques au genre *Fusarium* (Sedra et Djerbi, 1986).

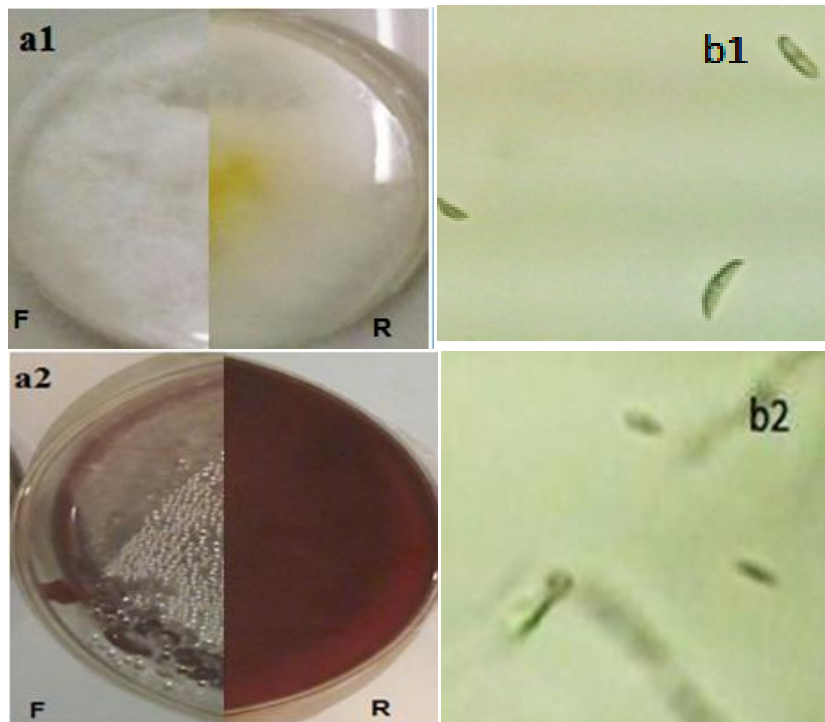


Figure 11. Aspect macroscopique (a1, a2) et microscopique (b1, b2) des *Fusarium* spp.1 et spp.2 isolés de fèves. F : fond R : revers

Ce genre est répandu sur tous les continents. Dans une étude de Fernandez et Chen(2005), la plupart des espèces de *Fusarium* responsables de la fusariose de l'épi ont été isolées à partir des entrenœuds et /ou couronnes de blé décolorés au Saskatchewan (Canada) ; comme il a été signalé chez la même plante en Tunisie (Kammoun *et al.*,2009), ainsi qu'en Croatie sur les grains de blé et les tiges de maïs (Ćosić *et al.*,2010).

En outre, des isolats de *Fusarium* ont été obtenus et identifiés à partir des fabacées : de graines de niébé *Vigna unguiculata*, (Rodreghez et Menenzes, 2006), de lentilles (Akramil *et al.*, 2011), de pois (Sharma, 2011 ; Merzoug *et al.*, 2014). Ce pathogène provoque des maladies de pourriture des racines sur un large éventail de légumes et plantes cultivées, y compris la tomate (Abu Taleb *et al.*, 2011).

***Humicola* spp.**

Ce genre est moins répandu que ceux cités plus haut. La souche d'*Humicola* identifié dans notre étude a été isolée à partir des feuilles de lierre avec les taches marron foncé. Ce champignon est caractérisé par une colonie glabre, de couleur noire foncée, à revers noir (Fig. 12 : a) et avec une croissance rapide (4.5 cm/semaine). Cet isolat possède un thalle hyalin (Fig. 12 : b), à hyphes septés et courts, les conidies grosses et globuleuses, noires, à paroi épaisse et verruqueuses avec de rares phialides. Ces caractères sont ceux décrits pour le genre *Humicola* (Bertoldi, 1976)

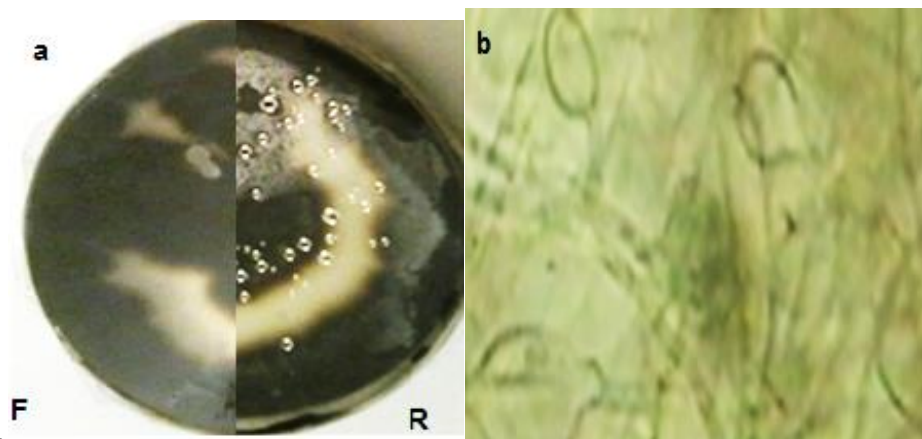


Figure 12 .Aspect d'*Humicola* spp. isolé du lierre.

a : macroscopique b : microscopique F : fond R ;revers

Cependant, certaines études ont rapportés la coexistence des différents champignons identifiés. Dans le gouvernorat de Taif, les genres *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Humicola* ont été identifiés (Abou-Zeid *et al.*, 2007). En revanche, dans le sud-est de l'Algérie, cinq champignons pathogènes : *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp et *Penicilium* sp. ont été rapportés comme infectant les tiges, les folioles et les racines du cultivar du palmier dattier (Lakhdari *et al.*, 2016).

Néanmoins, les espèces *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* ont été incriminés dans certaines maladies fongiques affectant les légumes et les fruits tels que les cucurbitacées, solanacées, fabacées et oleacées (Andersen et Frisvad, 2004 ; Ostry, 2008 ; Agarwal *et al.*, 2011; Chliyah *et al.*, 2014) et chez la plante *Erythrina caffra*, au Nord Ouest du Maroc (Kachkouch *et al.*, 2012).

Ces quatre pathogènes ont été isolés des poacées, comme le blé en Tunisie (Kammoun *et al.*, 2014). Tandis qu'en Inde et au Kenya seulement *Fusarium* et *Aspergillus* ont été retrouvés sur le blé (Thilagam *et al.*, 2018), et sur le maïs respectivement (Owuor *et al.*, 2017) alors que *Fusarium* et *Alternaria* ont été isolés à partir de légumes en Inde (Digambar et Sahera, 2016) .

Introduction

Quelques espèces fongiques d'*Alternaria*, de *Penicillium* et de *Fusarium* ... causent des pertes économiques importantes. Des efforts doivent être déployés pour développer de nouvelles stratégies pour une gestion plus efficace de ces maladies fongiques. Les agents de contrôle biologique pour les maladies des plantes sont actuellement utilisés comme alternatives aux pesticides synthétiques à cause de leur niveau de sécurité et leur impact environnemental. Plusieurs espèces bactériennes comme *Bacillus*, *Pseudomonas* et récemment le *Rhizobium* ont été rapportées comme isolats contrôlant efficacement divers champignons phytopathogènes.

Chao (1990) avait démontré que *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* possédait une activité inhibitrice contre les espèces de *Pythium*, *Fusarium* et *Rhizoctonia*. Auparavant Buonassisi *et al.* (1986) avaient aussi montré que *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* stimulait la croissance de l'haricot et le protégeait contre *F. solani*, ce dernier étant responsable de la pourriture des racines.

De nombreux mécanismes ont été décrits comme étant impliqués dans le mode d'action de ces bactéries rhizobiennes dans le contrôle des pathogènes. Ces mécanismes comprennent la production de sidérophores, la compétition pour les nutriments naturels, la production d'antibiotiques et l'induction des défenses des plantes. En outre, différentes études ont révélé que l'inoculation avec des espèces de *Rhizobium* permettaient une tolérance accrue des plantes à certains phytopathogènes (Rabie, 1998 ; El-Batanony *et al.*, 2007). Le présent chapitre s'articule autour de l'utilisation des espèces de *Rhizobium* à ces fins.

IV.1.Méthodes

IV.1.1.Tests d'antagonisme *in vitro*

Le test d'antagonisme a été effectué selon la technique décrite par Landa *et al.* (1997) et Idris *et al.* (2007) ; entre les microorganismes isolés : les Rhizobia d'une part, et les champignons provenant de différents hôtes d'autre part. Un disque du champignon provenant d'une culture de 7 jours est déposé au centre de la boîte de Pétri. De même un disque de bactéries provenant d'une culture de 72h est déposé de manière équidistante (4cm) dans les quatre coins de la boîte. Celles-ci sont ensuite incubées à 28 °C pendant 7 jours. L'effet antifongique des bactéries antagonistes est caractérisé par une inhibition partielle ou totale de la croissance radiale du champignon . Les boîtes de Pétri sans bactéries et ne contenant que les disques de champignons ont servi de témoin. Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique a été calculé en utilisant la formule décrite par Whipps (1987) :
où le pourcentage d'inhibition (%)=(R-r /R)×100.

Où **r** est le rayon de la colonie fongique en présence de la colonie bactérienne et **R** le rayon de la colonie fongique témoin.

IV.1.2. Activité antagoniste *in vivo*

Tous les isolats bactériens qui ont induit plus de 50% d'inhibition de croissance fongique *in vitro* ont été sélectionnés pour le test *in vivo*. L'action des différents champignons pathogènes et de l'agent de lutte biologique a été évaluée en pots sur les légumineuses (petit pois, pois chiche, fève et lentille). Les graines des légumineuses ont été stérilisées comme précédemment (chapitre II), puis trempées dans de l'eau distillée pendant une heure. C'est alors qu'elles sont inoculées par les souches bactériennes à raison de 2 ml (10⁸ufc/ml) pour quatre graines, qui sont ensuite transférées en pots contenant du sol stérile (autoclavé deux fois à 121° pendant 20min). Les pots sont irrigués régulièrement selon le besoin. Après 21 jours, les plantes sont inoculées par une suspension de spores fongiques (4x10⁶spore/ml), en déposant trois gouttes sur trois feuilles de chaque plante. Les témoins sont uniquement inoculés par les champignons. Une incubation de une à deux semaines est nécessaire pour le développement des symptômes. La virulence est alors évaluée de 0 à 4 selon l'apparence de la plante (Omar *et al.*, 2006).

0 : plante saine (0%), 1 : léger jaunissement (25%), 2 : jaunissement important (50%), 3 : plante fanée (75%), et 4 : plante morte (100% ; Omar *et al.*, 2006).

IV.1.3. L'antagonisme sur graine en boîte de Pétri

Une analyse *in vitro* précédemment décrite par Mesterházy *et al.* (1983) et Brennan *et al.* (2003) a été employée pour examiner la capacité des isolats de *Rhizobium* à inhiber les champignons au cours de la germination des graines. Pour ce fait, on a utilisé des graines de fève, de petit pois, de lentille et de pois chiche stérilisés puis les graines sont enrobées par passage dans 2 ml de la suspension bactérienne (10^8 ufc/ml). Un total de quatre graines ont été aseptiquement placées en boîte de Pétri avec du papier filtre stérile imbibé par de l'eau distillée stérile et incubées à 28°C pendant 24h. Ensuite les graines ont été inoculées avec une suspension sporale (4×10^6 spores/ml). Les témoins sont uniquement inoculés par les champignons. Après 7 jours d'incubation à 28°C, le degré de nécrose est noté de 0 à 4 selon Rafin et Terilly (1995).

0 : plantule saines (0%), 1 : nécrose des extrémités (25%), 2 : racines atrophiées (50%), 3 : diminution des cotylédons (75%) et 4 : nécrose sévère (100%).

Tous les essais ont été réalisés en triplicata.

IV.1.4. Analyse statistique

Les données ont été analysées par l'analyse de la variance unidirectionnelle (ANOVA) pour comparer les moyennes de 3 traitements / doses ou plus, pour estimer les effets des Rhizobia sur l'inhibition des champignons. Le test avec $P < 0.5$ a été considéré comme statistiquement significatif. Ceci a été suivi d'un test de Fisher lorsque le nombre de traitements était inférieur à 5 et supérieur à 2 (traitement des feuilles et des semences).

IV.2. Résultats et discussion

IV.2 .1.Activité antagoniste *in vitro*

La plupart des souches ont un effet inhibiteur sur tous les champignons testés. Le tableau 8, donne une première idée sur le comportement de chacun des 13 isolats de *Rhizobia* vis-à-vis des souches fongiques. Le pourcentage d'inhibition le plus élevé (de 90 à 96%) est observé envers *Alternaria* spp.2, *Penicillium* spp.2, *Cladosporium* spp. et *Humicola* spp. Et avec un pourcentage de 97% envers *Fusarium* spp.2, tandis que l'absence d'inhibition (0%) est observée en présence de *Penicillium* spp.2 avec une souche de petit pois et deux souches de pois chiche. Ainsi le plus bas pourcentage d'inhibition obtenu était vis-à-vis de *Cladosporium* spp. et la souche de *Penicillium* spp.1 en présence de la souche A6 de *Rhizobium* avec 16 et 22% du pouvoir inhibiteur respectivement.

La souche F3 issue des fèves, a révélé une diminution significative de la croissance de toutes les espèces fongiques par un pourcentage moyen de 70%, par contre l'effet inhibiteur de la souche Pd issue du petit pois était seulement de 42%.

D'un autre côté, les meilleurs pourcentages de réduction de la croissance fongique par tous les *Rhizobia* ont été observés avec *Alternaria* spp.2 et *Humicola* spp. (77%) alors que les plus faibles pourcentages ont été observés avec *Fusarium* spp. 2 et les *Penicillium* avec 41% à 44%. Pour les souches A6 et F isolées d'*Hedysarum* l'inhibition de *Penicillium* spp.2, *Humicola* spp. et *Fusarium* spp.1 s'est échelonnée de 52 à 95%. Le pourcentage moyen d'inhibition de toutes les souches fongiques par les isolats rhizobiens est de 60%.

Tableau 8. Pourcentage d'inhibition des champignons par Rhizobia

Bacterie champignons	A6	Sam12	F	F ₃	F _{2m}	Fmd	P	P ₃	Pd	Pcx	Pcd	Pc ₃	L	PMIB
<i>Alternaria</i> spp.1	63	72	61	65	55	65	66	65	69	62	74	70	58	65
<i>Alternaria</i> spp.2	75	87	72	95	90	82	77	77	77	75	70	50	85	77
<i>Fusarium</i> spp. 1	62	67	85	72	62	67	62	75	62	65	50	87	80	68
<i>Fusarium</i> spp. 2	50	50	52	35	50	52	57	25	97	32	50	37	15	41
<i>Penicillium</i> spp.1	22	55	37	44	44	77	20	40	33	55	44	37	55	43
<i>Penicillium</i> spp.2	95	24	52	60	20	44	84	96	0	0	72	0	32	44
<i>Cladosprium</i> spp.	16	70	29	91	91	16	37	25	33	58	70	91	83	54
<i>Humicola</i> spp.	85	75	75	95	92	90	92	82	0	77	80	75	92	77
<i>Aspergillus</i> spp.	67	75	59	78	72	75	60	40	70	70	74	81	69	68
PMIC	59	63	63	70	64	63	61	58	42	54	64	58	63	60

PMIC: pourcentage moyen d'inhibition de chaque champignon ; PMIB: pourcentage moyen d'inhibition de chaque bactérie ; F₃ , F_{2m} et Fmd : souches issues de la fève ; P , P₃ et Pd : souches issues du petit pois ; Pcx, Pcd, Pc₃ et Sam12 : souches issues du pois chiche ; L souche de lentille ; A6 et F : souches issues de *Hedysarum*.

En réalisant un test d'antagonisme Essalmani et Lahlou (2002) avaient montré que *R. leguminosarum* possédait une action létale sur les conidies de *Fusarium oxysporum*. D'autre part, en examinant 21 souches de *Rhizobium* issues du pois chiche, Arfaoui *et al.* (2006) ont montré que 19 inhibaient *in vitro* *Fusarium oxysporum*. Parmi ces souches, 14 ont montré plus de 30% d'inhibition, alors que quatre souches ont montré une inhibition supérieure à 50%.

En étudiant l'activité des Rhizobia, Hmissi *et al.* (2011) ont prouvé que celles-ci inhibaient plus de 60% des *Fusarium* de blé. Dans une autre étude 36% des *Fusarium* sp et 54% d'*Alternaria alternata* sont inhibés par des *Rhizobium* (Sharif *et al.*, 2003), alors qu'un taux d'inhibition de 97% envers *Fusarium* et 90% envers *Alternaria* a été observé dans la présente étude.

Les mécanismes de base derrière une telle inhibition et la suppression de la maladie peuvent être dus à la compétition, l'antibiose, le parasitisme et la résistance induite par les isolats antagoniques efficaces de *Rhizobium* (Kloepper *et al.*, 1992; Perdomo *et al.*, 1995; Ongena *et al.*, 1999; Siddiqui *et al.*, 2000; Sharif *et al.*, 2003). C'est ainsi que l'ISR a été obtenu par co-inoculation de *Pseudomonas fluorescens* et *Rhizobium leguminosarum* chez la fève (*Vicia faba* L.) contre le virus de la mosaïque jaune (El badry *et al.*, 2006).

L'inhibition de la croissance mycelienne des champignons *in vitro* par Rhizobia étaient probablement dues aux métabolites libérés par ces bactéries. Dans la section précédente on a démontré que les Rhizobia examinés produisaient des siderophores et des protéases et peut être aussi des lipopolysaccharides. Ces métabolites ont été impliqués dans l'inhibition des champignons phytopathogènes dans plusieurs études, où *Mesorhizobium loti* MP6 sécrète un sidérophore de type hydroxamate, la souche a montré un fort effet antagoniste contre *Sclerotinia sclerotiorum*, un pathogène de la pourriture blanche de *Brassica campestris*. La croissance de *S. sclerotiorum* a été inhibée de 75% après une incubation prolongée. De plus, une diminution drastique (99%) de l'incidence de la pourriture blanche a été observée en raison de l'application de *Mesorhizobium loti* MP6 (Chandra *et al.*, 2007). Aussi parmi les dix souches de *Bradyrhizobium* (*Arachis*) sp. issues de l'arachide, celles qui sécrètent les sidérophores *in vitro*, ont montré une activité antagoniste contre *Macrophomina phaseolina* (Deshwal *et al.*, 2003b).

De même Kumar *et al.* (2006) ont montré que sur les cinq isolats issus de la légumineuse *Mucuna pruriens*, les souches *Sinorhizobium* MPR3 et MPR4, produisant des sidérophores inhibaient les pathogènes fongiques, *M. phaseolina* et *F. oxysporum*. Arora (2001) a prouvé que deux isolats de *Rhizobium* inhibaient la croissance de *Macrophomina phaseolina* chez l'arachide par production de siderophores.

D'autre part, cette activité antifongique a aussi été rapportée comme un parasitisme direct par les protéases agissant comme enzymes dégradant les parois fongique (Mishra *et al.*, 2006).

Dans une étude *in vitro* Izallalen (1997) avait montré que *Rhizobium* a une activité antagoniste a l'encontre de *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* et *Alternaria*. Ces antagonistes (*Rhizobium*) manifestent des actions inhibitrices et des modes d'actions différents vis a vis de ces pathogènes, soit par la production des antibiotiques ou bien par une autre substance antifongique ou encore une compétition entre eux. Il est évident que le *Rhizobium* sp. produit des principes qui ont des effets antifongiques sur les champignons phytopathogènes. Omar et Abd alla (1998) ont trouvé que Vingt et une souches de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* ont supprimé la croissance mycélienne *in vitro* de trois champignons pathogènes : *Fusarium solani*, *Macrophomina aphasolina* et *Rhizoctonia solani* ; *Rhizobium leguminosarum* isolé de l'haricot était l'isolat le plus efficace sur trois genres fongiques avec un pourcentage d'inhibition de 14.65 à 16.03% pour *Rhizoctonia solani*, 14.62 à 30.35% pour *Pythium ultimum* et 14.58 à 29.75% pour *Fusarium oxysporum* (Ozkoc et Deliveli, 2001). D'autre part, *R.leguminosarum viciae* est responsable du controle biologique de la pourriture radiculaire occasionnée par *Pythium* chez la betterave à sucre (Bardin *et al.*, 2004).

Hossain et Shakhawat (2007), ont prouvé que les souches de *Rhizobium* testées pouvaient empêcher la croissance de *Fusarium oxysporum* et *Rhizoctonia solani*. Par ailleurs, *Rhizobium meliloti* a empêché la croissance de *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium solani* *in vitro* (Ehteshamul-Haque et Ghaffar, 2008). Dans une étude postérieure Hemissi *et al.* (2011) ont montré que des souches de *Rhizobium* isolés du pois chiche inhibaient la croissance de *Rhizoctonia solani* *in vitro* et réduisaient sa croissance (50 à 70%) avec développement d'un halo d'inhibition qui serait dû à la sécrétion de métabolites fongistatiques.

Ceci est accompagné par un changement de la couleur du mycélium entre l'extrémité et le centre de la colonie de *Rhizoctonia solani* ; où l'observation microscopique révèle une déformation de son apex. Un résultat similaire est observé dans notre étude avec la souche F2m issue de la fève contre *Cladosporium* spp. En même temps, Ozgonen et Gulcu (2011) ont montré que *Rhizobium leguminosarum* a un effet antagonique sur *Fusarium oxysporum* et *Phytophthora megasperma* par 66.3 et 62.1% d'inhibition respectivement. Cependant, *Rhizobium leguminosarum*(Sam12) dans la présente étude a empêché la croissance de *Fusarium* spp.de 50 à 67%.

De la même manière un isolat de *Rhizobium* a empêché fortement la croissance d'*Ascochyta pisi*, modérément celle de *Botrytis cinerea* et légèrement celle de *Fusarium graminearum* (Akhter, 2014), mais également la croissance de *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger* (Vaishali et al., 2014). Une étude récente *in vitro*, a révélé que certains *Rhizobium* isolés de certaines légumineuses (*Psophocapus tetragonolobus*, *Cajanus cajan*, *Canavalia gladiata*, *Sesbania sesban*, *Lablab purpureus*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Vigna umbelata*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus*) réduisaient efficacement la croissance de *Macrophomina phaseolina* par un pourcentage d'inhibition de 50 à 88% par rapport au contrôle (Sagolshemcha et al., 2017).

IV.2.2.Activité antagoniste de *Rhizobium* in vivo

Les résultats indiquent que presque 75 % des plants de pois chiche et de fèves inoculés par des *Rhizobia* isolés et inoculés sur les mêmes plantes respectivement sont saines sans aucun symptôme (Fig. 13 et 14) en présence d'*Alternaria* spp.1. Alors que, 20% des plants de pois chiche ont montré un jaunissement provoqué par *Aspergillus* spp.et *Cladosporium* spp. ; et également 25% de noircissement chez la fève observé avec *Fusarium* spp.1, *Penicillium* spp.2 et *Humicola* spp. Cependant, 5% de flétrissement a été observées chez le pois chiche par *Alternaria* spp.2 et *Fusarium* spp.1.

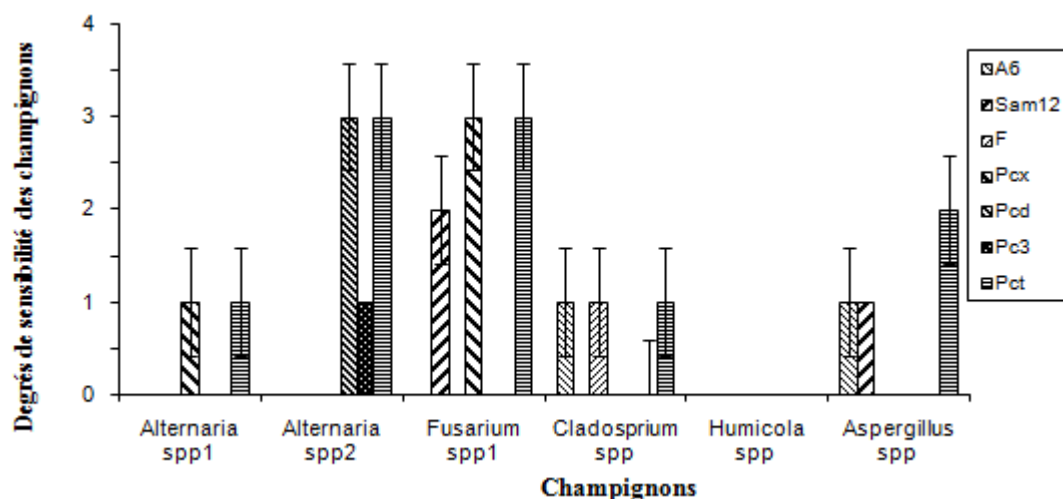


Figure 13. Effet de Rhizobia sur l'incidence du flétrissement de pois chiche infecté par les champignons

0 : plante saine, 1 : léger jaunissement, 2 : jaunissement important, 3 : plante fanée, 4 : plante morte
 Pcx, Pcd et Pc3 : souche de pois chiche ; A6, F et Sam12 : souche de référence de *Hedysarum*, et pois chiche respectivement ; Pct : plante témoin de pois chiche.

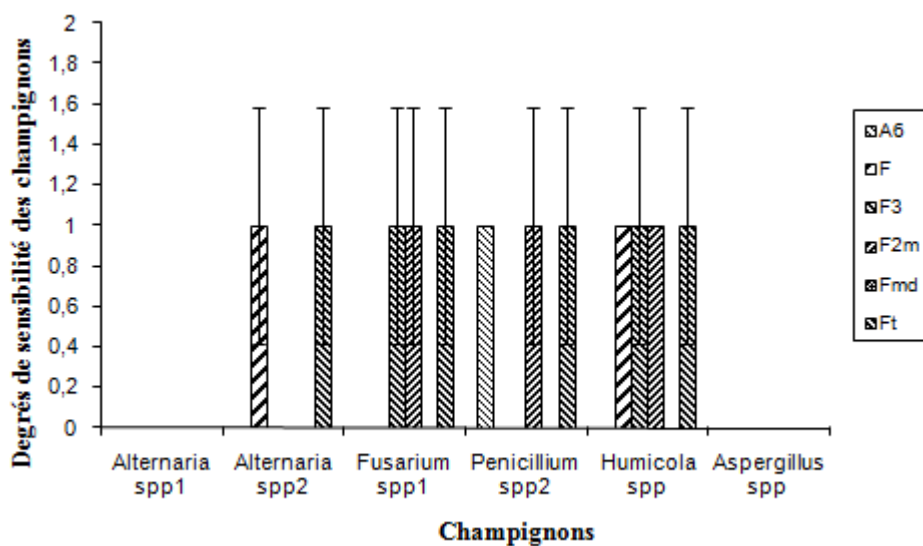


Figure 14. Effet de Rhizobia sur l'incidence du flétrissement de fève infecté par les champignons.

0 : plante saine, 1 : léger jaunissement, 2 : jaunissement important, 3 : plante fanée, 4 : plante morte.
 F3, F2m et Fmd : souche de fève ; A6 et F : souches de référence de *Hedysarum*; Ft : plante témoin de fève.

Dans ces essais, seulement 35 % de *Rhizobia* du petit pois ont complètement protégé les plantes dont ils sont issus, en présence d'*Aspergillus* spp. (Fig.15). Tandis que 45 % des plants ont présenté un jaunissement provoqué par *Alternaria* spp.1, *Fusarium* spp.1 et *Humicola* spp. Et enfin, 20% des plants sont flétris par *Alternaria* spp.2 et *Humicola* spp. Cependant les deux souches de référence A6 et F isolées d'*Hedysarum* ont donné les meilleurs résultats chez le pois chiche, la fève et les lentilles mais dans le cas du petit pois un flétrissement a été observées en présence d'*Alternaria* spp.2, *Humicola* spp. et de *Penicillium* spp.2.

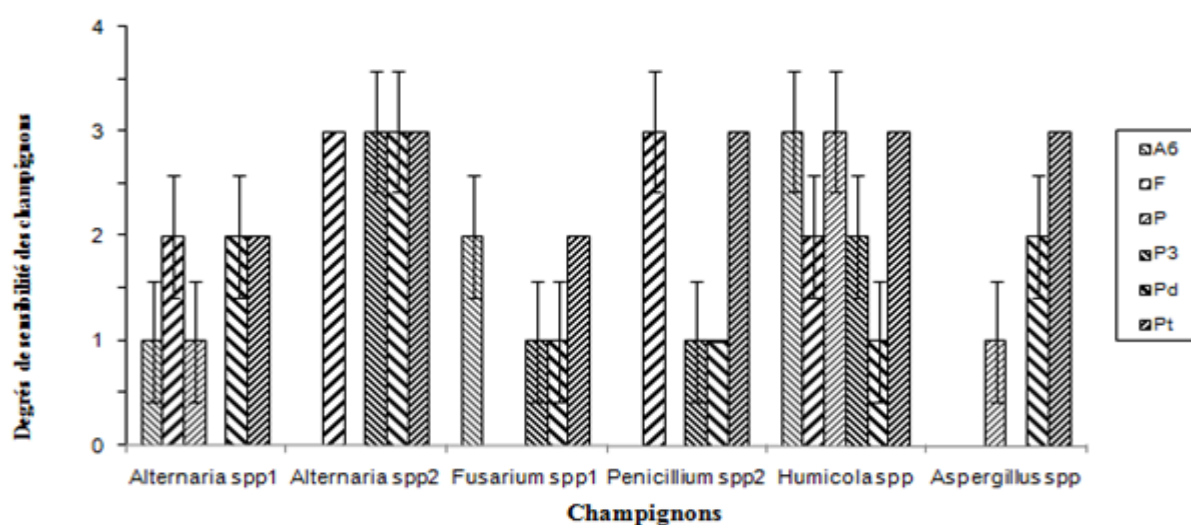


Figure 15. Effet de *Rhizobia* sur l'incidence du flétrissement de petit pois infecté par les champignons

0 : plante saine , 1 : léger jaunissement , 2 : jaunissement important, 3 : plante fanée, 4 : plante morte
P, P3 et Pd: souche de petit pois ; A6 et F: souche de référence de *Hedysarum*, Pt: plante témoin de petit pois .

Plusieurs études ont rapporté l'effet bénéfique de *Rhizobium* sur la croissance des plantes et la réduction de l'incidence des maladies fongiques (Smiley *et al.*, 1986; Hussain *et al.*, 1990). Shaban et EL-Bramawy (2011) ont indiqué que le traitement des graines de fève par *Rhizobium leguminosarum* réduisait significativement différents agents pathogènes fongiques tels que : *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* et *Sclerotium rolfsii*. En effet, *Rhizobium* réduit le flétrissement fusarien du pied (Hossain *et al.*, 2000), du pois chiche (Hossain *et al.*, 2000; Akhtar et Siddiqui, 2007; Arfaoui *et al.*, 2007), du haricot (Akhtar et Siddiqui, 2007; Arfaoui *et al.*, 2007), et le flétrissement du pois chiche et de l'haricot (Arfaoui *et al.*, 2006; Khalequzzaman et Hossain, 2007).

En outre, les résultats de Hemissi *et al.* (2011) ont rapporté que *Rhizoctonia solani* est inhibé par cinq souches de *Rhizobium* issues du pois chiche sans symptômes, par contre quelques souches de *Rhizobium* ont des pourcentages d'inhibition variant de 60 à 87%. *Rhizobium leguminosarum* par contre, a réduit la sévérité de *Phytophthora megasperma*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* et *Sclerotium rolfsii* avec 52.9, 50, 67.9 et 52% respectivement (Ozgonen et Gulcu,2011).

En plus de leurs capacités de réductions de l'index de la maladie et de la putréfaction des racines ; les Rhizobia ont amélioré les pourcentages de germination des plants de soja en présence de *Fusarium solani* et *Macrophomina phaseolina* (Al-Ani *et al.*, 2012).

Dans une expérience de terrain, l'utilisation de trois isolats rhizobiens sauvages de *R. leguminosarum* en association avec des champignons mycorhiziens arbusculaires (AM) appliqués en traitements individuels ou combinés, au sol naturellement infesté de champignons pathogènes: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. et *F. solani*, avaient réduit la fonte des semis chez la féverole (Mazen *et al.*, 2008). Plus tard, Yaqub et Shahzad(2011) ont prouvé que l'utilisation de *Bradyrhizobium* sp. et *Rhizobium* sp. comme agents de lutte biologique dans un sol infesté par de *Sclerotium rolfsii*, pouvait réduire l'indice de colonisation racinaire accompagné d'une augmentation de la croissance des plantes.

La meilleure protection contre la maladie dans notre étude atteignant presque 90% était obtenue avec l'isolat de la lentille sur les mêmes plantes (Fig.16). l'indice de flétrissement était de 2, quand la plante de lentille est inoculée par le pathogène et traitée avec *Rhizobium* sp.(Akhtar *et al.*,2008).

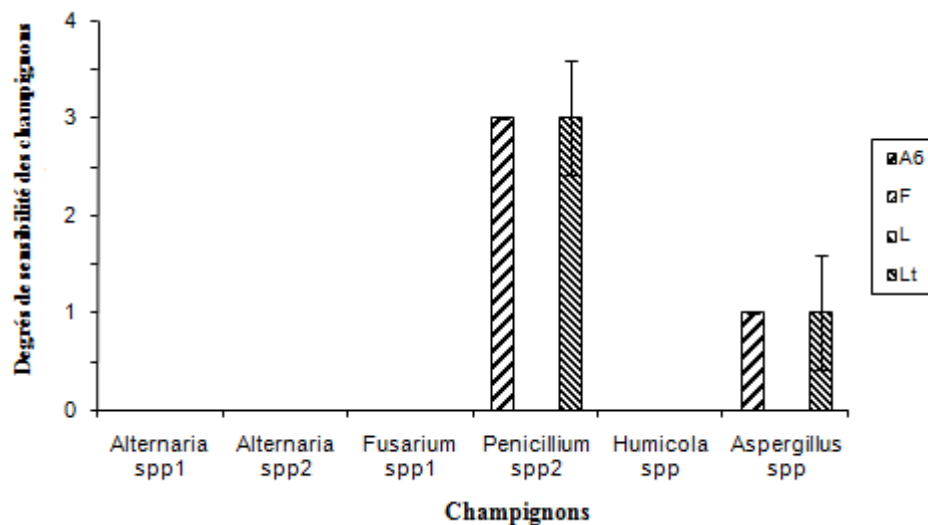


Figure 16. Effet de Rhizobia sur l'incidence du flétrissement de lentille infecté par les champignons

0 : plante saine, 1 : léger jaunissement, 2 : jaunissement important, 3 : plante fanée, 4 : plante morte
A6 et F: souche de référence de *Hedysarum*; L: souche de lentille ; Lt: plante témoin de lentille.

La souche F3 issue des fèves inhibe la croissance d'*Alternaria* spp.2 et *Humicola* spp. avec plus de 90% *in vitro*, et également cette souche bactérienne est efficace *in vivo*. Pc3a montré des résultats similaires envers *Cladosporium* spp. Cependant, l'isolat P issu du petit pois est plus efficace *in vitro* qu'*in vivo*. Contrairement à l'isolat Pd qui est plus efficace *in vivo* qu'*in vitro*. Les expériences d'Arfaoui *et al.* (2006) ont indiqué que quatre isolats de *Rhizobium* étaient efficace *in vitro* mais étaient complètement ou partiellement inefficaces *in vivo*. D'autre part, ils ont observés que deux isolats sont mieux *in vivo* qu'*in vitro*. Nos résultats sont en accord avec l'idée que les micro-organismes antagoniques efficaces *in vivo* ne sont pas nécessairement les plus efficace *in vitro* et *vice versa* (Chérif *et al.*, 2002).

IV.2.3. Antagonisme sur graines *in vitro*

Les isolats de *Rhizobium* exercent un effet significatif sur la germination du pois chiche (Fig. 17), du petit pois (Fig.18), de la fève et des graines de lentille inoculées avec la culture fongique. L'inhibition de la croissance fongique sur les graines inoculées par *Fusarium* spp1, *Cladosporium* spp. et *Humicola* spp. varie de 16 à 90 %, avec une meilleure suppression fongique observée chez la fève (90% ; Fig.20) et les lentilles (81% ; Fig.19).

Cependant, La nécrose de ces graines varie de 10 à 45% en présence de *Fusarium* spp.2, de *Penicillium* spp. 1, *Penicillium* spp.2 et d'*Aspergillus* spp.

Il a été constaté que les isolats de *Rhizobium* ont un effet significatif sur la germination des graines de pois chiche inoculées par *Rhizoctonia solani* avec un pourcentage variant entre 40 et 90% ; et réduisent 80% des nécroses des racines (Hemissi *et al.*,2011). Cependant, peu d'études ont été effectuées sur l'effet des souches de *Rhizobium* sur la germination des graines *in vitro* et la suppression des pathogènes.

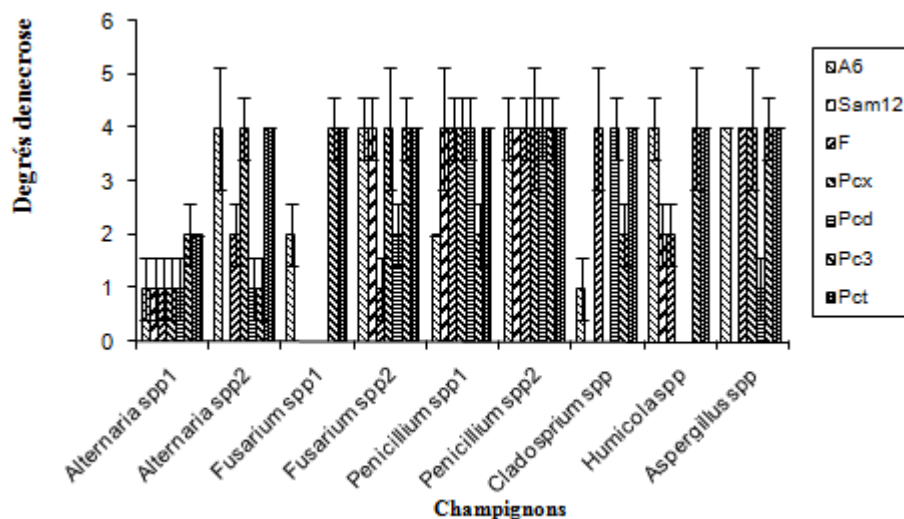


Figure 17. Suppression fongique par inoculation de Rhizobia sur graines de pois chiche

0 : plantule saines, 1 : nécrose des extrémités, 2 : boutures des racine, 3 : diminution des cotylédons, 4 : nécrose sévère.

A6, F et Sam12: souches de référence de *Hedysarum* et pois chiche ; Pcx, Pcd et Pc₃: souche de pois chiche ;

Pct: graine de contrôle de pois chiche .

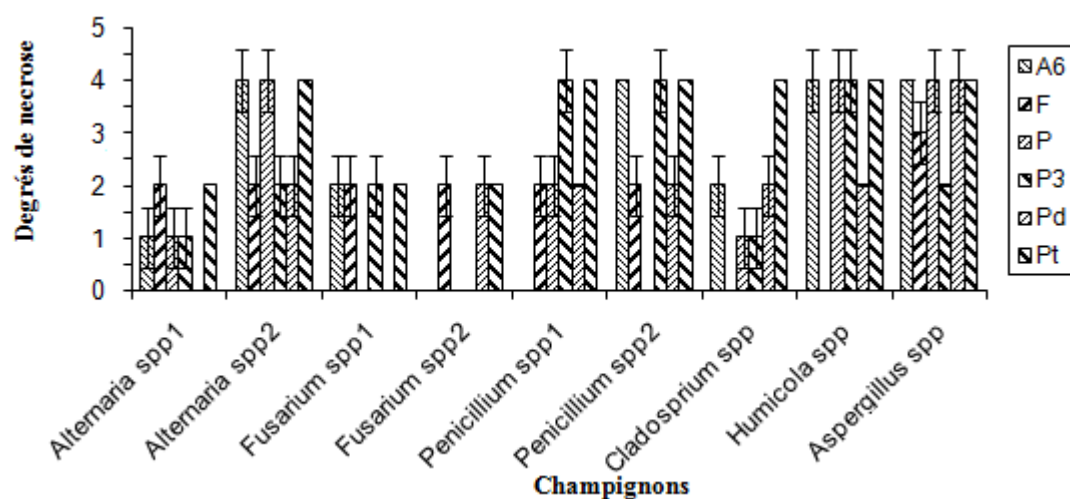


Figure 18. Suppression fongique par inoculation de Rhizobia sur graines de petit pois

0 : plantule saines, 1 : nécrose des extrémités, 2 : boutures des racine, 3 : diminution des cotylédons, 4 : nécrose sévère.

A6 and F: souche de reference de *Hedysarum*; P, P₃ et Pd: souche de petit pois; Pt: souche de control de petit pois .

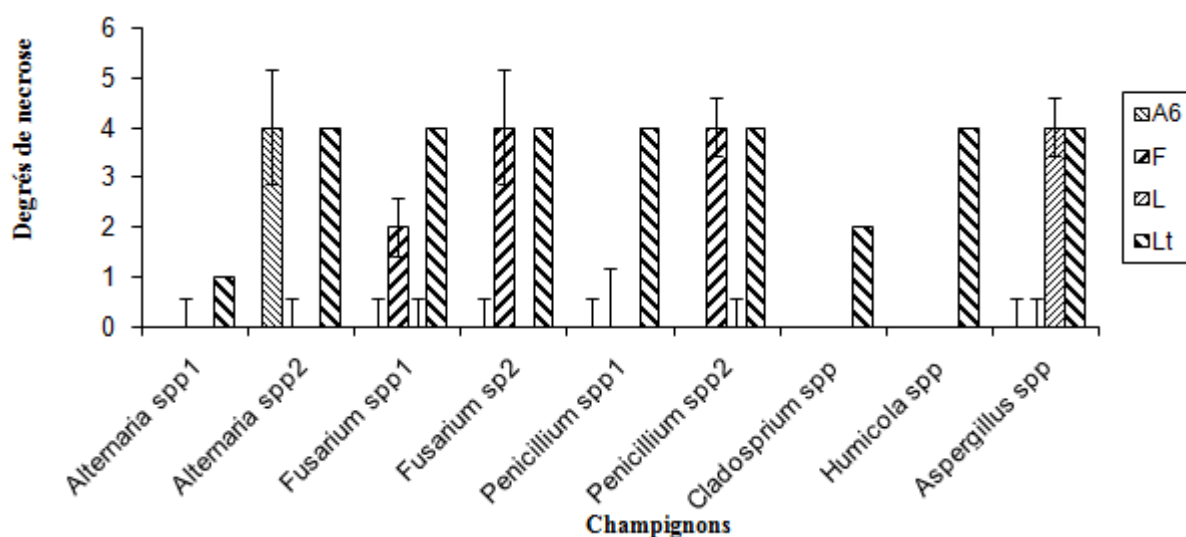


Figure 19. Suppression fongique par inoculation de Rhizobia sur graines de lentille.

0 : plantule saines, 1 : nécrose des extrémités, 2 : boutures des racine, 3 : diminution des cotylédons, 4 : nécrose sévère.

L: souche de lentille ; A6 et F: souche de reference de *Hedysarum*, Lt: graine de control de lentille.

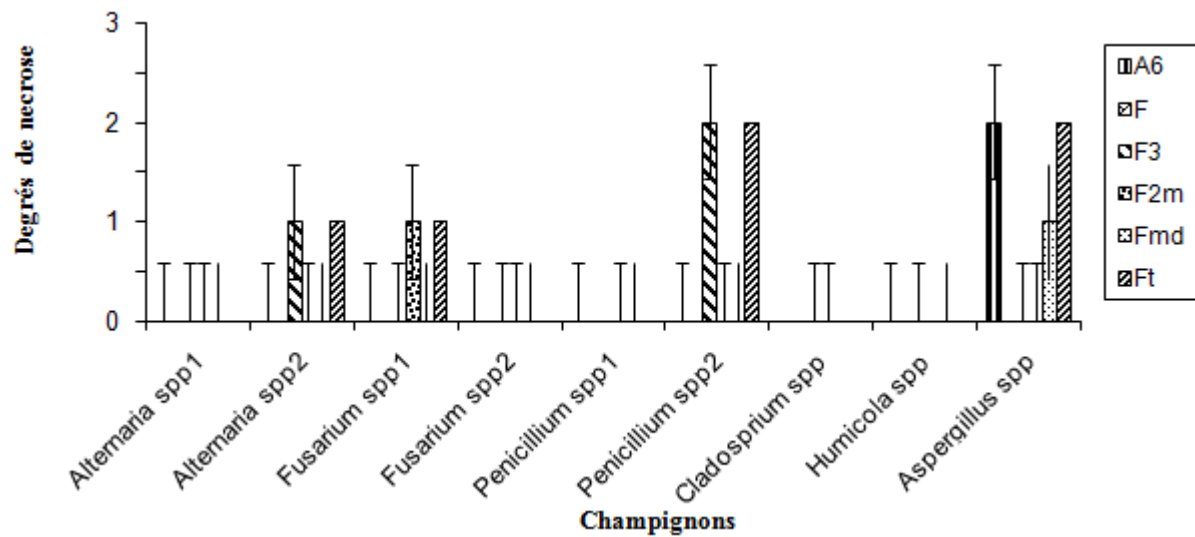


Figure 20. Suppression fongique par inoculation de Rhizobia sur graines de fève.

0 : plantule saines, 1 : nécrose des extrémités, 2 : boutures des racine, 3 : diminution des cotylédons, 4 : nécrose sévère.

A6 et F: souche de référence de *Hedysarum*; F₃, F_{2m} et Fmd : souche de fève ;Ft: graines de control de fève.

Conclusion générale et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse visaient l'étude d'une stratégie de lutte biologique envers les champignons isolés des plantes infectées, par l'exploitation de l'effet bénéfique de certains Rhizobia, dont les caractéristiques phénotypiques sont nécessaires pour l'identification et en prospectant leurs molécules antifongiques afin de déterminer leurs rôles envers les champignons. A cet effet, 13 souches de Rhizobia isolées de cinq légumineuses de trois régions d'Algérie ont été testées sur 9 souches de champignons issus de feuilles et de tiges de plantes infectées. En effet, la suppression des espèces fongiques a varié selon les souches de Rhizobia qui présentaient des degrés d'inhibition différents. La souche de *Rhizobium* en provenance de M'sila(F3) a montré la plus importante capacité de suppression. Huit souches de Rhizobia sur 13 ont un pouvoir de suppression de plus de 60% de la croissance des champignons. La production de substances antifongiques telles que les protéases, ainsi que celle des sidérophores peuvent être à l'origine de ce pouvoir de suppression des champignons qui infectent les plantes par les Rhizobia.

La plus importante inhibition de la croissance fongique a été de 90 à 96% envers les isolats d'*Alternaria* spp.2, *Penicillium* spp.2, *Cladosporium* spp.et *Humicola* spp. avec une seule souche à 97% envers *Fusarium* spp.2. Cependant, *in vivo* la souche de *Rhizobium* ayant montré la meilleure inhibition fongique (90%) est celle issue des lentilles. Toutefois, l'application des isolats de *Rhizobium* réduit de manière significative l'effet des champignons sur graines.

Au terme de cette étude, les souches de Rhizobia issues de différentes régions nodulant la fève, le pois chiche, le petit pois et la lentille peuvent faire l'objet de souches d'inoculation des cultures exposées à des infections par des champignons. Les mécanismes d'action impliqués dans l'antagonisme observés n'ont pas tous été élucidés. En effet, les essais *in vitro* et *in vivo* ont démontré que certains isolats (Pd, Pc3 et Pcx) qui ne produisaient pas de protéases ont montré une très faible activité antifongique envers certains isolats, d'où l'intérêt d'identifier les molécules impliqués dans cet activité même faible. L'exploitation de nos résultats dans de prochains travaux de recherches serait intéressante, et la continuation d'abord par l'identification moléculaire des bactéries et l'extraction et l'identification des substances antifongiques s'avère d'un très grand intérêt.

Conclusion générale

Notre pays doit mettre en avant, les études de biocontrôle qui visent l'introduction des souches antagonistes de *Rhizobia* ou d'autres genres bactériens pour une lutte biologique et une protection de l'environnement. Nos résultats sont encourageants, mais divers travaux complémentaires restent à faire pour développer des formulations efficaces à base de *Rhizobia*, afin de l'employer à grande échelle et pourquoi pas le commercialiser. Comme c'est le cas des biofongicides déjà utilisés et commercialisés : Rootshield® à base de *Trichoderma harzianum*, Mycostop® à base de *Streptomyces griseoviridis*, et plus récemment, Botector à base d'*Aureobasidium pullulans* (RAP ,2016).

Références bibliographiques

Abbes Z, Sellami F, Amri M, Kharrat M. Effect of Sowing Date on *Orobanche foetida*, Infection and Seed Yield of Resistant and Susceptible Faba Bean Cultivars. *Acta Phytopathol Entomol Hung*. 2010; 45: 267-275.

Abdelaziz RA, Al-Barakah FN, Al-Asmary HM. Genetic identification and symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti* indigenous to Saudi Arabian soils. *Afr J Biotechnol*. 2008; 7: 2803-2809.

Abdelgadir AH, Alexander M. Procedures to enhance heat resistance of *Rhizobium*. *Plant Soil*. 1997;188: 93-100.

Abera T, Semu E, Debele T, Wegary D, Kim H. Determination Soil *Rhizobium* Populations, Intrinsic Antibiotic Resistance, Nodulation and Seed Yield of Faba Bean and Soybean in Western Ethiopia. *World J Agric Sci*. 2015; 11 (5): 311-324.

Abou-Zeid AM, Altalhi AD, Abd El-Fattah RI. Fungal control of pathogenic fungi isolated from wild plants in Taif Governorate, Saudia Arabia. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 2007; 66 (3-4): 90-96.

Abu Taleb, Amira M, El-Deeb K, Fatimah O, Al-Otibi. Assessment of antifungal activity of *rumex vesicarius* L. and *ziziphus spina-christi* (L.) wild extracts against two phytopathogenic fungi. *Afr J Microbiol Res*. 2011; 5: 1001-1011.

Agarwal T, Malhotra A, Trivedi PC, Biyani M. Biocontrol potential of *Gliocladium virens* against fungal pathogens isolated from chickpea, lentil and black gram seeds. *J Agric Tech*. 2011; 7(6): 1833-1839.

Ahmad MH, Eaglesham ARJ, Hassouna S. Examining serological diversity of “cowpea rhizobia” by the ELISA technique. *Arch Microbiol*. 1981; 130: 281-287.

Ahmad MH, RafiqueUddin M, Mclaughlin W. Characterization of indigenous rhizobia from wild legumes. *FEMS Microbiol Lett*. 1984; 24:197-203.

Akhtar MS, Shakeel, Siddiqui ZA. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. *Turkish J Biol*. 2008; 34: 1-7.

Références Bibliographiques

Akhtar MS, Siddiqui ZA. Effects of *Glomus fasciculatum* and *Rhizobium* spp. On the growth and root rot disease complex chickpea. Arch Phytopathology Plant Protect. 2007; 40: 37-43.

Akhter SH. Interactions between *Rhizobium*, antagonistic bacteria and fungal pathogens in faba bean. Master's Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Forest Mycology and Plant Pathology. Swedish; 2014 :1-53.

Akrami M, Golzary H, Ahmadzadeh M. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling Fusarium rot of lentil. Afri J Biotech. 2011 ; 10(14) : 2653-2658.

Al-Ani RA, Adhab MA, Mahdi MH, Abood HM. *Rhizobium japonicum* as a biocontrol agent of soybean root rot disease caused by *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina*. Plant Prot Sci. 2012; 48(4): 149- 155.

Alexandre A, Laranjo M, Oliveira S. Natural populations of chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods. Microb Ecol. 2006; 51:128-136.

Amarger N, Macheret V, Laguerre G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris*. Int J Syst Bacteriol. 1997; 47: 996-1006.

Andersen B, Frisvad JC. Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. Agric Food Chem. 2004; 52: 7507- 7513.

Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot RR, Lalande. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus Sativus* L.). Plant Soil. 1998; 204: 57-67.

Ardley JK, Parker MA, De Meyer SE, Trengove RD, O'Hara GW, Reeve WG, Yates RJ, Dilworth MJ, Willems A, Howieson JG. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. Are alpha proteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. Int J Syst Evol Microbiol. 2012 ; 62: 2579-2588.

Références Bibliographiques

- Arfaoui A, El Hadrami A, Mabrouk Y, Sifi B, Boudabous A, El Hadrami I, Daayf F, Cherif M. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. Plant Physiol Biochem. 2007; 45: 470-479.
- Arfaoui A, Sifi B, Boudabous A, El-Hadrami I, Cherif M. Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f.sp. , The causal agent of *Fusarium* wilt of Chickpea. J Plant Patho. 2006;88:67-75.
- Arora NK, Kang SC, Maheshwari DK. Isolation of siderophore producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. Curr Sci. 2001; 81: 673-677.
- Athar L. Drought tolerance by lentil rhizobia (*Rhizobium leguminosarum*) from arid and semiarid areas of Pakistan .1998 ; 26 :38-42.
- Baakza A, Vala AK , Dave B, Dube HC. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. J Exper Mar Biol Ecol. 2004; 311(1):1-9.
- Bardin SD, Huang HC, Pinto J, Amundsen E, De Britto Alvareg MA, Gagne S, Antoun H, Erickson RS. Biological control of *Pythium* damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Can J Bot. 2004; 82: 291-296.
- Beck DP, Materon LA, Afandi F. Practical *Rhizobium*-legume technology manual. Inter Cent Agric Res Dry Areas .1993 ; 19:389 p.
- Belay Z, Assefa F. Symbiotic and phenotypic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*- from Northern Gondar, Ethiopia. Afr J Biotechnol. 2011;10(21): 4372-4379.
- Benslama A. Réhabilitation de la culture du *Lablab purpureus* L.ex Sweet et étude de son partenaire symbiotique. Thèse de doctorat. U es sènia Oran. 2015: 105p.
- Berrada H, Nouioui I, Iraqui Houssaini M, EL Ghachtouli N, Gtar M, Fikri Benbrahim K. Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez. Afr J Microbiol Res. 2012; 6: 5314-5324.
- Bertoldi MD. New species of *Humicola*. An approach to genetic and biochemical classification. Can J Bota. 1976; 54: 2755 -2765.

Références Bibliographiques

- Beynon JL, Beringer JE, Johnston AWB. Plasmids and host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. J Gen Microbiol. 1980; 120: 421-429.
- Bhagat D, Sharma P, Sirari A, Kumawat KC. Screening of *Mesorhizobium* spp. for control of *Fusarium* wilt in chickpea *in vitro* conditions. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014; 3(4): 923-930.
- Bhargava Y, Murthy JSR, Rajesh Kumar TV, Narayana Rao M. Phenotypic stress tolerance and plant growth promoting characteristics of rhizobial isolates from selected wild legumes of Semi arid region, Tirupati, India. Adv Microbiol. 2016; 6: 1-12.
- Botton B, Breton A, Fevre M, Ganthier S, Gux PH, Larpent JP, Reymond P, Sanglier JJ, Vayssier Y, Veau P. Moisissure utiles et nuisibles importances industrielles Ed. MASSON. Paris. 1990 .120p.
- Brandt M . Aspergillose. Manuel Contrôle des Maladies Transmissibles. 2008; 19 .2p .
- Brennan JM, Fagan B, Van Maanen A. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. Eur J Plant Pathol. 2003; 109: 577-587.
- Buonassisi AJ, Copeman RJ, Pepin HS, Eaton G W. Effect of *Rhizobium* spp on *Fusarium solani* f.sp.*phaseoli*. Can J Plant Pathol. 1986; 8: 140-146.
- Carson KC, Meyer JM, Dilworth MJ. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. Soil Biol Biochem. 2000; 32: 11-21.
- Carson KC, Holliday S, Glenn AR, Dilworth M J. Siderophore and organic acid production in root nodule bacteria. Arch Microbiol. 1992; 157: 264-271.
- Casida LE. *Ensifer adhaerens*, gen. nov., sp. nov. a bacterial predator of bacteria in soil. Int J Syst Bacteriol. 1982; 32:339-345.
- Chahbourne R, Carro L, Peix A, Barrijal S, Velasquez E, Bedmar EJ. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. Int J Syst Evol Microbiol. 2011; 61: 2922-2927.

Références Bibliographiques

Chakraborty U, Chakraborty BN, Basnet M, Chakraborty AP. Evaluation of *Ochrobactrum anthropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease. J Appl Microbiol. 2009; 107(2): 625-634.

Chandra S, Choure K, Dubey RC, Maheshwari DK. Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). Braz J Microbiol. 2007; 38: 128–130.

Chao WL. Antagonistic activity of *Rhizobium* spp. against beneficial and plant pathogenic fungi. Lett Appl Microbiol. 1990; 10: 213-215.

Chen WM, de Faria SM, Chou JH, James EK, Elliott GN, Sprent JI, Bontemps C, Young JP, Vandamme P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinii* folia. int J Syst Evol Microbiol. 2008 ; 58: 2174-2179.

Chen WX, Li GS, Qi Y L, Wang E T, Yuan HL, Li J L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. Int J Syst Bacteriol. 1991; 41: 275-280.

Chen WX, Tan ZY, Gao JL, Li Y, Wang ET. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. Int J Syst Bacteriol. 1997; 47: 870-873.

Chen W, Wang E, Wang S, Li Y, Chen X, Li Y. Characterization of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slow growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. Int J Syst Bacteriol. 1995 ; 45: 153-159.

Chen W X, Yan G H, Li J L. Numerical taxonomic study of fast-growing soy bean rhizobia and proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. Int J Syst Bacteriol. 1988; 38: 392-397.

Chen WM, Zhu WF, Bontemps C, Wei GH. *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. int J Syst Evol Microbiol. 2011; 61(3):574-579.

Chen WM, Zhu WF, Bontemps C, Young JP, Wei GH. *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China. Int J Syst Evol Microbiol. 2010 ; 60(4):958-962.

Références Bibliographiques

- Chérif M, Sadfi N, Benhamou N, Boudabous A, Boubaker A, Hajlaoui MR, Trilly Y. Ultrastructure and cytochemistry of *in vitro* interactions of the antagonistic bacteria *Bacillus cereus* X16 and *B. thuringiensis* 55T with *Fusarium roseum* var. *sambucinum*. J Plant Pathol. 2002; 84: 83-93.
- Chliyah M, Rhimini Y, Selmaoui K, Ouazzani Touhami A, Filali-Maltouf A, El Modafar C, Moukhli A, Oukabli A, Benkirane R, Douira A. Survey of the Fungal Species Associated to Olive-tree (*Olea europaea* L.) Morocco Int J Rec Biotech. 2014; 2 (2): 15-32.
- Coenye T, Gevers D, Peer YV, Vandamme P, Swings J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. FEMS Microbiol Rev. 2005; 29: 147-167.
- Ćosić J, Vrandečić K, Postić J, Jurković D, Ravlić M. In vitro antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. Poljoprivreda. 2010; 6(2): 25-28.
- Dahal RH, Kim J. *Microvirga soli* sp. nov., an alpha *proteobacterium* isolated from Soil. Int J Syst Evol Microbiol. 2017; 67: 127-132.
- de Lajudie P, Willems A, Nick G. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1998; 48: 369-382.
- de Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins M D, Dreyfus B, Kersters K, Gillis M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1994; 44: 715-733.
- Deshwal, V.K., Pandey, P., Kang, S.C. and Maheshwari, D.K. Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi. Ind J Exp Biol. 2003a; 41: 1160- 1164.
- Deshwal V, Chaubey A. Isolation and Characterization of *Rhizobium leguminosarum* from Root nodule of *Pisum sativum* L. J Acad Ind Res. 2014; 2:464- 467.
- Deshwal VK, Dubey RC, Maheshwari DK. Isolation of plant growth-promoting strains of *Bradyrhizobium* (Arachis) sp. with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. Curr Sci. 2003 b; 84(3): 443-448.

Références Bibliographiques

de Oliveira AN, de Oliveira LA, Andrade JS. Production and Some Properties of Crude Alkaline Proteases of Indigenous Central Amazonian Rhizobia Strains. *Braz Arch Biol Technol.* 2010; 53(5): 1185-1195 .

Digambar SP, Sahera N. Isolation and Identification of Some Pathogenic Fungi from Different Infected Vegetables. *Int J Innov Res Sci Engin Tech.* 2016 ; 5: 2921 - 2924.

Diouf D, Ndoye I, Fall D, Kane A, Ba A.T, Neyra M. Caractérisation phénotypique et symbiotique de souches de *Mesorhizobium* spp. nodulant *Acacia seyal* Del. *Sci Tech J.* 2008; 7 : 1 - 10.

Diouf A, de Lajudie P, Neyra M, Kersters K, Gillis M, Martinez-Romero E, Gueye M. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). *Int J Systematic Evol Microbiol.* 2000 ; 50: 159-170.

Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov. a stemnodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int J Syst Bacteriol.* 1988; 38: 89-98.

Duke JA. A handbook of legumes of world Economic importance. Plenum Press, New York. 1981 ; 25p.

Dupont I. Molecular Identification of strains of lactobacillus and comparison of the production of exopolysaccharides by three of these strains. Doctorate Thesis. Laval University, Département of Food science and nutrition, Canada; 1998. 164p.

Ehteshamul-Haque S, Ghaffar A. Use of Rhizobia in the Control of Root Rot Diseases of Sunflower, Okra, Soybean and Mungbean. *J Phytol.* 2008; 138: 157-163.

Elbadry M, Taha RM, EldougDoug KA, Gamal-Eldin H. Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. *J Plant Dis Protect.* 2006; 113(6):247-251.

El-Batanony N H, Massoud O, Mazen M M, Abdel-monium MM. The inhibitory effects of cultural filtrates of some wild *Rhizobium* spp. on some faba bean root rot pathogens and their antimicrobial synergetic effect when combined with *Arbuscular mycorrhiza* (AM). *W J Agric Sci.* 2007; 3: 721-730.

Références Bibliographiques

Elkan GH. Taxonomy of the rhizobia. Can J Microbiol. 1992; 38: 446-450.

El-Tarabily KA, Sivasithamparam K. Non streptomycete actinomycetes as biocontrol agent of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biol Biochem. 2006; 38: 1505-1520.

Essalmani H, Lahlou H. *In vitro* antagonistic activity of some microorganisms towards *Fusarium oxysporum* f.sp.*lentis*. Cryptogamie-Mycol. 2002; 23: 221-234.

Euzéby JP , Findall BJ. Status of strains that contravene rules 27 (3) and 30 of the Bacteriological Code. Request for an Opinion. Int J Syst Evol Microbiol. 2004; 54: 293-301.

Fernandez MR., Chen Y. Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions. Plant Dis. 2005; 89: 164-169.

Fravel DR. Commercialization and implementation of biocontrol. Ann Rev Phytopathol. 2005; 43: 337-359.

Fred EB, Baldwin IL, McCoy E. Root nodule bacteria and leguminous plants. Soil Science. 1933 ; 35 :167 .

Garcia-Fraile P, Rivas R, Willems A, Peix A, Martens M, Martinez-Molina E, Mateos PF , Velazquez E. *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57: 844-848.

Gao P , Guo Y , Li Y, Duann T. *Sinorhizobium melilot*. Effects of dual inoculation of AMF and rhizobium on alfalfa (*Medicago sativa*) root rot caused by *Microdochium tabacinum*. Austr Plant Path. 2018 ; 47 : 195–203 .

Gharzouli R, Benahmed A, Benhizia Y, Benguedouar A. Influence of carbon source on the production of exopolysaccharides by *Rhizobium sulae* and on the nodulation of *Hedycoronarium* legume. Afr J Microbiol Res. 2012; 6: 5940-5946.

Ghorpade VM , Gupta SG. Siderophore Production by *Rhizobium nepotum* isolated from “Stem nodule of *Aeschynomene indica*”. Int J Adv Res Biol Sci. 2016 ; 3(7): 105-108.

Gillis M, Van TV, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K, Heulin T, Fernandez MP. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended

Références Bibliographiques

description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. Int J Syst Bacteriol. 1995; 45: 274- 289.

Glaeser SP, Kämpfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. Syst Appl Microbiol. 2015; 38(4): 237-245.

Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Kumar R, Varshney CL, Gowda L, Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities Biotech. 2015 ; 5: 355-377.

Graham PH. Antigenic affinities of the root-nodule bacteria of legumes. Antonie van Leeuwenhoek. J Microbiol Serol. 1963; 29: 281-291.

Graham PH. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. J Gen Microbiol. 1964; 35: 511–517.

Graham PH, Sadowsky MJ, Keyser HH, Barnett YM, Bradley RS, Cooper JE, De Ley J, Jarvis BDW, Roslycky EB, Stijdom BW, Young JPW. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. Int J Syst Bacteriol. 1991; 41: 582-587.

Graham PH, Vance CP. Legumes: Importance and constraints to greater use. Plant Physiol. 2003; 131: 872-877.

Gu CT, Wang ET, Tian CF, Han TX, Chen WF, Sui XH, Chen WX. *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. Int J Syst Evol Microbiol. 2008; 58: 1364-1368.

Han TX, Han LL, Wu LJ, Chen WF, Sui XH, Gu JG, Wang ET, Chen WX. *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. Int J Syst Evol Microbiol. 2008; 58: 2610-2618.

Hartel PG, Alexander M. Temperature and desiccation tolerance of cowpea rhizobia. Can J Microbiol. 1984; 30: 820-823.

Hawksworth D, Pitt JI, Sutton BC. Typification of the Genus *Penicillium*. Taxon. 1976; 25(5/6):665-670. •

Références Bibliographiques

- He RL, Wang2 GP, Liu XH, Zhang CL , Lin FC . Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim Afri J Biotech. 2009 ; 8 (2) :191-195.
- Hemissi I, Mabrouk, Abdi N, Bouraoui M, Saidi M, Sifi B. Effects of some *Rhizobium* strains on chickpea growth and biological control of *Rhizoctonia solani*. Afr J Microbiol Res. 2011; 5: 4080-4090.
- Hmissi I, Gargouri S, Sifi B. Attempt of wheat protection against *Fusarium culmorum* using *Rhizobium* isolates. Tunis J Plant Prot. 2011; 6: 75-86.
- Ho YN, Chiang HM, Chao CP, Su CC, Hsu HF, Guo CT, Hsieh JL. *In planta* biocontrol of soilborne *Fusarium* wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. Plant Soil. 2015; 387: 295-306 .
- Hourcade E. Dégradation du dichlorométhane et adaptation à la production intracellulaire d'acide chez *Methylobacterium*. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur, Strasbourg. 2007 ; 170p.
- Hossain I, Jalil MA, Khan MAI, Aminuzzaman FM. Seed treatment with *Rhizobium* and N P K nutrition on disease incidence and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Bangladesh J Seed Sci Technol. 2000; 4: 1-6.
- Hossain Md, Shakhawat. Potential use of *Rhizobium* spp. to improve growth of non nitrogen fixing plants. Master's Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Soil Sciences, Swedish; 2007. 37p.
- Hung M, Bhagwath AA, Shen FT, Devasya RP, Young CC. Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. Pedobiologia. 2005; 49: 577-584.
- Hungria M, Franco AA, Sprent JJ. New sources of high temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. Plant Soil. 1993; 149: 103-109.
- Hussain S, Ghaffar A, Aslam M. Biological control of *Macrophomina phaseolina* charcoal rot of sun flower and mung bean. J Phytopathol. 1990; 130: 157-160.
- Hussain MB, Mehboob I, Zahir ZA, Naveed M, Asghar HN. Potential of *Rhizobium* spp. for improving growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.). Soil Environ. 2009; 28(1): 49-55 .

Références Bibliographiques

Icgen B, Ozcengiz G, Alaeddinoglu N. Evaluation of symbiotic effectiveness of various *Rhizobium* cicer strains. Res Microbiol .2002 ;153: 369-372.

Idris EES, Iglesias D, Talon M, Borriss R. Tryptophan dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefacien* sFZB42. Mol Plant Microbe Interact. 2007; 20: 619-626.

Islam MS, Kawasaki H, Muramatsu Y, Nakagawa Y, Seki T. "*Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan . Biosci Biotech Biochem. 2008; 72: 1416-1429.

Izalallen M. Production des siderophores chez le *Rhizobium* et leurs role dans l'inhibition de certains champignons phytopathogenes. Mémoire de maître ès sciences. Faculté des études supérieures de l'université Laval.1997 ; 85p.

Jarchelou HZ, Ghosta Y, Rezaee S. Identification and pathogenicity study of *Alternaria* spp. On potato in west Azerbaijan province . J Plant Path. 2013; 49(3): 101-104.

Jarvis BDW, Pankhurst CE, Patel JJ. *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria. Int J Syst Bact. 1982; 32(3): 378-380.

Jarvis BDW, van Berkum P, Chen W X, Nour S M, Fernandez M P, Cleyet-Marel J C, Gillis M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshansense* to *Mesorhizobium* gen. nov. Int J Syst Bacteriol. 1997; 47: 895-898.

Javier F , Acero F, Carbu M, Garrido C, Vallejo I, Cantoral JM. Proteomic Advances in Phytopathogenic Fungi. Curr Proteo. 2014; 4(2): 79-88.

Jordan DC. Family II. *Rhizobiaceae*. In, *Bergey's manual of systematic bacteriology*. I (eds. By N. R. Krieg and J. G. Holt Williams and Wilkins Co. Baltimore, M .D). 1984; pp: 232-242.

Jordan D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. Nov.; a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int J Syst Bacteriol. 1982; 32; 136-139.

Références Bibliographiques

- Jourand P, Giraud E, Bena G, Sy A, Willems A, Gillis M, Dreyfus B , de Lajudie P. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. Int J Syst Evol Microbiol. 2004; 54 : 2269-2273.
- Kachkouch W, Ouazzani Touhami A, Benkirane R, Douira A. Identification de la mycoflore de l'espece ornementale, de *Erythrina Caffra*, au Maroc. Rev Ivoir Sci Technol. 2012 ; 19 : 88 -101.
- Kamble PM, Singh A, Kshyap LR. Characterisation of intrinsic variability of *Mezorhizobium ciceri* isolates of cultivated fields. Indian J Exp Biol. 2006; 44: 671-674.
- Kammoun GL, Bensassi F, Hattab MM, Rhouma A, Bacha H, Hajlaoui MR. Identification of *Alternaria* Species Recovered from Stored Durum Wheat Kernels in Tunisia. Plant Protection. 2014; 9: 119-129.
- Kammoun GL, Gargouri S, Hajlaoui MR, Marrakchi M. Occurrence and distribution of *Microdochium* and *Fusarium* species isolated from durum wheat in northern Tunisia and detection of mycotoxins in naturally infested grain. Phytopathol. 2009; 157: 546-551.
- Kang Y, Carlson R, Tharpe W, Schell MA. Characterization of Genes Involved in Biosynthesis of a Novel Antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and Their Role in Biological Control of *Rhizoctonia solani*. Appl Environ Microbiol. 1998; 64(10): 3939-3947.
- Kapooe JN, Hingorani MK. *Alternaria* leaf spot and fruit rot of Brinjal. Ind J Agric Sci. 1958; 28: 109-114.
- Karanja NK, Wood M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus-Vulgaris* L.) in Kenya: Tolerance of high temperature and antibiotic resistance. Plant Soil. 1988; 112: 15-22.
- Karunakaran CO. The Kerala food poisoning. J Indian Med Assoc. 1958; 31: 204-223.
- Khalequzzaman KM, Hossain I. Effect of seed treatment with *Rhizobium* strains and biofertilizers on foot/root rot and yield of bush bean in *Fusarium solani* infested soil. J Agric Res. 2007; 45: 151-160.

Références Bibliographiques

- Khan MR, Mohiddin F, AhamadF. Inoculant rhizobia suppressed root-knot disease, and enhanced plant productivity and nutrient uptake of some field-grown food legumes. *Soil Plant Science* . 68 ; 2018 : 166-174.
- Kloepper JW, Tuzun S, Kuc JA. Proposed definitions related to induced resistance. *Biocontrol Sci Technol*. 1992; 2: 349-351.
- Klonowska A, Chaintreuil C, Tisseyre P, Miché L, Melkonian R, Ducousso M, LaguerreG, Brunel B, Moulin L. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. *FEMS Microbiol Eco*. 2012; 81(3) : 618-635 .
- Kumar H, Dubey RC, Maheshwari DK. Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination, growth promotion and suppression of *Fusarium* wilt of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Crop Protection*. 2011; 30:1396-1403.
- Kumar B, Kumar MS, Annapurna K, Maheshwari DK. Genetic diversity of plant growth-promoting rhizobia isolated from a medicinal legume, *Mucuna pruriens* Linn. *Curr Sci*. 2006; 91(11) : 1524-1529 .
- Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE, Udell SE. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol*. 1992; 38 : 501-505.
- Laib D. Etude de l'activité insecticide du champignon endophyte *Cladosporium* sp. isolé du Laurier rose *Nerium oleander* L. (Apocynaceae, Gentianales) sur la bruche des haricots *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera, Bruchidae). *Nat Tech*. 2014 ; 10 : 39 -44.
- Laird M, Lacey LA, Davidson EW. Safety of microbial insecticides. CRC Press .1990; 272p.
- Lakhdari W, Dehliz A, Acheuk F, Mlik R, Hammi H, Maatallah S, Doumandji-Mitiche B. Biological control assay against date palm diseases by using an aqueous extract of *Zygophyllum album* in the southeast of Algeria. *Int J Herb Med* . 2016; 4(4): 31-37.
- Landa BB, Hervas A, Bethiol W, Jimenez- Diaz RM. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. *Phytoparasitica*. 1997; 25: 305-318.

Références Bibliographiques

Lee JY , Kang SW,Yoon CS, Kim JJ , Choi DR , Kim SW . *Verticillium lecanii* Spore Formulation Using UV Protectant and Wetting Agent and the Biocontrol of Cotton Aphids .Biotechnology Letters. 2006;13 : 1041-1045.

Legesse S, Assefa F. Symbiotic and phenotypic characteristics of rhizobia nodulating Faba Bean (*Vicia faba*) from Tahtay Koraro, Northwestern Zone of Tigray Regional State, Ethiopia. Int J Tech Enhanc Emerg Engin Res. 2014; 2: 15-23.

Leslie JF, Summerell BA. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Professional Publishing. 2006; 385p.

Leysen N, Goffart P. Biologie générale. De Boeck, Bruxelles. 1977 : 65-66.

Lin DX, Chen WF, Wang FQ ,Hu D, Wang ET, Sui XH , Chen WX. *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes. Int J Syst Evol Microbiol. 2009; 59: 1919-1923.

Lin DX, Wang ET, Tang HH, Tian XH, Yu Rong G, Su H, Chen WX. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. Int J Syst Evol Microbiol. 2008; 58:1409-1413.

Lloret L, Ormeno-Orrillo E, Rincon R, Martinez-Romero J, Rogel-Hernandez MA, Martinez-Romero E. *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. Syst Appl Microbiol. 2007; 30: 280-290.

Lu YL, Chen WF, Wang ET, Han LL, Zhang XX, Chen WX, Han SZ. *Mesorhizobium shangrilense* sp. nov., isolated from root nodules of Caragana species.Int J Syst Evol Microbiol.2009 ; 59(12): 3012-3018.

Maatallah J, Berraho , Sanjuan J, Lluch C. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. Agronomie. 2002; 22: 321–329.

Manasa K, Subhash Reddy R, Triveni S.*In vitro* Screening of Temperature stress tolerance of *Rhizobial* and *Pseudomonas fluorescence* isolates. J Pharmac Phytochem. 2017; 6(5): 764-767.

Martens MM, Delaere R, Coopman P, De Vos M, Gillis A, Willems. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa.Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57: 489-503.

Références Bibliographiques

Martinez-Romero E, Segovia L, Martins Mercante F, Franco AA, Graham P and Pardo MA. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and leucaena sp. trees. Int J Syst Bacteriol. 1991; 41: 417-426.

Martins PGS. Junior MAL. Fracetto GGM. Silva MLRBD. Vincentin RP. Lyra MDCCPDL. Mimosa caesalpinii folia rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. Arch Microbiol. 2015 ; 197(3) : 459-469.

Mazen MM, El-Batanony ND, Abd El-Monium M M, Massoud O N. Cultural Filtrate of *Rhizobium* spp. and *Arbuscular Mycorrhiza* are potential biological control agents against Root Rot Fungal Diseases of Faba Bean. Gen J Biotech Biochem. 2008; 3: 32-41.

Merabet C, Martens M, Mahdhi M, Zakhia F, Sy A, Le Roux C, Domergue O, Coopman R, Bekki A, Mars M, Willems A, de Lajudie P. Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2010; 60: 664-674.

Merzoug A, Belabid L, Youcef-Benkada M, Benfreh F, Bayaa B. Pea *Fusarium* Wilt Races in Western Algeria . Plant Protect Sci. 2014; 50(2): 70-77.

Mesterházy Á. Breeding wheat for resistance to *Fusarium graminearum* and *F. culmorum*. Z. Pflzüchtung. 1983; 91: 295- 311.

Mishra RPN, Singh RK, Jaiswal HK, Kumar V, Maurya S. *Rhizobium*-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). Curr Microbiol. 2006; 52: 383-389.

Mmbaga MT, Shi A, Kim MS. Identification of *Alternaria alternata* as a Causal Agent for Leaf Blight in Syringa Species. Plant Patho J. 2011; 27(2) : 120-127 .

Mrabet M, Abdellatif E, Zribi K, Mhamdi R, Djebali N. *Sinorhizobium meliloti* can protect *Medicago truncatula* against *Phoma medicaginis* attack. Phytopathol Mediterr. 2011; 50:183-191.

Moffet ML, Colwell RR. Adansonian analysis of the *Rhizobiaceae*. J Gen Microbiol. 1968; 51: 245-266.

Références Bibliographiques

Morsy KM, Tarrad AM. Effect of infection with *Botrytis faba* sard and mechanical leaf defoliation on yield loss in faba bean. Egypt J Appl Sci. 2005 ; 20 : 443-445.

Nakagawa Y, Sakini T, Yakota A. Transfer of "*Pseudomonas riboflavina*" (poster 1944), a gram negative, motile rod with long-chain 3-hydroxy fatty acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov., nom. rev. Int J Syst Bacteriol. 1996; 46: 16-22.

Ndoye I. Contribution à l'étude de la symbiose entre *Azorhizobium*, *Rhizobium* et *Sesbania rostrata*. Thèse de doctorat . Université des sciences et techniques de Lille. 1990 ; 170p.

Newton WE , Burgess B K , Müller A. Nitrogen Fixation; its scope and importance. Plenum Press. New York et London. 1983 ; 1-19.

Nick G, de Lajudie P, Eardly BD, Suomalainen S, Paulin L, Zhang X, Gillis M Lindstro K. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. And *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. Int J Syst Bacteriol .1999; 49 :1359-1368.

Ngoma L, Babalola OO, Ahmad F. Ecophysiology of plant growth promoting bacteria. Scie Res Ess. 2012; 7(47): 4003-4013.

Nour SM, Cleyet-Marel JC, Normand P, Fernandez MP. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1995; 45: 640-648.

Nour SM, Fernandez MP, Normand P, Cleyet-Marel JC. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Int J Syst bacteriol. 1994; 44:511-522.

Nyongesa BW, Okoth S. A fungi identification Key for *Aspergillus* Species Isolated from Maize and Soil of Nandi County. Ken Advan Microbiol. 2015; 5: 205-229.

Oerke EC. Crop losses to pests. J Agric Sci . 2006 ; 144 :31-43.

Oke V, Long RS. Bacteroid formation in the *Rhizobium*–legume symbiosis. Curr Opin Microbiol. 1999; (2) : 641-646.

Omar S A , Abd-Alla M. Biocontrol of fungal root rot diseases of crop plants by the use of rhizobia and bradyrhizobia. Folia Microbiol. 1998; 43: 431-437.

Références Bibliographiques

Omar I, O'Neill TM, Rossall S. Biological control of *Fusarium* crown and root of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. Plant Pathol. 2006; 55: 92-99.

Ongena M, Daayf F, Jacques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz TC, Cornélis P, Koedam N, Bélanger RR. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads; predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. Plant Pathol. 1999; 48: 66-76.

Ostry V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. World Mycotoxin J. 2008; 1: 175-188.

Othman BB. *Burkholderia cepacia* complex bacteria and their antimicrobial activity. Thesis of Philosophiae Doctor. 2012:1-289.

Ouartsi A, Chekireb D. Preliminary characterization of rhizobia isolate from nodosities of *Cicer arietinum* L. cultivates in the north east of Algeria. Rev indus health environ microbial. 2011; 5: 23-38.

Ouattara-Sourabie PB, Nikiema PA, Traoke AS. Caractérisation de souches d'*Aspergillus* spp isolées des graines d'arachides cultivées au Burkina Faso, Afrique de l'Ouest. Int J Biol Chem Sci. 2011 ; 5(3): 1232-1249 .

Ouslim S, Merabet, C, Boukhatem ZF, Bouchentouf L, Bekki A. Phenotypic and symbiotic diversity, of nodulating rhizobia associated with bean (*Vicia faba*) in West Algeria. Int J Technol Enhance Emerg Engen Res. 2015; 3: 130-138.

Owuor MJ, Midega CAO, Obonyo M, Khan ZR Distribution of *Aspergillus* and *Fusarium* ear rot causative fungi in soils under push-pull and maize monocropping system in Western Kenya. Afri J Microbiol Res. 2017; 11(37): 1411-1421.

Ozgonen H, Gulcu M. Determination of mycoflora of pea (*Pisum sativum*) seeds and the effects of *Rhizobium leguminosorum* on fungal pathogens of peas. Afr J Biotechnol. 2011; 10: 6235- 6240.

Ozkoc I, Deliveli MH. *In vitro* inhibition of the mycelial growth of some root rot fungi by *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* isolates. Turk J Biol. 2001; 25: 435-445.

Références Bibliographiques

Parker M. *Bradyrhizobia* from wild *Phaseolus*, *Desmodium*, and *Macroptilium* species in northern Mexico. Appl Environ Microbiol. 2002; 68: 2044-2048.

Patriarca A, Azcarate MP, Terminiello L, Fernandez Pinto V. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentine wheat. Int J Food Microbiol. 2007; 119: 219-222.

Patt TE, Cole GE, Hanson RS. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. Int J Syst Bacteriol. 1976; 26: 226-229.

Paul NC, Yu SH. Two Species of Endophytic *Cladosporium* in Pine Trees in Korea. Mycobiol. 2008 ; 36(4) : 211-216.

Perdomo F, Echavez B, Alamed M, Schroder EC. *In vitro* evaluation of bacteria for the biological control of *Macrophomina phaseolina*. World J Microbiol Biotechnol. 1995; 11: 183-185.

Pitt JI, Hocking AD. Fungi food spoilage. Springer, Dordrecht. 2009; 519p.

Poorniammal R, Sundaram SP, Kumutha K. *In vitro* Biocontrol Activity of *Methylobacterium Extorquens* Against Fungal Pathogens. Int J Plant Protection. 2009; 2 (1) : 59-62.

Prabhu S, Kumar S, Subramantan S, Sundaram SP. Suppressive Effect of *Methylobacterium fujisawaense* Against Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita*. Ind J Nematol. 2009; 39: 165-169.

Prapagdee B, Kuekulvong C, Mongkolsuk S. Antifungal potential of extracellular metabolite produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. Int Biol Sci. 2008 ; 4 : 330-337.

Quan ZX, Bae HS, Baek JH, Chen WF, Im WT, Lee ST. *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55: 2543-2549.

Quéré AL, Tak N, Gehlot HS, Lavire C, Meyer T, Chapulliot D, Rath S, Sakrouhi I, Rocha G, Rohmer M, Severac D, Maltouf AF, Munive JA. Genomic characterization of *Ensifer aridi*, a proposed new species of nitrogen-fixing rhizobium recovered from Asian, African and American deserts. BMC Genomics. 2017; 18: 85.

Références Bibliographiques

- Rabie GH. Induction of fungal disease resistance in *Vicia faba* by dual inoculation with *Rhizobium leguminosarum* and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycopathologia*. 1998 ; 141: 159-166.
- Rafin C, Tirilly Y. Characteristics and pathogenicity of *Pythium* spp. Associated with root of tomatoes in soilless culture in Brittany. *Plant Pathol*. 1995; 44: 779-785.
- Ramachandran H, Shafie NAH, Sudesh K, Azizan MN, Abdul Majid MI .Correction to: *Cupriavidus malaysiensis* sp. nov., a novel poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) accumulating bacterium isolated from the Malaysian environment.2017; 111: 361-372.
- Ramirez-Bahena MH, Garcia-Fraile P, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual Jose MM, Pedro F, Martinez-Molina E, Velazquez E. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008; 58: 2484-2490.
- Ramirez-Bahena MH, Hernandez M, Peix A, Velaquez E, Leon-Barrios M. *Mesorhizobial* strains nodulating *Anagyris latifolia* and *Lotus berthelotii* in Tamadayaravine (Tenerife, Canary Islands) are two symbiovars of the same species, *Mesorhizobium tamadayense* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*. 2012; 35: 334-341.
- Ramirez-Bahana MH, Peix A, Rivas R, Camacho M, Rodriguez-Navarro DN, Mateos PF, Martinez-Molina E, Willems A , Velasquez E. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009; 59: 1929-1934.
- RAP. Mildiou de la pomme de terre, strategies d'utilisation des fongicides. Bulletin d'information. 2016 ; 5 :1-7 .
- Reeve,W Chain P, O'Hara G, Ardley J, Nandesena K, Bräu L, Tiwari R, Malfatti S, Kiss H, Lapidus A, Copeland A, Nolan M, Land M, Hauser L,² Chang YJ, Ivanova N, Mavromatis K, Markowitz V,Kyrpides N, Gollagher M, Yates R, Dilworth M, HowiesonJ.Complete genome sequence of the *Medicago* microsymbiont *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *medicae* strain WSM419.*Stand Genomic Sci*. 2010; 2(1): 77-86.

Références Bibliographiques

- Rejili M, Mahdhi M , Ferchichi A. Natural Nodulation of Five Wild Legumes in the South Area of Tunisia. *Plant Biosyst.* 2009; 142: 34-39.
- Ren DW, Chen FW, Sui XH, Wang ET, Chen WX. *Rhizobium vignae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species. *Int J Syst Evol Microbiol* .2011; 61: 580-586.
- Rivas R, Willems A, Palomo J L, Garcia-Benavides P, Mateos P F, Martinez-Molina E, Gillis M , Velazquez E. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004; 54: 1271-1275.
- Rivas R, Willems A, Subba-Rao N, Mateos P F, Dazzo F B, Martinez-Molina E, Gillis M, Velazquez E. Description of *Devosia neptunia* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst Appl Microbiol*. 2003; 26: 47-53.
- Rodriguez AAC, Menezes M. Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*. 2006; 3:203-215.
- Rüberg S, Tian ZX, Krol E, Linke B, Meyer F, Wang Y, Pühler A, Weidner S, Becker A. Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J Biotechnol*. 2003; 106: 25-56.
- Sadowsky MJ, Keyser HH, Bohlool BB. Biochemical characterization of fast- and slow-growing rhizobia that nodulate soybeans. *Int J Syst Bacteriol*. 1983; 33: 716-722.
- Sagolshemcha R, Devi YN, Singh WR. Plant Growth Promoting Effect and Biocontrol Potential of *Rhizobium* spp. against *Macrophomina phaseolina*. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2017; 6(6): 2695-2701.
- Samavat S, Besharati H, Behboudi K. Interactions of Rhizobia Cultural Filtrates with *Pseudomonas fluorescens* on Bean Damping-off Control. *J Agric Sci Tech*. 2011; 13: 965-976.

Références Bibliographiques

Satish S, Mohana DC, Ranhavendra MP, Raveesha KA .Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. Int J Agric Technol. 2007; 3 (1) : 109-119.

Schubert K, Braun U, Groenewald JZ , Crous PW. *Cladosporium* leaf-blotch and stem rot of *Paeonia* spp. caused by *Dichocladosporium chlorocephalum* gen. nov. Stu Myco. 2007; 58: 95-104.

Schwyn B, Neilands. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. J Anal Biochem. 1987; 160: 47–56.

Sedra MH, Djerbi M. Comparative study of morphological characteristics and pathogenicity of two *F. oxysporum* causing respectively the vascular wilt of date palm (Bayoud) and canary Island. 2nd symposium on date palm, King Faycal University, Eastern province, Kingdom of Saudi Arabia. 1986; 359-365.

Segovia L, Young JP, Martínez-Romero E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1993 ; 43(2): 374-377.

Shaban WI, El-Bramawy MA.Impact of dual inoculation with *Rhizobium* and *Trichoderma* on damping off, root rot diseases and plant growth parameters of some legumes field crop under greenhouse conditions.Int Res J Agric Sci Soil Sci. 2011; 1 (3): 98-108.

Shamseldin A, Abdelkhalek A, Sadowsky MJ.Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review .Symbiosis.2017; 71: 91-109.

Sharif T, Khalil S, Ahmad S. Effect of *Rhizobium* sp. on growth of pathogenic fungi under *in vitro* conditions. Pak J Biol Sci. 2003; 6: 1597-1599.

Sharma P. Evaluation of disease control and plant growth promotion potential of biocontrol agents on *Pisum sativum* and comparison of their activity with popular chemical control agent - carbendazim. J Toxi Environ Health Sci. 2011 ; 3(5) :127-138.

Shetta ND, Al-Shaharani TS, Abdel-Aal M. Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. Am Eurasian J Agric Environ Sci. 2011; 10: 410-418.

Références Bibliographiques

Siddiqui ZA, Ehteshamul-Haque S, Zaki MJ, Ghaffar A. Green house evaluation of rhizobia as biocontrol agent of root infecting fungi in Okra. *Acta Bot.* 2000; 53: 13-22.

Sijam K, Dikin A. Biochemical and Physiological Characterization of *Burkholderia Cepacia* as Biological Control Agent. *Int J Agri Biol*, 2005; 7(3) : 385-388.

Singleton PW, El Swaify SA, Bohlool BB.. "Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl Environ Microbiol.* 1982; 44(4): 884-890.

Smiley RW, Taylor PA, Clarke RG, Greenhalgh FC, Trutmann P. Simulated soil and plant management effects on root rots of subterranean clover. *Aust J Agric Res.* 1986; 37: 633-646.

Smith GB, Wollum AG. Nodulation of *Glycine max* by Six *Bradyrhizobium japonicum* Strains with Different Competitive Abilities. *Appl Environ Microbiol.* 1989 ; 55(8): 1957–1962.

Solargo. Légumineuses : quels enjeux écologiques ? *Courrier de l'environnement de l'INRA* .2001 ; 44 : 69-73 .

Somasegaran P , Hoben HJ. Methods in legume *Rhizobium* technology .University of Hawaii NifTAL .Project and MIRCEN.1985 .510p.

Somasegaran P, Hoben HJ . Handbook for Rhizobia . Methods in Legume-Rhizobium Technology .1994; 7-23.

Sowndhararajan K, Marimuthu S, Manian S. Biocontrol potential of phylloplane bacterium *Ochrabactrum anthropi* BMO-111 against blister blight disease of tea .*J appl microbial.* 2012; 114: 209-218.

Stowers MD. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annu Rev Microbiol.* 1985; 39: 89-108.

Suman, Yadav AS. Antagonistic effect of *Mesorhizobium ciceri* Isolates on *Fusarium oxysporum* F. Sp. Ciceri .*Legume Research.* 2015; 38 (1): 115-120.

Sutton BC. Forest microfungi in a leaf spot of populus caused by *Cladosporium subsessile*. *Can Bota.* 1970; 48(3): 471-477.

Références Bibliographiques

- Sy A, Eric G, Philippe J, Nelly G, Anne W, Philippe L, Yves P, Marc N, Monque G, Catherine B, Dreyfus B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. J Bact. 2001; 183: 214 -220.
- Teixeira FCP, Borges WL, Xavier GR, Rumjanek NG. Characterization of indigenous rhizobia from caatinga. Braz J Microbiol. 2010; 41: 201-208.
- Tena M, Magallanes M. Relation entre l'activité fixatrice d'azote non symbiotique et quelques propriétés physicochimiques du sol. Agronomie. 1985; 5(4) : 369-373 .
- Thilagam R, Hemalatha N, Poongotha E ,Kalaivani G. Identification of *Aspergillus* species isolated from corn and peanuts in storage godowns. Int J Pharm Bio Sci. 2016 ;7(4): 600- 606.
- Thilagam R, Kalaivani G, Hemalatha N. Isolation and identification of phytopathogenic fungi from infected plant parts. Int J Curr Pharma Res. 2018; 10: 26- 28.
- Toledo I, Lloret L, Martinez-Romero E. *Sinorhizobium americanus*, sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. Syst App Microbiol .2003; 26:54-64.
- Torres DE, Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E, Guevara-Fefer P, Márquez Guzmán GJ, Pérez-Martínez C. *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudo cladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. PLoS one. 2017; 10: 1-16.
- Tulek S, Dolar FS. Detection and identification of *Alternaria* species causing diseases of carrot in Ankara province Turkey. Scientific Papers. Horticulture. 2015; 59: 263-268 .
- UNEP. Finding Alternatives to Persistent Organic Pollutants (POPs) for termite management. Global IPM facility expert group. Termite management, Italy. 2000; 39: 118-168.
- Vaishali A, Pawar Pooja R, Pawar Ashok M, Bhosale Sourabh V, Chavan. Effect of *Rhizobium* on Seed Germination and Growth of Plants. J Acad Ind Res. 2014; 3: 84-88.
- Valdez JG , Makuch MA , Ordovini AF , Frisvad JC, Overby DP , Masuelli RW, Piccolo RJ . Identification, pathogenicity and distribution of *Penicillium* spp. isolated from garlic in two regions in Argentina. Plant Pathology. 2009 ; 58: 352-361.

Références Bibliographiques

Valverde A, Igual JM, Peix A, Cervantes E, Velazquez E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. Int J Food Microbiol. 2006; 56: 2631–2637.

Van Berkum P, Eardley B D. Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. In The *Rhizobiaceae*: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. 1998; 1:1- 24.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol Rev. 1996; 60: 407-438.

Van Dien SJ, Okubo Y, Hough MT, Korotkova N, Taitano T, Lidstrom ME. Reconstruction of C (3) and C(4) metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using transposon mutagenesis. Microbiol. 2003; 149: 601-609.

van Loon LC. Plant responses to plant growth-promotion rhizobacteria. Eur J Plant Pathol. 2007; 119:243-254.

Velázquez E, García-Fraile P, Ramírez-Bahena MH, Rivas R, Martínez-Molina E. Current Status of the Taxonomy of Bacteria Able to Establish Nitrogen-Fixing Legume Symbiosis. Microbes for Legume Improvement. 2017; 1-43.

Venkateshwara R J, Parvati K, Kavita P, Jakka NM, Pallela R. Effect of Chlorpyrifos and monocrotophos on locomotor behavior and acetylcholinesterase activity of subterranean termites. Pest Manag Sci. 2005 ; 61: 417- 421.

Vidal C, Chantreuil C, Berge OM, Lucette E, Jose BG, Brunel B, Cleyet-Marel JC. *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov. a metal-resistant symbiont of *Anthyllus vulneraria* growing on metalcolours soil in Languedoc, France. Int J Syst Evol Microbiol. 2009; 59 : 850-855.

Vincent JM. A manual for the practical study of the root nodule bacteria, Oxford Edition; 1970. 164p.

Vinuesa P, Leon-Barrios M, Silva C, Willems A, Jarabo-Lorenzo A, Perez-Galdona R, Werner D, Martínez-Romero E. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies *alpha* and *Bradyrhizobium* genospecies *beta*. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55: 569-575.

Références Bibliographiques

Wang X, Radwan M, TaraAwneh A, Gao J, Wedge D, Rosa L. Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. J Agric Food Chem. 2013; 61(19): 4551-4555.

Wang ST, Ristaino JB. Optimization of sample size and rDNA extraction methods to improve PCR detection of different propagules of *Phytophthora infestans*. Plant Dis. 2002; 86: 247-253.

Wang ET, van Berkum P, Sui XH, Beyene D, Chen WX, Martínez-Romero E Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1999; 49: 51-65.

Wang FQ, Wang ET, Liu J, Chen Q, Sui XH, Chen WF, Chen WX. *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57: 1192-1199.

Wang YC, Yu RC. Detection of toxigenic *Aspergillus* spp. in rice and corn by ELISA. J Chin Agric Chem Soc. 1998; 36: 512-520.

Wei GH, Wang ET, Tan ZY, Zhu ME, Chen WX. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulaceae*. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52: 2231-2239.

Werner D. Symbiosis of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall, 1992; 389 p.

Wertz JE, Goldstone C, Gordon DM, Riley MA. A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept. J Evol Biol. 2003; 16: 1236-1248.

Whipps JM. Effect of media on growth and interaction between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. New Phytol. 1987; 107: 127-142.

Whipps, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J Exp Bot. 2001; 52: 487-511.

Willems A. The taxonomy of rhizobia: an overview. Plant Soil. 2006; 287:3-14.

Références Bibliographiques

Willems A, Collins MD. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences, *Int J Syst Bacteriol* .1993; 43: 305-313.

Xu M L, Ge C, Cui Z, Li J , Fan H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int J Syst Bacteriol*. 1995; 45: 706-711.

Xu L, Zhang Y, Mohamad OA, Jiang C , Friman VP. *Mesorhizobium zhangyense* sp. nov., isolated from wild *Thermopsis lanceolate* in northwestern China. *Archi Microbiol*. 2018 ; 200: 603–610 .

Xu L, Zhang Y, Read N, Liu S, Friman VP. *Devosia nitraria* sp. nov., a novel species isolated from the roots of *Nitraria sibirica* in China. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017; 110(11): 1475-1483.

Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) com. nov. *Microbiol Immunol*. 1992; 36: 1251-1275.

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano L, Hotta H, Nissmuchu Y. Transfer of two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. : Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Pelleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol Immunol*. 1995; 39: 897-904.

Yadav AS, Nehra K. Selection/ Isolation of High Temperature Tolerant Strains of *Rhizobium* for Management of High Temperature Stress on *Rhizobium*- Legume Symbiosis. *Int J Microbial Reso Technolo*. 2013; 2(1): 47-57.

Yaqub F, Shahzad S. Efficacy and persistence of microbial against antagonist *Sclerotium Rolfsii* under field conditions. *Pak J Bot*. 2011; 43(5): 2627-2634.

Yao ZY, Kan FL, Wang ET, Wei GH, Chen WX . Characterization of rhizobia that nodulate legume species within the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002; 52: 2219-2230.

Yelton MM, Yang SS, Edie SA, Lim ST. Characterization of an Effective Salt-tolerant, Fast-growing Strain of *Rhizobium japonicum*. *J Gen Microbiol*. 1983; 129: 1537-1547.

Références Bibliographiques

Young JM. *Sinorhizobium* versus *Ensifer*: may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission? Int J Syst Evol Microbiol. 2010; 60: 1711-1713.

Young JM. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) legitimate? Request for an Opinion .Int J Sys Evol Microbiol.2003; 53: 2107-2110.

Yuan CG, Jiang Z, Xiao M, Zhou EM, Kim CJ, Hozzein WN , Park DJ, Zhi XY , Li WJ. *Mesorhizobium sediminum* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. Int J Syst Evol Microbiol. 2016; 66: 4797-4802.

Zahir ZA, Muhammad A, Frankenberger WT. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. Adv Agro. 2004; 81:97-168.

Zahran HH. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. J Biotechnol. 2001; 91(2-3): 143-153.

Zahran HH. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiol Mol Biol Rev. 1999; 63: 968-989.

Zakhia F, De Lajudie P. Taxonomy of rhizobia. Agronomie. 2001; 21: 569-576.

Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel JC, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. Characterization of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. Syst Appl Microbiol. 2004; 27: 380-395.

Zehhar G, Ouazzani Touhami A, Badoc A, Douira A. Effet des *Fusarium* des eaux des rizières sur la germination et la croissance des plantules du riz. Bull Soc Pharmacol. 2006 ;145 :7-18.

Zhang H, Hanada S, Shigematsu T, Shibuya K, Kamagata Y, Kanagawa T, Kurane R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE .Int J Syst Evol Microbiol. 2000 ; 50 :743-74.

Zhang YM, Li YJ, Chen WF, Wang ET, Sui XH, Li QQ, Zhang YZ, Zhou YG , Chen WX. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. Int J Syst Evol Microbiol. 2012a; 62: 1951-1957.

Références Bibliographiques

Zhang JJ, Liu TY, Chen WF, Chen WX. Wang ET, Sui XH, ZhangXX. *Mesorhizobium muleiense* sp. nov., nodulating with *Cicer arietinum* L. Int J Syst Evol Microbiol. 2012b; 62 : 2737-2742.

Zhang ZB, Zeng QG, Yan RM, Wang Y, Zou ZR, Zhu D . Endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* LF70 from *Huperzia serrata* produces Huperzine A. World J Microbiol Biotech. 2011 ; 27: 479-486.

Zheng WT, Li Y, Wang R, Sui XH, Zhang XX, Zhang JJ, Wang ET, Chen WX. *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus*. Int J Syst Evol Microbiol. 2013; 63: 2002-2007.

Zhou PF, Chen WM, Wei GH. *Mesorhizobium robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia*. Int J Syst Evol Microbiol. 2010; 60:2552-2556.

Zurdo-Piñeiro JL, Rivas R, Trujillo ME. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57: 784-788.

<http://www.plante-botanique.org/biologie-04-0.le-systeme-racinaire/2014>

<http://www.psmicrographe.co.uk/2010>

Annexes

Annexe 1 : Milieux de culture

Milieu liquide YMB (Yeast Mannitol Broth, Vincent, 1970)

Mannitol	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extrait de levure	1 g
H ₂ O distillée	1.0 litre

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 121°C.

Milieu gélosé YMA (Yeast Mannitol Agar)

YMB 1.0 litre

Agar 15 g

Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

Potato dextrose agar (PDA)

Pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml

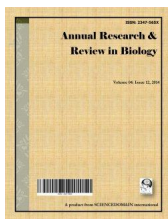
Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min

Gélose au lait

Gélose nutritive additionnée à un volume de lait stérile

CAS et perchlorate de fer

CAS	0,012g/l
perchlorate de fer	0.0027g/10ml



Inhibitory Effect of Rhizobia Isolated from Several Leguminous against Phytopathogenic Fungi

Lina Kanouni^{1*}, Larbi Larous¹ and Samia Mezaache-Aichour¹

¹*Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat ABBAS Sétif 1, Sétif, Algérie.*

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Author LL designed the study; author LK performed the statistical analysis, wrote the protocol, and wrote the first draft of the manuscript. Author SMA managed the analyses of the study and the literature searches. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/ARRB/2018/38161

Editor(s):

- (1) Paola Angelini, Department of Applied Biology, University of Perugia, Perugia, Italy.
(2) George Perry, Dean and Professor of Biology, University of Texas at San Antonio, USA.

Reviewers:

- (1) Aqleem Abbas, The University of Agriculture Peshawar, Pakistan.
(2) Dusit Athinuwat, Thammasat University, Thailand.
(3) Fatih Kalyoncu, Manisa Celal Bayar University, Turkey.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history/22842>

Original Research Article

Received 26th October 2017
Accepted 15th January 2018
Published 25th January 2018

ABSTRACT

Aims: This study was carried out to evaluate the antagonistic effect of ten isolated characterized *Rhizobium* sp. and three referenced strains against aggressive phytopathogenic fungi *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Humicola* spp. and *Cladosporium* spp. isolated from infected and wilted plants *in vitro* and *in vivo*.

Study Design: First, we have ten strains of rhizobia isolated from leguminous and characterized, after that, some strains of fungi were isolated from infected and wilt plants, such as *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Humicola* and *Cladosporium*. Finally, The investigation of the potential of the isolated rhizobia and three referenced strains was evaluated in dual culture, in pots experiments and on seeds.

Place and Duration of Study: The study was carried out at the Department of Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, Laboratory of Applied Microbiology, between April and November 2016.

*Corresponding author: E-mail: lina.kanouni@yahoo.com;
E-mail: mezaic2002@gmail.com;

Methodology: Rhizobia isolates were identified upon their phenotypic traits as: the morphology of the colony, of the physiological characters (growth temperature, salt tolerance, resistance to antibiotics, metabolism of carbon source, generation time...) and also the production of extracellular metabolites as siderophores and proteases. Fungal isolates were identified by their macroscopic and microscopic characters. The antagonistic effect of rhizobia against phytopathogenic fungi was examined *in vitro* by: confrontation in Petri dishes and inoculation of seeds; and *in vivo* by inoculation of plants.

Results: The isolated rhizobia were resistant to penicillin and amoxicillin with generation time ranged from 1.9 to 6.4 h, they were able to grow at temperatures from 4°C to 37°C, tolerate salt concentration (0.5 –2%) and produce siderophores and proteases. The results demonstrated the effectiveness of the rhizobia isolates and the referenced strains against the fungi isolates *in vitro* and *in vivo*. In dual culture, all rhizobia isolates inhibited the mycelial growth of the pathogens. The best disease control was obtained with isolate F3 from faba bean which inhibited the fungal growth with more than 70%. The highest inhibition growth was obtained against *Alternaria* spp.2, *Penicillium* spp.2, *Cladosporium* spp. and *Humicola* spp. with an inhibition rate ranging from 90 to 96%. In pot experiments, Rhizobia isolates from chickpea, lentil and faba bean reduced significantly all disease incidence with more than 75%; where the best fight was observed in lentil plants, while in faba bean no wilted plants were observed. Seeds inoculated with rhizobia and fungi in Petri dishes showed that isolates from faba bean and lentil were the most effective in reducing fungi disease incidence.

Conclusion: Rhizobia have a high potentiality to inhibit the growth of tested pathogens and could be fielded within an integrated disease management package.

Keywords: Biological control; leguminous; phytopathogenic fungi; *Rhizobium*; seeds treatment.

1. INTRODUCTION

Fungi are pre-eminent as plant pathogens. Roughly 70% of all the major crop diseases are caused by fungi (Oerke, 2006). Phytopathogenic fungi infect all aerial plant parts and destroy different agricultural crops. A large number of phytopathogenic fungal species have been described such as *Alternaria*, *Fusarium* and *Penicillium* [1].

These fungi became problematic because of the lack of effective control means, such as chemical products or some cultural practices (fumigation, seeds treatment, crop rotation,...) or the use of resistant plant varieties as insertion of genes or Genetically Modified Organisms... [2,3], while they were considered uneconomic, with harmful impact on environment. So it is important to find other control approaches which will make it possible to continue to fight against phytopathogens and decreasing the use of chemical products as it would be a cheaper method. Biological control of fungi by antagonistic agents constitutes an alternative method to control plant diseases. Microorganisms that can grow in the nodule of leguminous are ideal to be used as biocontrol agents, and can be protect host plants against pathogens attack [4,5]. In the last decade the

Rhizobium group have shown to play a major role in plant pathogenic fungi biocontrol with a great potential [6]. The *Rhizobium* group, have been used successfully against several pathogens belonging to the genera *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Ascochyta*, *Botrytis* and *Aspergillus* [7,8,9,10,11,12].

Microbial biocontrol agents may act against plant pathogens by three different ways: competition for space and/or nutrients [13], direct antagonism by antibiotics, enzymes and siderophores [7,14]; or induction of host plant defense mechanisms [15,16].

The objective of this study was to evaluate the potential of *Rhizobium* sp. strains isolated from leguminous species to control phytopatogenic fungi.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacterial Strains

The thirteen rhizobia isolates used in this study were recovered from nodules of leguminous grown in soils from different sites in Algeria. Three referenced isolates, *Rhizobium Sullae* sp., *Rhizobium Sullae* RHF and *Rhizobium*

leguminosarum were isolated from *Hedysarum* and chickpea, these strains were gifted by Professor Benguedouar (University of Constantine, ALGERIA). These can grow between 4 and 50°C and tolerate salt from 0.5 to 2%. One isolate F3 was isolated from faba bean field from M'sila, and nine strains were isolated from root nodules of Pea, lentil, faba bean and chickpea collected from experimental farm of Sétif 1 University (Algeria).

2.2 Isolation of Rhizobia

First ten *Rhizobium* were isolated and selected from faba bean, chickpea, pea and lentil roots. Nodules were detached from roots, washed in tap water to remove the adhering soil particles, and then nodules were dipped in alcohol followed by washing with 0.1% mercuric chloride (HgCl₂) solution for 30 s. Later the nodules were washed successively four times with sterilized distilled water and crushed with sterilized glass rod to obtain a milky suspension. An aliquot of this suspension was plated on Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA) and incubated at 28°C for 72 h, then purified with several sub culturing on the same medium. The isolates were conserved and kept on YEMA medium containing 3 g of CaCO₃ and stored at 4°C as source cultures [17].

2.3 Identification of the *Rhizobium* Strains

2.3.1 Morphological and physiological characterization

Colony morphology was characterized on YEMA according to [18], on the base of to the color, shape and Gram staining. While physiological characterization was determined as follows; by studying the use of carbon sources, the effect of temperature and salinity, the resistance to antibiotics, the time of generation and the production of proteases and siderophores.

2.3.2 Temperature tolerance

The ability of bacterial strains to grow at high and low temperatures was monitored at 4, 37 and 50°C on YEMA plates as described by [19] and [20]. The control plate was incubated at 28°C.

2.3.3 Salt tolerance

For salt tolerance, the YEMA medium was supplemented with NaCl at 0.5, 1 and 2%, and

growing isolates were observed after 72 hour at 28°C. While YEMA control contained 0.1% of NaCl [21].

2.3.4 Intrinsic antibiotic resistance

The intrinsic resistance was determined on YEMA containing the following antibiotics; ampicillin, penicillin G and amoxicillin. Each antibiotic was aseptically added to sterile YEMA medium at a concentration of 100 µg.ml⁻¹, inoculated with bacteria and incubated for 3 days at 28°C. Control plates contained no antibiotics [22].

2.3.5 Carbon substrate

Three carbon sources used by bacteria were tested on YEMA, where mannitol has been replaced by glucose, galactose or saccharose. The growth was observed after 3 days of incubation at 28°C [23].

2.3.6 Generation time

Generation time was determined by inoculating rhizobial isolate in 50 ml sterilized YEM broth and incubated at 28°C for 24 h with stirring at 150 rpm. The growth in term of turbidity was measured by taking the absorbance of the culture sample at 610 nm every 2 h, and generation time was calculated using the following formula:

$$\text{Generation time} = (T_2 - T_1) / 3.3 (\log_{10} \text{OD}_2 - \log_{10} \text{OD}_1)$$

Where (T₂-T₁) is the difference of two time intervals at any two point in log phase in growth curve; (log₁₀ OD₂- log₁₀ OD₁) is the difference between the log₁₀ value of OD₂ at time T₂ and OD₁ at time T₁ [24].

2.3.7 Production of proteases

Production of proteases was tested by inoculation of *Rhizobium* on milk agar medium and incubated at 28°C for 72h. The presence of a halo zone around the colony revealed positive protease. Protease production reflects the antagonistic activity of *Rhizobium* [25].

2.3.8 Production of siderophores

Siderophore production was highlighted using 50 ml of solution of Chrome Azurol Sulfate CAS [26] in 2.5 ml Ferric perchlorate reagent, poured onto rhizobia plates, orange color would appear

if the test is positive or blue if the test is negative [27].

2.4 Fungal Isolation

Fungal strains were isolated from infected plants showing diseases symptoms: wheat, olive, almond, eucalyptus, faba bean, quince, raspberry, grape, ivy and violet flowers collected from Sétif (east) and Béjaia (north-east of Algeria). Tissue sections were surface-disinfected by immersion in 5% sodium hypochlorite solution for 30s then rinsed twice in sterile distilled water, dried on sterile filter paper and placed onto potato dextrose agar (PDA) in 9-cm Petri dishes. Dishes were incubated at 28°C for 7 days. Fungal cultures of the pathogens were purified and stored in tubes containing PDA at 4°C. The isolates were identified morphologically from microscopic and macroscopic characters according to [28].

2.5 *In vitro* Antagonistic Activities against Phytopathogens

The antagonistic effect of the selected strains in addition to the referenced strains towards fungi was estimated *in vitro* by confrontation, and *in vivo* in pots experiments and on seeds.

In vitro inhibition of fungal mycelia growth by the bacterial isolates was tested using the dual culture technique described by [29] and [30]. Four discs from 72h culture of rhizobia were equidistantly placed on the margins of PDA plates and incubated at 28°C for 24 h, and then an agar disc of fungal mycelia from 7 days old cultures was placed at the center of the PDA plate and incubated at 28°C for seven days. Plates without bacteria containing only the fungus served as control.

Percent fungal growth inhibition was calculated using the formula of [31]:

$$\text{Inhibition (\%)} = (R - r / R) \times 100$$

Where *r* is the radius of the fungal colony opposite the bacterial colony and *R* is the maximum radius of the fungal colony in the control.

2.6 *In vivo* Antagonism of *Rhizobium* towards Fungal Isolates

All bacterial isolates which induced more than 50% inhibition of mycelia growth *in vitro* assay

were selected for the *in vivo* evaluation. The experiments *in vivo* were performed as follows.

Chickpea, pea, lentil and faba bean seeds surface were sterilized with 5% sodium hypochlorite for 1 min and rinsed five times with sterile distilled water, and soaked in distilled water for 1 h. Then seeds were inoculated with bacteria (10^8 ufc/ml, soaked in YEM liquid medium containing strains) and transplanted in plastic pots containing sterilized soil for 21 days.

After 21 days, plants were inoculated with pathogens by depositing some drops (3 to 4) of spore suspension (4×10^6 spore/ml) overall surface of three different leaves of each plant. Two batches of seeds were used. The first batch received rhizobia suspension (10^8 ufc/ml) and plants were inoculated with fungal spores (4×10^6 spore/ml), the second batch plants were inoculated with fungal spores only and watered as needed.

One to two weeks after leaves inoculation, virulence of the pathogen was evaluated as previously described by [32] from 0 to 4 where: 0 healthy plant (0%), 1 slight yellowing (25%), 2 high yellowing (50%), 3 wilting (75%) and 4 death (100%).

2.7 *In vitro* Seedling Germination Tests

An *in vitro* seedling assay was performed as previously described by [33] and [34], to test the ability of the *Rhizobium* sp. isolates to suppress the effect of fungal isolates on seedling germination. Seeds were sterilized as described earlier and then they were soaked in the 10^8 ufc/ml bacterial suspension. A total of 4 seeds were aseptically placed on plates with filter paper impregnated with sterile distilled water and incubated at 28°C for one day. One day after, seeds were inoculated with some drops of spore suspension (4×10^6 spores.ml-1), after 7 days of incubation at 28°C the degree of root necrosis was scored as previously described by [35] from 0 to 4 where:

0 healthy seedlings (0%), 1 necrosis of the extremity (25%), 2 root cutting (50%), 3 reduction of cotyledon (75%), 4 severe necrosis (100%).

All the tests in this work were in triplicate.

2.8 Statistical Analysis

Data were analyzed by the one way analysis of variance (ANOVA) for comparing means of 3 or

more treatments/doses, to estimate the effects of rhizobia on fungi inhibition and to avoid the error. The test with $P < 0.05$ was considered as statistically significant. This was followed by Fisher's test when the number of treatments was under than 5 and over 2 (leaf and seed treatments).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Results

3.1.1 Physiological characteristics

3.1.1.1 Morphological Characteristics of rhizobia

The isolates are Gram-negative and rod shaped. Colonies are circular translucent yellow to creamy, raised with smooth edges, slimy, and did not absorb red color when cultured in YEMA containing Congo red.

3.1.1.2 Determination of growth temperature

Maximum growth of all tested strains was ranked between 4° and 37°C, the percentage of isolates that grew decreased to reach 30% at 50°C. Although 70% of the isolates that tolerated 4 to 50°C were isolated from faba bean, while other strains (from pea, lentil and chickpea) were able to grow between 4 and 37°C.

3.1.1.3 Determination of carbon sources

Most of the isolated rhizobia strains were able to use the tested carbon substrates. All tested strains grew on glucose, galactose and saccharose.

3.1.1.4 Determination of salt tolerance

Chickpea, pea, faba bean and lentil rhizobia exhibited a wide diversity in their salt tolerance and all isolates grew on the medium containing 0.1% of NaCl. All the tested rhizobia continue to grow between 0.5 to 2% of NaCl.

3.1.1.5 Determination of antibiotic resistance

The evaluation of resistance of rhizobia to antibiotics showed that most of the isolates exhibited high resistance to penicillin G and amoxicillin. In the presence of ampicillin 70% of isolates were resistant. Eighty eight to 92% of rhizobia from faba bean, pea, lentil and chickpea were resistant to the tested antibiotics. Almost 67% of chickpea and faba bean strains were resistant to ampicillin.

3.1.1.6 Time generation, production of proteases and siderophores

The isolates have doubled their population between 1.9 and 6.4 h (Table1). On the basis of their generation times, 92% of the isolates were considered as fast growers (GT < 6 h), and 08% as slow growers (GT > 6 h).

Several isolates show a translucent haloes on milk agar corresponding to proteolytic activity (Table 1). Otherwise all of the isolates showed orange haloes indicating siderophores production.

3.1.2 Fungi characteristics

The cultural and microscopic characteristics (Fig. 1) of fungal strains indicate that the isolated pathogenic fungi belong to different genera: two species of *Alternaria* spp., two species of *Fusarium* spp., two species of *Penicillium* spp., one species of *Cladosporium* spp., one *Humicola* spp. and one *Aspergillus* spp.

3.1.3 In vitro antifungal activity of rhizobia

Different results and behavior were obtained according to each antagonist-pathogen combination (Table 2). The highest inhibition growth was 90 to 96% obtained with faba bean isolates against *Alternaria* spp. 2, *Penicillium* spp.2, *Cladosporium* spp. and *Humicola* spp., whereas no inhibition growth (0%) was observed

Table 1. Generation time and production of protease and siderophores by strains of Rhizobia

Strain	A6	Sam12	F	F ₃	F _{2m}	Fmd	P	P ₃	Pd	Pcx	Pcd	Pc ₃	L
Gt(h)	2.22	3.46	2.78	2.39	4	2.9	5.18	5.3	3.1	1.98	6.41	2.8	5.2
Protease	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Siderophore	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): production, (-): no production, Gt(h): generation time in hour; A6, F, Sam12 are referenced strains from respectively *Hedysarum* and chickpea; F₃, F_{2m} and Fmd: strains from faba bean; P, P₃ and Pd: strains from pea; Pcx, Pcd and Pc₃: strains from chickpea; L: strain from lentil.

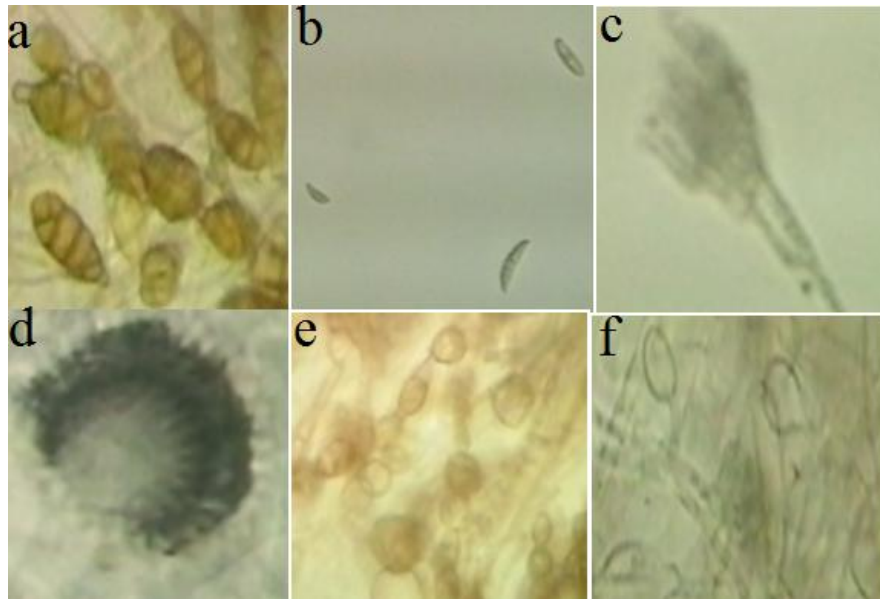


Fig. 1. Microscopic characteristics of fungi isolates

a. *Alternaria* spp., b. *Fusarium* spp., c. *Penicillium* spp., d. *Aspergillus* spp., e. *Cladosporium* spp., f. *Humicola* spp.

against *Penicillium* spp.2 with one isolate from pea (Pd) and two isolates from chickpea (Pcx and Pc3).

The F_3 strain from faba bean showed a significant reduction in growth of all fungal strains by an average percentage of 70%, however inhibitory effect of the pea strain Pd was only 42%.

In the other hand, the best average reduction percentages of fungal growth by all rhizobia were found against *Alternaria* spp. 2 and *Humicola* spp. (77%). The lowest percentages were found against *Fusarium* spp.2 and *Penicillium*, 41-44% respectively. The referenced strains A6 and F isolated from *Hedysarum* inhibited respectively *Penicillium* spp.2, *Humicola* spp. and *Fusarium* spp.1 from 52% to 95%. The average percentage of all mycelial growth inhibition induced by the rhizobial isolates in dual culture test was 60%.

3.1.4 In vivo antagonism of rhizobium towards fungi

Almost 75% of chickpea plants inoculated by chickpea rhizobia and faba bean plants inoculated by faba bean rhizobia looked healthy showing no symptoms. Almost 20% of plant showed yellowing color in chickpea caused by *Aspergillus* spp. and *Cladosporium* spp., also

25% with black color in faba bean caused by *Fusarium* spp.1, *Penicillium* spp.2 and *Humicola* spp., while 5% of wilting by *Alternaria* spp.2 and *Fusarium* spp.1 appeared in chickpea but no wilt in faba bean (Figs. 2 and 3).

In our study, almost 35 % of pea rhizobia protected completely the host plants. While 45% of plants looked yellow, caused by *Alternaria* spp.1, *Fusarium* spp.1 and *Humicola* spp., and 20 % of wilting caused by *Alternaria* spp.2 and *Humicola* spp. (Fig. 4). However, the referenced strains A6 and F isolated from *Hedysarum* showed the best results in chickpea, faba bean and lentil but fail to protect pea plants (Fig. 5).

3.1.5 In vitro antagonism of Rhizobium towards fungi inoculated on seeds

Rhizobia isolates had variable and significant effect on germination of chickpea, pea, faba bean and lentil seeds inoculated with spore suspension. Interestingly, application of *Rhizobium* sp. isolates significantly reduced the wilting. Disease in inoculated seeds with *Fusarium* spp.1, *Cladosporium* spp. and *Humicola* spp. was significantly reduced and the inhibition rate varied from 16 to 90% (Figs. 6 to 9) with the best suppression of fungi observed in faba bean (90%) and lentil (81%).

Table 2. Inhibition percentage of phytopatogenic fungi by rhizobia

Fungi	Bacteria	A6	Sam12	F	F₃	F_{2m}	Fmd	P	P₃	Pd	Pcx	Pcd	Pc₃	L	APIB
<i>Alternaria</i> spp.1		63	72	61	65	55	65	66	65	69	62	74	70	58	65
<i>Alternaria</i> spp.2		75	87	72	95	90	82	77	77	77	75	70	50	85	77
<i>Fusarium</i> spp. 1		62	67	85	72	62	67	62	75	62	65	50	87	80	68
<i>Fusarium</i> spp. 2		50	50	52	35	50	52	57	25	97	32	50	37	15	41
<i>Penicillium</i> spp.1		22	55	37	44	44	77	20	40	33	55	44	37	55	43
<i>Penicillium</i> spp.2		95	24	52	60	20	44	84	96	0	0	72	0	32	44
<i>Cladosprium</i> spp.		16	70	29	91	91	16	37	25	33	58	70	91	83	54
<i>Humicola</i> spp.		85	75	75	95	92	90	92	82	0	77	80	75	92	77
<i>Aspergillus</i> spp.		67	75	59	78	72	75	60	40	70	70	74	81	69	68
APIF		59	63	63	70	64	63	61	58	42	54	64	58	63	60

APIF: Average percentage of inhibition of each fungi; APIB: Average percentage of inhibition of each bacteria; F₃, F_{2m} and Fmd: strains from faba bean; P, P₃ and Pd: strains from pea; Pcx, Pcd and Pc₃, Sam12: strains from chickpea; L: strain from lentil; A6 and F: strains from Hedyasurum and they are referenced strains with Sam12.

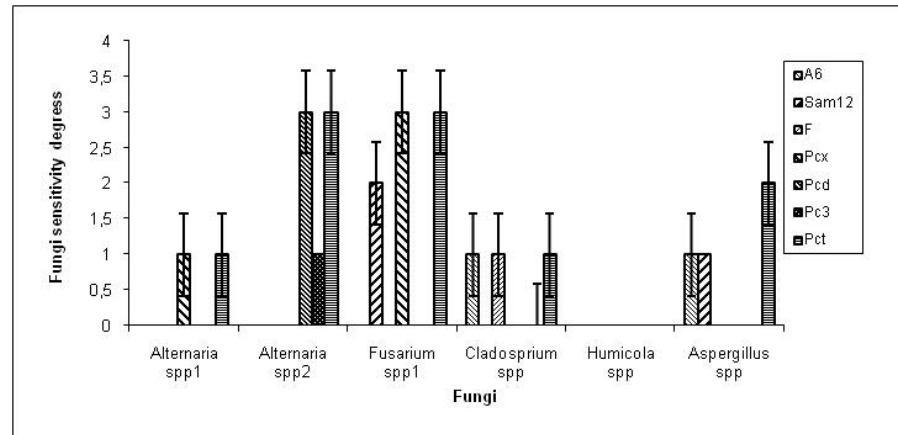


Fig. 2. Effect of rhizobia on chickpea wilt incidence

0: healthy plant, 1: slight yellowing, 2: high yellowing, 3: wilting; Pcx, Pcd and Pc₃: strains from chickpea; A6, F and Sam12: referenced strains respectively from Hedyasurum, and chickpea; Pct: control plant of chickpea.

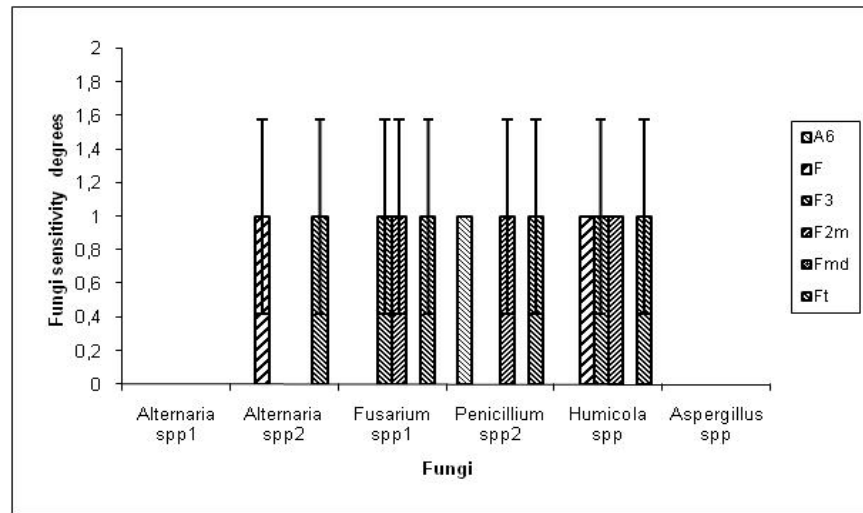


Fig. 3. Effect of rhizobia on fababean wilt incidence

0: healthy plant, 1: slight yellowing, 2: high yellowing, 3: wilting; F₃, F_{2m} and F_{md}: strains from faba bean; A6 and F: referenced strains respectively from Hedyasurum; Ft: control plant of faba bean.

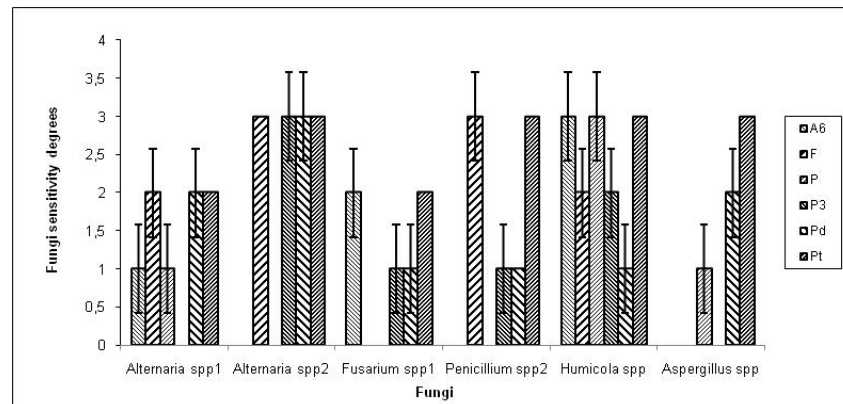


Fig. 4. Effect of rhizobia on pea wilt incidence

0 healthy plant, 1 slight yellowing, 2 high yellowing, 3 wilting; P, P3 and Pd: strains from pea; A6 and F: referenced strains from Hedyasurum, Pt: control plant of pea.

3.2 Discussion

Plant pathogens especially fungi are the most important agents causing serious losses worldwide to agricultural products. Biological control is the most promising and viable method using microbial agents to suppress diseases [36]. Rhizospheric microorganisms are perfect for use as biocontrol agents; since the rhizosphere adduces the front-line defense for roots against pathogenic fungi.

The present study was conducted to isolate efficient fungal inhibitory rhizobia from leguminous. Rhizobia have special physiological

characteristics. [37] Mentioned that *Rhizobium* strains failed to absorb Congo red stain. Polysaccharide production is another characteristic of rhizobia which is implicated in important processes as infection and nodule formation [38]. The isolated rhizobia were viscous, because of exo-polysaccharides production. There would be formation of long viscous filaments [39,40]. Polysaccharides are involved in the protection of rhizobia against deleterious biotic and abiotic stress factors in the soil [38] and in the protection of the nitrogenase against oxygen diffusion through the nodule cells [41].

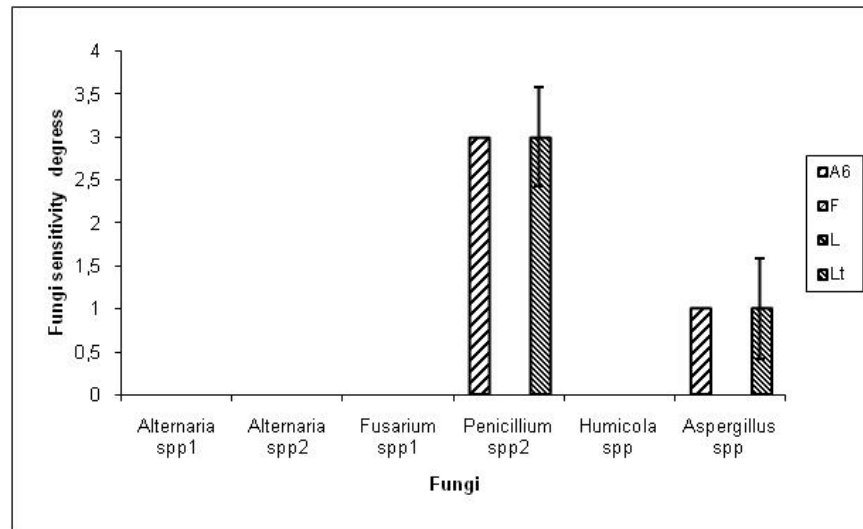


Fig. 5. Effect of rhizobia on lentil wilt incidence

0: healthy plant, 1: slight yellowing, 2: high yellowing, 3: wilting; A6 and F: referenced strains from *Hedysarum*; L: strain from lentil; Lt: control plant of lentil.

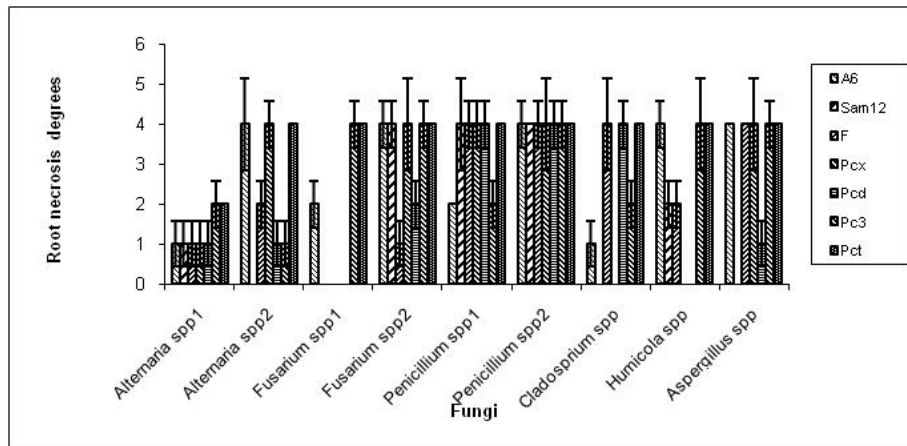


Fig. 6. Effect of *Rhizobium* inoculation on fungi suppression of chickpea seeds

0: healthy seedlings, 1: necrosis of extremity, 2: root cutting, 3: reduction of cotyledon, 4: severe necrosis; A6, F and Sam12: referenced strains respectively from *Hedysarum* and chickpea; Pcx, Pcd and Pc3: strains from chickpea; Pct: control of chickpea.

[19] found that generation times (GT) in rhizobia of chickpea was ranged from 50 min till 9 hours, while GT for isolates obtained from chickpea in our study were ranked from 1.98 to 6.41h. [42] reported a GT between 1 and 8 h in *Mesorhizobium*. [43] showed that GT of *Sinorhizobium* is ranked between 3 and 5 h, that why some of our isolates (Sam12, F₂m, Pd) may belong to *Mesorhizobium* or *Sinorhizobium* according to their GT. Whereas, [37] showed that GT of rhizobia strains isolated from *Acacia* legume tree growing in South Riyadh, is ranged between 2.07 and 3.85 h. The GT for the tested strains (A6 and F) from *Hedysarum* a legume

tree growing in Algeria were 2.22 and 2.78 h respectively. Moreover, GT for our isolates from faba bean were similar to those of [44], where they detected in faba bean isolates a GT of 1.9 to 4.3 h. Also [24] found that root nodulating bacteria isolated from pea plant had an average GT between 3.0 to 3.6 h; while our strains have a GT between 3.1 to 5.3. High amount of EPS production is mostly by the fast growing strains and lowest amount produced by the slow growing strains. However, intermediate values were also obtained with few fast and slow growing strains [41].

Several studies showed that *Rhizobium* can grow at 45°C and more [45,46,47,48]. However [37,44] noted that rhizobia isolates grew at temperatures from 15 to 35°C, while [49] showed that some rhizobia were also able to grow at 4°C (55%) and at 55°C (22%), few isolates of rhizobia grew at temperatures of 5 and 10°C [44,50]. Earlier [51] suggested that rhizobial strains isolated from hot areas might be able to survive at high temperatures better than the strains isolated from cooler regions. The regions of isolation of our rhizobia are hot (Temperatures for Sétif and M'sila are ranked from 38 to 44°C) that why our isolates tolerate high temperatures.

Biocontrol agents are more efficient in the inhibition of the mycelial growth from the same agro-ecological origin [52]. Earlier [4] rules that rhizobacteria is most effective in the control of plant diseases affecting the host plant of these.

The inhibition rate of the tested rhizobia in our study was more than 80% against *Fusarium* spp.1 and 90% against *Alternaria* spp.2 (Table 2). *R. leguminosarum* have a lethal effect on the conidies of *Fusarium oxysporum* [13]. [6] Showed tip deformation, abnormal intercalary swelling, cytoplasm degeneration and hyphae lysis in pathogenic fungi such as *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*, during interaction with rhizobia. In another way, [53] showed that among the 21 isolates of *Rhizobium* examined from chickpea, 19 prevented the growth of *Fusarium oxysporum*, fourteen gave inhibition more than 30% and four more than 50% inhibition of growth *in vitro*. [54] found that rhizobia inhibit *Fusarium* in wheat with more than 60%, also [9] reported an inhibition of 36% of *Fusarium* sp. and 54% of *Alternaria alternata*.

The basic mechanisms behind such a protection may be due in part to the produced metabolites cited previously (Table 1). Rhizobia may act by some way of competition for nutrients by displacing the pathogens [7] as iron by production of siderophores [6,8,41] due to lack of iron required for "sclerotia" germination and hyphal growth [55] secretion of antibiotics [6,8] HCN [6] [55] antifungal [56] direct parasitism by proteases acting as cell wall degrading enzymes [8]; or influence of the plant defense mechanism by stimulating the production of phytoalexins [6] or phenolic compounds by plants. These latter

are the determinants of ISR in Rice induced by *Rhizobium* against pathogenic attack of *Rhizoctonia solani* [56]. ISR was also obtained by co-inoculation of *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium leguminosarum* in faba bean (*Vicia faba* L.) against faba bean yellow mosaic virus [57]. Otherwise, induced systemic resistance was attributed to LPS produced by *Rhizobium elti* in potato plants infected by the Cyst Nematode *Globodera pallida* [58]. Different studies underline the potential of the bacterial antagonists by the suppression of plant disease and inducing mechanisms of plants defense [9,59,60,61,62].

Rhizobium leguminosarum from bean was the most effective isolate on three fungal genera with percent inhibitions ranged between 14.65 and 16.03% for *Rhizoctonia solani* isolates, 14.62 to 30.35% for *Pythium ultimum* isolates and 14.58 to 29.75% for *Fusarium oxysporum* isolates [8]. [7] showed that two rhizobia isolates were able to inhibit a widely occurring plant pathogen; *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot in groundnut by siderophores production. Also *Rhizobium meliloti* inhibited the growth of *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* *in vitro* [63]. Other experiments showed that strains of rhizobia were able to prevent growth of *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* [64].

Rhizobium strains of chickpea tested *in vitro* prevent *Rhizoctonia solani* growth and reduce their development from 50% to 70%, with observed inhibiting halo that suggest the presence of fungistatic metabolites secreted and change of mycelial color between the end and the center of the colony of *Rhizoctonia solani*. While microscopic observations revealed the deformation of their apex [65]. Similar results were observed in our study with strain F_{2m} from faba bean against *Cladosporium* spp. [10] showed that *Rhizobium leguminosarum* had antagonistic effect on *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora megasperma* by 66.3 and 62.1%, respectively. However an isolate of *Rhizobium leguminosarum* in our study inhibited *Fusarium* spp. by 50 to 67%. In the same way *Rhizobium* isolates inhibited the strongly growth of *Ascochyta pisi* moderately *Botrytis cinerea* and only slightly *Fusarium graminearum* [11] and also the growth of *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* [12].

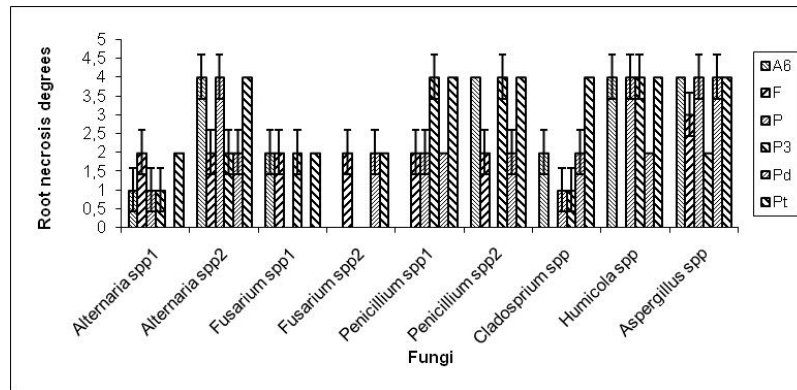


Fig. 7. Effect of *Rhizobium* inoculation on fungi suppression of pea seeds

0: healthy seedlings, 1: necrosis of extremity, 2: root cutting, 3: reduction of cotyledon, 4: severe necrosis; A6 and F: referenced strains from Hedyasurum; P, P₃ and Pd: strains from pea; Pt: control of pea.

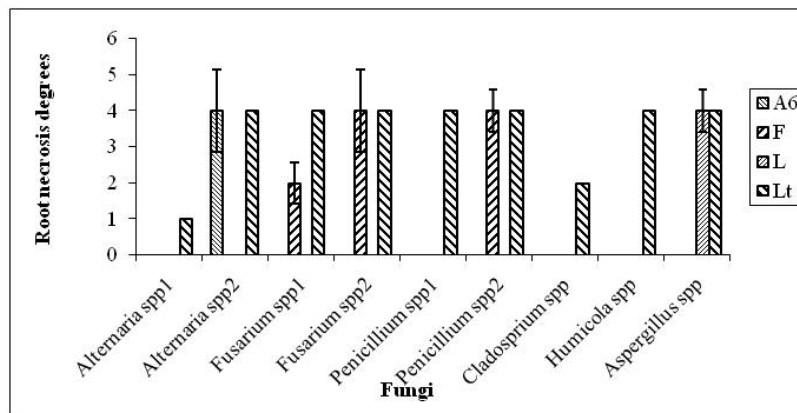


Fig. 8. Effect of *Rhizobium* inoculation on fungi suppression of lentil seeds

0: healthy seedlings, 1: necrosis of extremity, 2: root cutting, 3: reduction of cotyledon, 4: severe necrosis; L: strain from lentil; A6 and F: referenced strains from Hedyasurum, Lt: control of lentil.

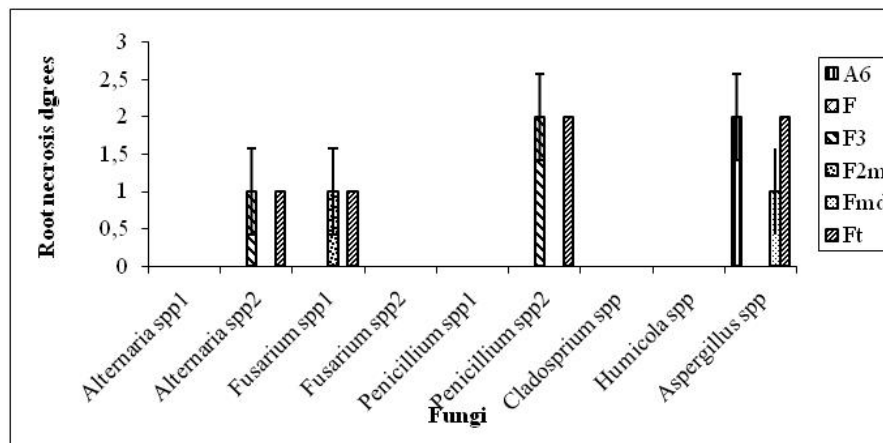


Fig. 9. Effect of *Rhizobium* inoculation on fungi suppression of faba bean seeds

0: healthy seedling, 1: necrosis of extremity, 2: root cutting, 3: reduction of cotyledon, 4: severe necrosis; A6 and F: referenced strains from Hedyasurum; F₃, F_{2m} and Fmd: strains from faba bean; Ft: control of faba bean.

Several studies noted benefits of the rhizobia on the growth of plants and reduction of diseases incidence [66,67]. [68] reported that treatment of broad bean seeds with *Rhizobium leguminosarum* resulted in significant reduction in damping-off caused by different fungal pathogens such as *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Rhizobium* species significantly reduced fusarial foot [69] and root rot in chickpea [69,70,71] in common bean [70,71]; wilt in chickpea and bush bean [53,72].

Also, the results of [60] indicate that five strains of rhizobia inhibited *Rhizoctonia solani* in chickpea whose looked healthy with no symptoms and the inhibition of the fungi growth by some isolates of *Rhizobium* varied from 60 to 87%. In addition, *Rhizobium leguminosarum* reduced disease severity of *Phytophthora megasperma*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and *Sclerotium rolfsii* by 52.9, 50, 67.9 and 52%, respectively [10]. Also *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina* and their interaction with rhizobia, in pots, improved seed germination percentages and reduced the root rot disease index significantly [73]. The best disease control almost 90% was obtained with isolate from lentil (L) on lentil plants (Fig. 5). [74] have shown that the wilting index was 2 when lentil plants pathogen-inoculated were treated with *Rhizobium* sp.

F3 inhibited in dual culture *Alternaria* spp. 2 and *Humicola* spp. growth with more than 90%, and was also effective *in vivo*. Pc3 showed similar results *in vivo* against *Cladosporium* spp. However the isolate P from pea was mostly performing *in vitro* than *in vivo* (Table 2 and Fig 4). In contrast to the isolate Pd which was better *in vivo* than *in vitro*. Experiments of [53] indicated that four isolates of rhizobia were effective *in vitro* but were completely or partially ineffective *in vivo*. On the other hand, they observed that two of the isolates carried out better *in vivo* than *in vitro*. Our results would be in agreement with the idea that antagonistic micro-organisms carrying out are best *in vitro* but not *in vivo* and vice versa [75].

The treatment of seeds by rhizobia and fungal pathogen *in vitro* is not studied despite of their importance. In our work seeds necrosis varied from 10 to 45% according to the tested pathogen *Fusarium* spp. 2, *Penicillium* spp.1, *Penicillium* spp. 2 and *Aspergillus* spp. [65] found that the isolates of rhizobia have a variable and a

significant effect on the germination of chickpea seeds inoculated with *Rhizoctonia solani*. The percentage of germination varied from 40 to 90%. These rhizobia improve seeds germination of chickpea and reduce necrotic root with 80%. However, few studies have been carried out on the effect of rhizobial strains and phytopathogenic fungi on seeds germination *in vitro*.

In addition to the nitrogen supply Rhizobia promote growth of the plant as a symbiotic partner in several ways, such as mobilization of nutrient, enhancement in stress resistance, solubilization of phosphates, production of phytohormones and siderophores. Siderophores act as iron source for the plant under iron depleted conditions [41] Siderophore production for rhizosphere colonization has also been recorded as one of the important mechanism by certain PGPRs (*Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum* and *Sinorhizobium meliloti*) [76,77] to promote plant growth activity. Some of them have been earlier reported as bio-fertilizers as: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* [78].

Increased population of *Mesorhizobium loti* MP6 in the rhizosphere reflects its potentiality to use root exudates as energy source which facilitate its rhizosphere colonization. The antagonistic nature and relative adherence give MP6 the protection during fungal infection that helps in establishing and resisting against preexisting deleterious microorganisms occupying the microbial niche in the rhizosphere [55]. On the other hand, *Rhizobium* protect non-host/non-nodulating plants (rice) against pathogenic fungi (*R. solani*), and increase their productivity [56].

4. CONCLUSION

In accordance with the obtained results from all the conducted tests, we concluded that *Rhizobium* isolated from the east of Algeria provides a high level of protection against the studied pathogenic fungi belonging to different genera, without specificity. Furthermore *Rhizobium* would be a good element to reduce infestation and the use of these strains will help farmers at combating diseases in field and to prevent fungal attack.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the Ministry for Higher Education and Scientific Research of ALGERIA for the financial support.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Broggi LE, González HHL, Pacin SLRYA. *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina. *Iberoam Micol.* 2007;24: 47-51.
2. Rubiales D, Alcantara C, Pérez-de-luque A, Gil J, Sillero JC. Infection by crenate broomrape (*Orobancha crenata*) in chickpea (*Cicer arietinum*) as influenced by sowing date, weather conditions and genetic resistance. *Agronomie.* 2003;23: 359–362.
3. Abbas Z, Sellami F, Amri M, Kharrat M. Effect of Sowing Date on *Orobancha foetida*, Infection and Seed Yield of Resistant and Susceptible Faba Bean Cultivars. *Acta Phytopathol Entomol Hung.* 2010;45:267–275.
4. Weller DM, Homei WJ, Sok RJ. Relationship between *in vitro* inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and suppression of take-all of wheat by *fluorescent Pseudomonad*. *Phytopathology.* 1988;78:1094-1100.
5. Bowen GD, Rovira AD. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv Agron.* 1999;66:1-102.
6. Deshwal VK, Pandey P, Kang SK, Maheshwari D K. Rhizobia as biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi. *Indian J Exp Biol.* 2003;41:1160-1164.
7. Arora NK, Kang SC, Maheshwari DK. Isolation of siderophore producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Curr Sci.* 2001;81:673-677.
8. Ozkoc I, Deliveli MH. *In vitro* inhibition of the mycelial growth of some root rot fungi by *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* isolates. *Turk J Biol.* 2001;25: 435-445.
9. Sharif T, Khalil S, Ahmad S. Effect of *Rhizobium* sp. on growth of pathogenic fungi under *in vitro* conditions. *Pak J Biol Sci.* 2003;6:1597–1599.
10. Ozgonen H, Gulcu M. Determination of mycoflora of pea (*Pisum sativum*) seeds and the effects of *Rhizobium leguminosorum* on fungal pathogens of peas. *Afr J Biotechnol.* 2011;10:6235-6240.
11. Akhter SH. Interactions between *Rhizobium*, antagonistic bacteria and fungal pathogens in fababean. Master's Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Forest Mycology and Plant Pathology. Swedish; 2014.
12. Vaishali A, PawarPooja R, Pawar Ashok M, Bhosale Sourabh V, Chavan. Effect of *Rhizobium* on Seed Germination and Growth of Plants. *J Acad Ind Res.* 2014; 3:84-88.
13. Essalmani H, Lahlou H. *In vitro* antagonistic activity of some microorganisms towards *Fusarium oxysporum* f.sp.*lentis*. *Cryptogamie-Mycol.* 2002;23:221-234.
14. Carrillo GC, Del Rosario VM. Comparative study of siderophore like activity of *Rhizobium phaseoli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Plant Nutr.* 1992;15:579-590.
15. Abdelaziz RA, Radwansamir MA, Abdel-Kader M, Barakat MA. Biocontrol of faba bean root-rot using VA mycorrhizae and its effect on biological nitrogen fixation. *Egypt J Microbiol.* 1996;31:273-286.
16. Pieterse C, van Pelt JA, van Wees SCM, Ton J, Léon-Kloosterziel KM, Keurentjes JJP, Verhagen, BWM, Knoester M, van der Sluis I, Bakker PAHM, van Loon LC. Rhizobacteria-mediated induced resistance: Triggering, signaling and expression. *Eur J Plant Pathol.* 2001;107: 51-61.
17. Vincent JM. A manual for the practical study of the root nodule bacteria, Oxford Edition; 1970.
18. Ahmad MH, RafiqueUddin M, McLaughlin W. Characterization of indigenous rhizobia from wild legumes. *FEMS Microbiol Lett.* 1984;24:197-203.
19. Maatallah J, Berraho, Sanjuan J, Lluch C. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie.* 2002;22:321–329.
20. Hung M, Bhagwath AA, Shen FT, Devasya RP, Young CC. Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiologia.* 2005;49: 577-584.
21. Sadowsky MJ, Keyser HH, Bohloul BB. Biochemical characterization of fast- and slow-growing rhizobia that nodulate

- soybeans. *Int J Syst Bacteriol.* 1983;33: 716-722.
22. Alexandre A, Laranjo M, Oliveira S. Natural populations of chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods. *Microb Ecol.* 2006;51:128-136.
23. Jordan DC. Family II. *Rhizobiaceae*. In, *Bergey's manual of systematic bacteriology*. I (eds. By N. R. Krieg and J. G. Holt Williams and Wilkins Co. Baltimore, M.D). 1984;232-242.
24. Deshwal V, Chaubey A. Isolation and Characterization of *Rhizobium leguminosarum* from Root nodule of *Pisum sativum* L. *J Acad Ind Res.* 2014;2:464-467.
25. Naik PR, Sakthivel N. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res Microbiol.* 2006;157:538-546.
26. Schwyn B, Neilands. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *J Anal Biochem.* 1987;160:47-56.
27. Carson KC, Holliday S, Glenn AR, Dilworth M J. Siderophore and organic acid production in root nodule bacteria. *Arch Microbiol.* 1992;157:264-271.
28. Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Professional Publishing. 2006;385.
29. Landa BB, Hervas A, Bethiol W, Jimenez-Diaz RM. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. *Phytoparasitica.* 1997;25:305-318.
30. Idris EES, Iglesias D, Talon M, Borriss R. Tryptophan dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefacien* sFZB42. *Mol Plant Microbe Interact.* 2007;20:619-626.
31. Whipps JM. Effect of media on growth and interaction between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytol.* 1987;107:127-142.
32. Omar I, O'Neill TM, Rossall S. Biological control of fusarium crown and root of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. *Plant Pathol.* 2006;55:92-99.
33. Mesterházy Á. Breeding wheat for resistance to *Fusarium graminearum* and *F. culmorum*. *Z. Pflzüchtung.* 1983;91:295-311.
34. Brennan JM, Fagan B, Van Maanen A. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *Eur J Plant Pathol.* 2003;109:577-587.
35. Rafin C, Tirilly Y. Characteristics and pathogenicity of *Pythium* spp. associated with root of tomatoes in soilless culture in Brittany. *Plant Pathol.* 1995;44:779-785.
36. Heydari A, Pessarakli M. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *J Biol Sci.* 2010;10:273290.
37. Shetta ND, Al-Shaharani TS, Abdel-Aal M. Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. *Am Eurasian J Agric Environ Sci.* 2011;10: 410-418.
38. Teixeira FCP, Borges WL, Xavier GR, Rumjanek NG. Characterization of indigenous rhizobia from caatinga. *Braz J Microbiol.* 2010;41:201-208.
39. Dupont I. Molecular Identification of strains of lactobacillus and comparison of the production of exopolysaccharides by three of these strains. Doctorate Thesis. Laval university, Département of Food science and nutrition, Canada; 1998.
40. Gharzouli R, Benahmed A, Benhizia Y, Benguedouar A. Influence of carbon source on the production of exopolysaccharides by *Rhizobium sulae* and on the nodulation of *Hedysarum coronarium* legume. *Afr J Microbiol Res.* 2012;6:5940-5946.
41. Bhargava Y, Murthy JSR, Rajesh Kumar TV, Narayana Rao M. Phenotypic stress tolerance and plant growth promoting characteristics of rhizobial isolates from selected wild legumes of Semiarid Region, Tirupati, India. *Adv Microbiol.* 2016;6:1-12.
42. Kamble PM, Singh A, Kshyap LR. Characterisation of intrinsic variability of *Mezorhizobium ciceri* isolates of cultivated fields. *Indian J Exp Biol.* 2006;44:671-674.
43. Abdelaziz RA, Al-Barakah FN, Al-Asmary HM. Genetic identification and symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti* indigenous to Saudi Arabian soils. *Afr J Biotechnol.* 2008;7:2803-2809.
44. Belay Z, Assefa F. Symbiotic and phenotypic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv.viciae- from Northern Gondar, Ethiopia. *Afr J Biotechnol.* 2011;10(21):4372-4379.

45. Nour SM, Cleyet-Marel JC, Normand P, Fernandez MP. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1995;45:640–648.
46. Abdelgadir AH, Alexander M. Procedures to enhance heat resistance of *Rhizobium*. Plant and Soil. 1997;188:93-100.
47. Graham PH, Vance CP. Legumes: Importance and constraints to greater use. Plant Physiol. 2003;131:872-877.
48. Legesse S, Assefa F. Symbiotic and phenotypic characteristics of rhizobia nodulating Faba Bean (*Vicia faba*) from Tahtay Koraro, Northwestern Zone of Tigray Regional State, Ethiopia. Int J Tech Enhanc Emerg Engin Res. 2014;2:15-23.
49. Berrada H, Nouioui I, Iraqui Houssaini M, EL Ghachtouli N, Gtar M, Fikri Benbrahim K. Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez. Afr J Microbiol Res. 2012;6: 5314-5324.
50. Ouslim S, Merabet, C, Boukhatem ZF, Bouchentouf L, Bekki A. Phenotypic and symbiotic diversity, of nodulating rhizobia associated with bean (*Vicia faba*) in West Algeria. Inter J Technol Enhance Emerg Engen Res. 2015;3:130-138.
51. Ahmad MH, Eaglesham ARJ, Hassouna S. Examining serological diversity of "cowpea rhizobia" by the ELISA technique. Arch Microbiol. 1981;130:281-287.
52. Abed H, Rouag N, Mouatassef D, Rouabhi A. Screening for *Pseudomonas* and *Bacillus* antagonistic rhizobacteria strains for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. Eurasian J Soil Sci. 2016;5(3): 182-191.
53. Arfaoui A, Sifi B, Boudabous A, El-Hadrami I, Cherif M. Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, The causal agent of *Fusarium* wilt of Chickpea. J Plant Patho. 2006;88:67-75.
54. Hmissi I, Gargouri S, Sifi B. Attempt of wheat protection against *Fusarium culmorum* using *Rhizobium* isolates. Tunis J Plant Prot. 2011;6:75-86.
55. Chandra S, Choure K, Dubey RC, Maheshwari DK. Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). Braz J Microbiol. 2007;38:128–130.
56. Mishra RPN, Singh RK, Jaiswal HK, Kumar V, Maurya S. *Rhizobium*-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). Curr Microbiol. 2006;52:383–389.
57. Elbadry M, Taha RM, EldougDoug KA, Gamal-Eldin H. Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. J Plant Dis Protect. 2006;113(6):247–251.
58. Reitz M K, Rudolph I, Schroder S, Hoffmann-Hergarten J, Hallmann RA, Sikora. Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. Applied and Environmental Microbiology. 2000;66(8):3515–3518.
59. Kloepper JW, Tuzun S, Kuc JA. Proposed definitions related to induced resistance. Biocontrol Sci Technol. 1992;2:349-351.
60. Perdomo F, Echavez B, Alamed M, Schroder EC. *In vitro* evaluation of bacteria for the biological control of *Macrophomina phaseolina*. World J Microbiol Biotechnol. 1995;11:183-185.
61. Ongena M, Daayf F, Jacques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz TC, Cornélis P, Koedam N, Bélanger RR. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads; predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. Plant Pathol. 1999;48:66–76.
62. Siddiqui ZA, Ehteshamul-Haque S, Zaki MJ, Ghaffar A. Green house evaluation of rhizobia as biocontrol agent of root infecting fungi in Okra. Acta Bot. 2000;53: 13-22.
63. Ehteshamul-Haque S, Ghaffar A. Use of Rhizobia in the Control of Root Rot Diseases of Sunflower, Okra, Soybean and Mungbean. J Phyto. 2008;138:157-163.
64. Hossain Md Shakhawat. Potential use of *Rhizobium* spp. to improve growth of non-nitrogen fixing plants. Master's Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Soil Sciences, Swedish; 2007.
65. Hemissi I, Mabrouk., Abdi N, Bouraoui M, Saidi M, Sifi B. Effects of some *Rhizobium* strains on chickpea growth and

- biological control of *Rhizoctonia solani*. Afr J Microbiol Res. 2011;5:4080-4090.
66. Smiley RW, Taylor PA, Clarke RG, Greenhalgh FC, Trutmann P. Simulated soil and plant management effects on root rots of subterranean clover. Aust J Agric Res. 1986;37:633-646.
67. Hussain S, Ghaffar A, Aslam M. Biological control of *Macrophomina phaseolina* charcoal rot of sun flower and mung bean. J Phytopathol. 1990;130:157-160.
68. Shaban WI, El-Bramawy M A. Impact of dual inoculation with *Rhizobium* and *Trichoderma* on damping off, root rot diseases and plant growth parameters of some legumes field crop under greenhouse conditions. Inter Res J Agric Sci Soil. 2011;3:098-108.
69. Hossain I, Jalil MA, Khan MAI, Aminuzzaman FM. Seed treatment with *Rhizobium* and N P K nutrition on disease incidence and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Bangladesh J Seed Sci Technol. 2000;4:1-6.
70. Akhtar MS, Siddiqui ZA. Effects of *Glomus fasciculatum* and *Rhizobium* spp. On the growth and root rot disease complex chickpea. Arch Phytopathology Plant Protect. 2007;40:37-43.
71. Arfaoui A, El Hadrami A, Mabrouk Y, Sifi B, Boudabous A, El Hadrami I, Daayf F, Cherif M. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. Plant Physiol Biochem. 2007;45:470-479.
72. Khalequzzaman KM, Hossain I. Effect of seed treatment with *Rhizobium* strains and biofertilizers on foot/root rot and yield of bush bean in *Fusarium solani* infested soil. J Agric Res. 2007;45:151-160.
73. Al-Ani RA, Adhab MA, Mahdi MH, Abood HM. *Rhizobium japonicum* as a biocontrol agent of soybean root rot disease caused by *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina*. Plant Prot Sci. 2012;48(4):149-155.
74. Akhtar MS, Shakeel, Siddiqui ZA. Biocontrol of Fusarium wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. Turkish J Biol. 2008;34:1-7.
75. Chérif M, Sadfi N, Benhamou N, Boudabous A, Boubaker A, Hajlaoui MR, Trilly Y. Ultrastructure and cytochemistry of *in vitro* interactions of the antagonistic bacteria *Bacillus cereus* X16 and *B. thuringiensis* 55T with *Fusarium roseum* var. *sambucinum*. J Plant Pathol. 2002; 84:83-93.
76. Carson KC, Meyer JM, Dilworth MJ. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. Soil Biol Biochem. 2000;32:11-21.
77. El-Tarabily KA, Sivasithamparan K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agent of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biol Biochem. 2006;38:1505-1520.
78. Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil. 2003;255:571-586.

© 2018 Kanouni et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:
The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://www.sciencedomain.org/review-history/22842>

الملخص

اجريت هذه الدراسة لتقييم التأثير العدائي المقاوم لعشرة عزلات من بكتيريا *Rhizobium* معزولة من اربعة انواع من البقوليات وثلاث سلالات مرجعية ضد الفطريات التالية *Fusarium*، *Aspergillus*، *Penicillium*، *Alternaria*، *Humicola* و *Cladosporium* المعزولة بدورها من نباتات مصابة. وجدنا ان بكتيريا *Rhizobium* المعزولة مقاومة للينسلين وأموكسيسيلين مع تراوح وقت التضاعف بين 1.9 إلى 6.4 ساعة، وتمكنت من النمو عند درجات حرارة تتراوح بين 37 و 40 درجة مئوية، وتحملت تراكيز ملح بين 0.5 و 2٪ كما انتجت حاملات الحديد وانزيم البروتيناز. أظهرت النتائج فعالية عزلات *Rhizobium* والسلالات المرجعية ضد عزلات الفطريات في المختبر وفي النبات، في المختبر، كل العزلات تثبطت نمو الفطريات وقد تم الحصول على أفضل سيطرة على المرض بالعزلة F3 المستخرجة من الفول والتي منعت نمو الفطريات بأكثر من 70٪، وتم الحصول ايضا على أعلى معدل للتثبيط ضد *Alternaria spp.* 2، *Penicillium spp.* 2 و *Cladosporium spp.* و *Humicola spp.* مع نسبة تثبيط تتراوح بين 90 إلى 96٪ و بنسبة 97٪ ضد فطر *Fusarium spp.* 2. في التجارب على النبات، خفضت عزلات *Rhizobium* المعزولة من الحمص والعدس والفول نسبة الفطريات بشكل كبير في جميع حالات الإصابة بأكثر من 75٪؛ حيث لوحظت أفضل نسبة في نباتات العدس، بينما لوحظت عدم وجود نباتات ذابلة في الفول. وأظهرت البذور التي تم تلقيحها بـ *Rhizobium* والفطريات في أطباق بيترى أن العزلات الأكثر فعالية في الحد من حالات الإصابة بالفطريات وجدت في الفول والعدس.

الكلمات المفتاحية: مكافحة البيولوجية، *Rhizobium*، الفول، العدس، الحمص، البازلاء، الأمراض النباتية، الفطريات.

Résumé

Cette étude a été réalisée pour évaluer l'effet antagoniste de dix *Rhizobium* isolés et caractérisés de quartes légumineuses poussant dans le Nord-Est de l'Algérie et de trois souches référencées envers des champignons comme *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Humicola* et *Cladosporium* qui ont aussi été isolés des plantes infectées dans le nord de l'Algérie. Les Rhizobia isolés étaient résistants à la pénicilline et l'amoxicilline avec des temps de génération qui variaient entre 1.9 et 6.4 h ; ils ont été capables de se développer à des températures allant de 4 à 37 °C, toléraient une concentration d'NaCl comprise entre 0.5 et 2%, et produisaient des sidérophores et des protéases. Les résultats ont démontré l'efficacité des isolats de *Rhizobium* et des souches de référence envers les isolats fongiques *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, tous les Rhizobia inhibaient la croissance mycélienne des agents pathogènes. Le meilleur contrôle de la maladie a été obtenu avec l'isolat F3 de la fève qui a inhibé plus de 70% des espèces fongiques La plus forte inhibition fongique a été obtenue contre *Alternaria spp.* 2, *Penicillium spp.* 2, *Cladosporium spp.* et *Humicola spp.* avec un taux allant de 90 à 96%. Et avec un pourcentage de 97% envers *Fusarium spp.* 2. Dans des expériences en pots, *Rhizobium* isolé du pois chiche, des lentilles et des fèves a réduit de manière significative toute incidence de la maladie avec plus de 75%, où le meilleur pourcentage a été observé chez les plantes de lentilles, alors que chez la fève, aucune plante flétrie n'a été observée. Les graines traitées avec *Rhizobium* et inoculées de champignons phytopathogènes dans des boîtes de Pétri ont montré que les isolats issus des fèves et des lentilles ont été les plus efficaces pour réduire l'incidence des maladies fongiques.

Mots clé : Contrôle biologique, *Rhizobium*, fève, lentille, pois chiche, petit pois, maladies des plantes, champignons.

Abstract

This study was carried out to evaluate the antagonistic effect of ten isolated characterized *Rhizobium* sp. isolates and three referenced strains against aggressive fungi *Fusarium*., *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Humicola* and *Cladosporium*. isolated from infected and wilted plants. The isolated Rhizobia were resistant to penicillin and amoxicillin with generation time ranged from 1.9 to 6.4 h, they were able to grow temperatures from 4°C to 37°C, tolerate salt concentration (0.5–2%) and produce siderophores and proteases. The results demonstrated the effectiveness of the Rhizobia isolates and the referenced strains against the fungi isolates *in vitro* and *in vivo*. In dual culture, all Rhizobia isolates inhibited the mycelial growth of the pathogens. The best disease control was obtained with isolate F3 from faba bean which inhibited the fungal growth with more than 70%. The highest inhibition growth was obtained against *Alternaria spp.* 2, *Penicillium spp.* 2, *Cladosporium spp.* and *Humicola spp.* with an inhibition rate ranging from 90 to 96%. And with a percentage of 97% towards *Fusarium spp.* 2. In pot experiments, Rhizobia isolates from chickpea, lentil and faba bean reduced significantly all disease incidence with more than 75%; where the best fight was observed in lentil plants, while in faba bean no wilted plants were observed. Seeds inoculated with Rhizobia and fungi in petri dishes showed that isolates from faba bean and lentil were the most effective in reducing fungi disease incidence.

Keywords: Biological control, *Rhizobium*, faba bean, lentil, chickpea, pea, plant diseases, fungi.

