



**UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS
DE MOSTAGANEM**

**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET
DE LA VIE**



DÉPARTEMENT D'AGRONOMIE

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION : Phytopathologie

Présentée par :

Mme ZAIM Souad

Essai de lutte biologique contre le *Fusarium oxysporum*
f. sp. *ciceris* à l'aide des microorganismes de la
rhizosphère de la culture du pois chiche

Composition du jury de soutenance

Président	Pr. LOTMANI Brahim	Université de Mostaganem
Directeur de thèse	Pr. BELAHCENE Miloud	Centre Universitaire d'Ain Témouchent
Co-directeur de thèse	Pr. BELABID Lakhdar	Université de Mascara
Examineur	Pr. YUCEF BENKADA Mokhtar	Université de Mostaganem
Examineur	Pr. BENDAHDANE Boubekur Seddik	Université de Mostaganem
Examineur	Pr. MEDDAH Boumediene	Université de Mascara

*Je dédie cette thèse, le fruit de plusieurs années d'études et de
sacrifices,*

A la famille ZAIM et BEKKAR

A tous ceux que j'aime et spécialement

A mon mari Ahmed Amine et mes adorables enfants

Mohamed Akram, Ahmed Baraa et Sarah Ilhem.

Que Dieu vous garde et vous protège. Amène.

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Recherche sur les systèmes Biologiques et Géomatiques (LRSBG) de l'Université de Mascara, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et toute ma gratitude au Dr HAMIMED A. de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir assuré mon encadrement. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères et celle de mon profond respect.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes directeurs de thèse qui m'ont accompagné au fil des jours Mrs. Les Professeurs BELLAHCENE Miloud et BELABID Lakhdar, pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail et de m'avoir fait profiter de leurs connaissances scientifiques. Leurs directives et leurs rigueurs scientifiques m'ont été d'une aide précieuse. Il m'est agréable de pouvoir leurs adresser mes vifs remerciements et immenses reconnaissances.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur LOTMANI Ibrahim de l'Université de Mostaganem, pour l'honneur qu'il m'a fait en présidant le jury de cette thèse; qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury Mrs. les Professeurs YUCEF BENKADA Mokhtar, BENDAHDANE Aboubakr Esseddik et MEDDAH Boumediène qui me font le grand honneur d'évaluer ce travail. Qu'ils trouvent, à travers ce travail, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont également à Mme LAZRAG F. d'avoir réalisé des prises photos au microscope électronique au niveau du laboratoire de Département Biologie et Géologie, Université d'Almeria, Espagne. Qu'elle veuille bien agréer l'expression de mon profond dévouement.

Merci à mon beau-père pour avoir lu, relu et corrigé ce manuscrit et pour son soutien inappréciable à ma petite famille tout au long de ma thèse.

Enfin, que tous ceux, de près ou de loin, dont l'assistance ou les conseils m'ont permis de mener à bien ce travail, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et de mes salutations les plus respectueuses : Mme ESSALMANI H., Mme MALIK S., Mme BERRAHAL H., Mlle BENOUSA S., Mr BENARBA B., Mr BENDAHA M., Mr MEGHARBI A., Mr MOKRANI S., Mr BENHADA D., Mr IBRI K.

Résumé

Le pois chiche est l'une des légumineuses les plus importantes en Algérie. Des enquêtes, ont montré l'apparition du flétrissement vasculaire de pois chiche dans le nord-ouest Algérien. Cette maladie est causée par le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC). Des prospections ont été effectuées au cours de la campagne agricole 2008 dans quatre régions du nord-ouest Algérien ce qui nous ont permis de détecter la présence des symptômes du flétrissement dans tous les champs prospectés. L'implication du FOC dans la manifestation du flétrissement a été démontrée et les isollements effectués ont témoigné de la colonisation de la tige. Les isolats de FOC ont montré un pouvoir pathogène variable. L'utilisation des microorganismes antagonistes est considérée comme une méthode de lutte très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante contre FOC. Par ailleurs 29 rhizobactéries antagonistes ont été sélectionnées parmi les 131 isolées à partir de la rhizosphère de pois chiche cultivé dans neuf régions du nord-ouest et nord-est Algérien : Mascara, Sidi Bel-Abbès, Tlemcen, Tiaret, Mostaganem, Relizane, Chlef, Guelma et Constantine. Des tests de confrontation *in vitro* entre deux isolats de FOC (FOC1 et FOC2) et les 29 rhizobactéries séparément, ont révélé leur activité inhibitrice de la croissance mycélienne de ces deux agents pathogènes de 25,63% à 71,11% par confrontation directe et de 14,11% à 45,74% à distance. L'ensemble des isolats ont la capacité de solubiliser le phosphate, de même que la production d'HCN, d'AIA et la chitinase. Ces caractéristiques on les qualifie comme des PGPR. Cinq espèces les plus performantes ont été identifiées comme *B. subtilis* (Rb29), *B. amyloliquefaciens* (Rb4), *B. megaterium* (Rb6), *B. lentus* (Rb12), *B. mycoïdes* (Rb15) et choisies pour des essais de lutte biologique *in vivo*. Ces espèces ont significativement réduit l'incidence du flétrissement vasculaire après une bactérisation des semences de cultivar sensible ILC 482 de 60 à 99% en pots et de 57,20 à 98% en plein champ. Cette étude a permis de révéler que les espèces rhizosphériques de pois chiche appartenant au genre *Bacillus* peuvent être utilisées comme agents de lutte biologique.

Mots-clés : Rhizobactéries, *Bacillus* spp., lutte biologique, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, pois chiche

□ □ □ □

الحمص هو واحد من البقوليات الأكثر أهمية في الجزائر. لقد بينت الدراسات ظهور مرض الذبول الوعائي للحمص في شمال غرب الجزائر. يعد الفطر الممرض (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC) المسبب الرئيسي لهذا المرض. سمحت الاستطلاعات في أربع مناطق من شمال غرب الجزائر خلال عام 2008 لحقول الحمص من اثبات وجود أعراض الذبول الوعائي في جميع الحقول التي شملتها الدراسة. وقد تبين لنا أن FOC هو المتسبب في ظهور حالات الذبول اذ تم عزله من السيقان. تعتبر بكتيريا الريزوسفير المضادة للفطريات الممرضة للنباتات من اهم الكائنات المستعملة في مكافحة البيولوجية. لهذا الغرض تم عزل 131 بكتيريا من ريزوسفير الحمص المزروع في تسع مناطق شمال غرب وشمال شرق الجزائر :معسكر، سيدي بلعباس، تلمسان، تيارت، مستغانم، غليزان، الشلف، قالمة وقسنطينة. 29 بكتيريا من بين المجموعة التي تم عزلها قد أثبتت أن لها القدرة على إيقاف نمو عزلتين من الفطر الممرض (FOC 1 و FOC2) بنسبة تراوحت ما بين 25.63٪ إلى 71.11٪ من خلال المواجهة المباشرة بينهما و ما بين 14.11٪ إلى 45.74٪ من خلال المواجهة عن بعد. كما أن أغلبية هذه العزلات أظهرت قدرتها ايضا على إذابة الفوسفات، فضلا عن إنتاج HCN، AIA وإنزيم chitinase. خمسة أنواع تم اختيارها للمكافحة ضد FOC، المتمثلة في *B. subtilis* (Rb29)، *B. amyloliquefaciens* (Rb4)، *B. megaterium* (Rb6)، *B. lentus* (Rb12)، *B. mycoïdes* (Rb15) هذه الأنواع قد خفضت بشكل كبير من الإصابة الذبول الوعائي بعد التلقيح البكتيري بنسبة 60-99٪. من خلال هذه الدراسة يمكن استخدام هذه الأخيرة في مكافحة البيولوجية.

□ □ □ □ □ المفتاحية: بكتيريا الريزوسفير، *Bacillus*، المكافحة البيولوجية، *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*، حمص.

Abstract

Chickpea is one of the most important legumes in Algeria. Surveys have shown the appearance of vascular wilt of chickpeas in northwestern of Algeria. This disease is caused by the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC). Surveys were conducted during the 2008 crop year in four regions of northwestern Algeria that allowed us to detect the presence of wilt symptoms in all fields surveyed. The involvement of the FOC in the manifestation of wilt has been demonstrated and isolates carried testified to the colonization of the stem. FOC isolates showed variable pathogenicity. The use of antagonistic microorganisms is considered as promising method to ensure a successful protection against FOC. Furthermore 29 antagonistic rhizobacteria were selected among 131 isolated from the chickpea rhizosphere grown in nine regions of the northwest and northeast of Algeria: Mascara, Sidi Bel-Abbes, Tlemcen, Tiaret, Mostaganem, Relizane, Chlef, Guelma and Constantine. *In vitro* comparison tests between two isolates of FOC (FOC1 and FOC2) and 29 rhizobacteria separately showed inhibitory activity of the mycelial growth of the two pathogens of 25.63% to 71.11% by direct confrontation and 14.11% to 45.74% b indirect confrontation. All the isolates have the ability to solubilize phosphate, as well as the production of HCN, AIA and chitinase. These characteristics as they are called PGPR. Five performing species were identified as *B. subtilis* (Rb29), *B. amyloliquefaciens* (Rb4), *B. megaterium* (RB6), *B. lentus* (RB12), *B. mycoides* (RB15) and selected for control testing *in vivo* biological. These species have significantly reduced the incidence of vascular wilt after a bacterial inoculation of susceptible cultivar ILC 482 seeds of 60-99% in pot and 57.20 to 98% in the field. This study revealed that the rhizospheric species of chickpea belonging to the genus *Bacillus* can be used as biological control agents.

Keywords: Rhizobacteria, *Bacillus*, biocontrol, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, chickpea.

Résumé	ii
□ □ □ □	iii
Abstract.....	iv
Sommaire	v
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xv

TABLE DES MATIERES

Introduction Générale	1
-----------------------------	---

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur le pois chiche	3
I.1- Historique, origine et aire de culture	3
I.2- Valeur nutritionnelle et énergétique	3
I.3- Importance agronomique	4
I.4- Caractères taxonomiques et morphologiques	4
I.4.1- Caractères taxonomiques	4
I.4.2- Caractères morphologiques	5
I.4.3- Les espèces de pois chiche	9
I.5- Cycle de culture et exigences édaphi-climatiques	9
I.5.1- Cycle de culture	9
I.5.2- Exigences édaphi-climatiques de la culture	10
I.6- Importance et production de pois chiche dans le monde	11
I.7- Importance et production de pois chiche en Algérie	12
I.8- Maladies du pois chiche	13
I.9- Les ravageurs et les nématodes	13
II- Le flétrissement vasculaire du pois chiche	17
II.1- L'agent pathogène: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> (FOC)	17
II.1.1- Historique et taxonomie	17
II.1.2- Biologie et reproduction de <i>F. oxysporum</i>	18
II.2- La maladie	19
II.2.1- Importance et dégâts de flétrissement vasculaire du pois chiche	19

II.2.2- Epidémiologie et cycle évolutif de FOC	20
II.2.2.1- L'inoculum primaire	20
II.2.2.2- Infection et symptômes	20
II.2.2.3- Transmission du champignon	22
II.2.3- Moyens de lutte contre la maladie	22
III. <i>Bacillus</i> rhizosphériques promotrices de la croissance des plantes (PGPR) et agents de lutte biologique	27
III-1. Intérêt de la lutte biologique dans le contrôle des maladies phytopathogènes ..	27
III-2. La rhizosphère et les rhizobactéries	28
III-3. Généralités sur les <i>Bacillus</i> : taxonomie, écologie et habitat, phénomène de la formation des spores	31
III-4- Potentiels bénéfiques des rhizobactéries du genre <i>Bacillus</i> en agriculture	34
III-5- Produits à base de <i>Bacillus</i> en agriculture	38

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

1- Milieux de culture	42
2- Matériel végétal	43
3- Matériel fongique	43
3.1- Obtention de l'agent pathogène	43
3.1.1- Isolement et purification de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i>	43
3.1.2-- Purification et obtention des cultures monospores	44
3.2- Identification de l'agent pathogène	45
3.3- Détermination de la forme spéciale <i>ciceris</i> et test de la virulence	45
3.3.1- Obtention des plantules du pois chiche	46
3.3.2- Technique d'inoculation	46
3.3.3- Evaluation de l'action de FOC et estimation des symptômes	47
3.3.4- Evaluation de la virulence des isolats de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	47
3.4- Conservation des isolats de FOC	48
3.4.1- Conservation sur gélose inclinée	48
3.4.2- Conservation sur papier filtre	48
3.5- Caractérisation morphologique et biométrique des isolats de FOC	48
3.5.1- Détermination des morphotypes et pigmentation	49

3.5.2- Etude biométrique des conidies et des chlamydospores	49
3.6- Analyses statistiques	49
4- Matériel bactérien (Agents antagonistes)	50
4.1- Prélèvement et préparation des échantillons des sols rhizosphériques	50
4.2- Isolement des rhizobactéries antagonistes	52
4.3- Conservation des rhizobactéries	53
5- Sélection de rhizobactéries antagonistes	53
5.1- Confrontation par contact direct sur milieu de culture	53
5.2- Confrontation à distance sur milieu de culture	54
6. Caractérisation des rhizobactéries antagonistes	55
6.1- Solubilisation de phosphate	55
6.2- Production d'acide cyanhydrique (HCN) (Cyanogénèse)	56
6.3- Production d'acide indole acétique (AIA)	56
6.4- Production d'enzymes	57
6.5- Analyses statistiques	57
7- Identification des rhizobactéries	58
8- Efficacité <i>in vivo</i> de quelques isolats de <i>Bacillus</i> spp. sur FOC en pots et en plein champ	62
8.1- Efficacité <i>in vivo</i> de quelques isolats de <i>Bacillus</i> spp. sur l'incidence de la maladie	62
8.2- Efficacité <i>in vivo</i> de quelques isolats de <i>Bacillus</i> spp. sur la croissance et le rendement de pois chiche	64
8.3-Analyse statistique	64

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1 :

Importance du flétrissement vasculaire du pois chiche dans le nord-ouest Algérien

1.1- Introduction	65
1.2- Symptomatologie	66
1.3- Isolement de FOC à partir de tige et graine du pois chiche	66
1.4- Pathogénicité des isolats de <i>F. oxysporum</i>	66
1.5- Evaluation de l'incidence de maladie et la virulence des isolats de FOC	67

1.6- Caractérisation morphologique et biométrique	71
1.6.1- Caractérisation culturelle	71
1.6.2- Caractéristiques biométriques des spores	74
1.7- Discussion	76
1.8- Conclusion	78

Chapitre 2 :

Isolement et sélection des rhizobactéries antagonistes

2.1-Introduction	79
2.2- Isolement des rhizobactéries antagonistes à partir de la rhizosphère de pois chiche	80
2.3- Etude de l'activité antagoniste et sélection des rhizobactéries <i>in vitro</i>	81
2.3.1-Confrontation directe sur milieu de culture entre FOC et les rhizobactéries isolées	81
2.3.2-Confrontation à distance sur milieu de culture entre les deux isolats de FOC et les rhizobactéries isolées.....	88
2.4- Discussion	91
2.5- Conclusion	93

Chapitre 3 :

Caractérisation des rhizobactéries antagonistes

	94
3.1- Introduction	95
3.2- Solubilisation de phosphate.....	95
3.2.1- Solubilisation de phosphate en milieu solide et liquide	
3.2.2- Corrélation entre la concentration de P soluble et le pH, entre la solubilisation de P dans le milieu PVK solide et liquide	97 100
3.3- Production d'acide cyanhydrique (HCN)	100
3.4- Production d'Acide-Indole-acétique (AIA)	
3.4.1- Production qualitative d'AIA en Luria-Bertani solide additionné de tryptophane	100
3.4.2- Production quantitative d'AIA en Luria-Bertani liquide additionné de tryptophane	105

3.4.3- Corrélation entre la production d'AIA en milieu Luria-Bertani solide et liquide additionné de tryptophane	105
3.5- Production d'enzymes	108
3.6- Interaction entre les différentes activités étudiées	110
3.7- Classification et répartition des rhizobactéries suivant les activités étudiées	110
3.7.1- Classification hiérarchique	111
3.7.2- Réparation des rhizobactéries par l'ACP	114
3.8- Discussion	118
3.9- Conclusion	

Chapitre 4 :

Identification des rhizobactéries antagonistes

4.1- Introduction	119
4.2- Caractérisation phénotypique et biochimique	119
4.3- Discussion	127
4.4- Conclusion	128

Chapitre 5 :

Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Bacillus* spp. sur FOC en pots et en plein champ

5.1- Introduction	132
5.2- Efficacité <i>in vivo</i> de quelques isolats de <i>Bacillus</i> spp. sur l'incidence de la maladie	132
5.3- Efficacité <i>in vivo</i> de quelques isolats de <i>Bacillus</i> spp. sur la croissance et le rendement de pois chiche	139
5.4- Discussion	146
5.5- Conclusion	149

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	150
---	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129
-----------------------------------	-----

ANNEXES	177
---------------	-----

PUBLICATION

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition organique et minérale du pois chiche	5
Tableau 2 : Durées des stades de développement phénologiques d'une culture de pois chiche de printemps	11
Tableau 3 : Maladies fongiques les plus importantes du pois chiche.	15
Tableau 4 : Types de spores asexuées de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	19
Tableau 5: Exemples de produits commercialisés et utilisés en agriculture à base de <i>Bacillus</i>	40
Tableau 6 : Les parcelles prospectées du pois chiche de quatre régions choisies du nord-ouest Algérien	44
Tableau 7 : Les isolats de FOC utilisés dans la caractérisation morphologique et biométrique	49
Tableau 8 : Classement des isolats de FOC selon l'origine d'isolement et les incidences de la maladie (IM) induites	69
Tableau 9 : Incidence de la maladie (IM en %) des isolats de FOC classés en 5 groupes	70
Tableau 10 : Caractéristiques culturelles des morphotypes de 10 isolats de FOC	72
Tableau 11 : Mensurations (μm) des microconidies et des macroconidies de 10 isolats de FOC	75
Tableau 12: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOC par confrontation directe avec les 29 rhizobactéries sélectionnées.	83
Tableau 13: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> « FOC » par confrontation à distance avec les 29 rhizobactéries sélectionnées.	89
Tableau 14: Indice de solubilisation de P par les rhizobactéries antagonistes	97
Tableau 15: Production d'HCN par les rhizobactéries antagonistes.	101
Tableau 16: Production d'AIA en présence de tryptophane.	103
Tableau 17: Matrice de corrélation calculée sur 8 paramètres étudiés.	109
Tableau 18 : Principales caractéristiques morphologiques et physiologiques de cinq espèces de <i>Bacillus</i>	123
Tableau 19: Pourcentages de réactions positives obtenus par les galeries Api 50CHB	126
Tableau 20: La durée d'apparition des 1 ^{iers} symptômes, l'incidence et la gravité de la maladie en pots et en plein champs selon les traitements.	134
Tableau 21: Effet de bactérisation par <i>Bacillus</i> spp. sur les paramètres agronomiques de pois chiche	140

Tableau 22 : Corrélation entre l'incidence de la maladie et les paramètres agronomiques étudiés	141
Tableau 23 : Les caractéristiques <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> spp. testées <i>in vivo</i>	141

LISTE DES FIGURES

Fig. 1 : Types de pois chiche (<i>Cicer arietinum</i> L.)	7
Fig. 2 : Morphologie de <i>Cicer arietinum</i> L.	7
Fig.3 : Branches avec des gousses vertes et fleurs de <i>Cicer arietinum</i> L. (Personnelle non publiée)	8
Fig. 4: Gousses et graines de <i>Cicer arietinum</i> L. (ILC 482) (Personnelle non publiée)	8
Fig. 5: Superficies emblavées dans le monde et production totale de pois chiche (<i>Cicer arietinum</i> L.)	12
Fig. 6: Morphologie du <i>Fusarium oxysporum</i>	21
Fig.7: Colonisation des vaisseaux conducteurs du pois chiche (cultivar JG. 62) par le <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	21
Fig. 8: Cycle infectieux de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	22
Fig. 9: Schéma simplifié d'une racine fine et des rhizodépôts en fonction de la structure racinaire	29
Fig. 10 : Caractéristiques morphologiques des <i>Bacillus</i>	33
Fig. 11 : Cycle de sporulation de <i>Bacillus subtilis</i>	35
Fig. 12 : Les sites de prélèvements des échantillons des sols rhizosphériques	51
Fig. 13 : Les étapes de l'identification bactérienne par séquençage du gène <i>rrs</i> codant l'ARN ribosomal 16 S	61
Fig. 14 : Un plant du pois chiche cultivé présentant un jaunissement des feuilles : symptômes causés par FOC (Région de Mascara)	68
Fig. 15 : Symptômes de la fusariose vasculaire causés par FOC d'un plant cultivé du pois chiche en comparaison avec un plant sain du même champ	68
Fig. 16 : Développement du FOC à partir de fragments d'une tige et des graines affectées par le flétrissement	69
Fig. 17 : Réisolement de FOC à partir de fragments d'une tige	69
Fig. 18 : Comportement de la variété du pois chiche ILC 482 inoculée par FOC	70
Fig. 19 : Morphotype cotonneux, duveteux et ras muqueux de FOC sur le milieu PDA.	72
Fig. 20 : Cultures de FOC montrant les pigmentations du thalle	73
Fig. 21 : Microconidies (a) macroconidies (b) et chlamydospores de FOC	75
Fig. 22: Répartition en pourcentage et par région de 131 rhizobactéries isolées	80
Fig. 23: Inhibition de la croissance mycélienne de FOC1 et FOC2 par rapport au témoin, après confrontation directe sur milieu PDA à 25°C pendant six jours d'incubation	84
Fig. 24: Pourcentage d'inhibition des 29 rhizobactéries antagonistes sur la croissance	

mycélienne de FOC1 après six jours d'incubation à 25 °C	
Fig. 25: Pourcentage d'inhibition exercé par les 29 bactéries antagonistes sur la croissance mycélienne de FOC2 après six jours d'incubation à 25 °C	84
Fig. 26: Changement de la couleur de la colonie de FOC après confrontation directe sur milieu PDA à 25°C pendant six jours d'incubation	85
Fig. 27: La production de substances antifongiques diffusibles dans le milieu de culture PDA après confrontation directe (FOC-Rhizobactérie)	85
Fig. 28: Changement de couleur du mycélium de FOC collecté au niveau de l'interface des isolats de rhizobactéries en comparaison avec le témoin	86
Fig. 29: Apparition de grandes vacuoles dans le mycélium de FOC collecté au niveau de d'interface des isolats de rhizobactéries	86
Fig. 30: Présence de petites vésicules et coagulation du cytoplasme dans le mycélium de FOC (voir flèches) collecté au niveau de d'interface des isolats de rhizobactéries	87
Fig. 31: Lyse et changement de couleur du mycélium de FOC (voir flèches) collecté au niveau de d'interface des isolats de rhizobactéries	87
Fig. 32: Changement de l'aspect de la colonie de FOC2 après confrontation à distance par rapport au témoin sur milieu PDA à 25°C pendant six jours d'incubation.....	87
Fig. 33: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOC2 exercé à distance par les 29 rhizobactéries après six jours d'incubation à 25 °C	88
Fig. 34: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOC1 exercé à distance par les 29 rhizobactéries après six jours d'incubation à 25 °C	90
Fig. 35: Halo de transparence autour des colonies bactériennes de Rb29, Rb20 et Rb12 caractéristique de la solubilisation de P sur milieu PVK additionné de bleu de bromophénol après 7 jours d'incubation à 28°C	96
Fig. 36 : Solubilisation de P (µg/ml) sur milieu PVK liquide par les rhizobactéries antagonistes.....	98
Fig. 37 : Valeurs de pH en milieu PVK liquide	99
Fig. 38 : Production d'HCN par les rhizobactéries antagonistes en comparaison avec le témoin après 05 jours d'incubation à 28°C.	102
Fig. 39 : Production d'AIA sur le milieu solide Luria-Bertani additionné de tryptophane après 3 jours d'incubation à 30°C	104
Fig. 40: Production d'AIA sur le milieu liquide Luria-Bertani additionné de tryptophane.	106
Fig. 41: Production de l'AIA (µg/ml) sur le milieu liquide de Luria-Bertani additionné de tryptophane	107
Fig. 42: La formation d'halos clairs autour des colonies par l'isolat Rb4 sur le milieu M9 supplémentée de la chitine après 5 jours d'incubation à 30° C.	108

Fig. 43: Cercle de corrélation de l'ACP des différentes activités étudiées exprimées par les rhizobactéries de pois chiche.	110
Fig. 44 : Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante des 29 rhizobactéries suivant les 8 paramètres étudiés	111
Fig. 45: Répartition des 29 rhizobactéries suivant les paramètres étudiés par une ACP.	113
Fig. 46: Aspects cultureux de trois espèces de <i>Bacillus</i> sur milieu GN	121
Fig. 47: Aspect microscopique de <i>B. lentus</i> Rb12 et <i>B. amyloliquefaciens</i> (Rb4) après une coloration de Gram	122
Fig. 48: Aspect microscopique d'endospores centrales et cellules végétatives de <i>B. megaterium</i> Rb6	124
Fig. 49: Caractéristiques morphologiques de spores de <i>B. subtilis</i> (Rb 29) observés en microscopie électronique à balayage au grossissement x 4.0k et une échelle de 10µm.	125
Fig. 50: Caractéristiques morphologiques de spores de <i>B. lentus</i> (Rb12) observés en microscopie électronique à balayage au grossissement x 5.0k et une échelle de 10µm.	125
Fig. 51: Effet de la bactérisation des semences d'ILC 482 par <i>B. subtilis</i> (Rb29) sur la germination, en comparaison avec les semences inoculées uniquement par FOC après 10 jours d'inoculation.	135
Fig. 52 : Réduction de l'incidence de la maladie de pois chiche traitée par les cinq espèces de <i>Bacillus</i> et inoculée par FOC1 en comparaison avec les plantes inoculées uniquement par FOC1.	135
Fig. 53: Plantes inoculées avec FOC1 montrées les symptômes caractéristiques de flétrissement vasculaire	136
Fig. 54: Essai de lutte biologique en pots	137
Fig. 55: Essai de lutte biologique en plein champ	138
Fig. 56: Essai de lutte biologique en pots	143
Fig. 57: Effet de <i>Bacillus</i> sur la croissance végétative de pois chiche	144
Figure 58: Présence de nodules sur une plante de pois chiche (ILC 482) traitée avec <i>B. subtilis</i> (Rb29) et un agrandissement sur les racines.	145

LISTE DES ABREVIATIONS

ESED: Electron Secundery Enveromental Detector

f. sp. : forme spéciale

FOC: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

ICARDA: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas; Aleppo; Syria.

ICRISAT: International Crops Research For The Semi-Arid Tropics; Hyderabad; India.

ILC: International Legume Cicer

IS: indice de la solubilisation de phosphate

ISR : induction of systemic resistance

ITGC : Institut Technique des Grandes Cultures.

KV: voltage

LRSBG : Laboratoire de Recherche sur les Systèmes Biologiques et Géomatiques

Mt : Millions de tonnes

ND : non disponible

PGP: plant growth promoting

PGPR : plant growth promoting rhizobacteria

PTC: phosphate tricalcique

Rb: rhizobactérie

INTRODUCTION GENERALE

Introduction Générale

Les légumineuses alimentaires représentent, de part la superficie qu'elles occupent, une place importante dans le système agraire et l'agroéconomie de nombreux pays du monde. En effet, ces légumineuses présentent une importance tout à fait particulière pour l'agriculture, en raison des caractéristiques biologiques des racines dans la fixation de l'azote atmosphérique par les nodosités bactériennes et leur capacité d'adaptation à des conditions pédoclimatiques difficiles ainsi que leur faible exigence culturale. Du point de vue nutritionnel, la richesse des légumineuses en protéines permet de corriger dans une certaine mesure les carences en protéines animales ainsi que le déséquilibre alimentaire des populations qui ont tendance à se nourrir exclusivement de céréales.

Le pois chiche (*Cicer arietinum L.*) est considéré parmi les aliments de base des Algériens en particulier, qui est la légumineuse la plus préférée d'où, il peut être consommé de plusieurs façons et peut être eu de bonnes propriétés alimentaires. La consommation des graines de pois chiche fournit au consommateur une source importante de protéines, ainsi que la paille de pois chiche est utilisée dans l'alimentation et l'engraissement animal (Jukanti *et al.*, 2012).

En Algérie, malgré la forte augmentation des emblavures de la culture de pois chiche, les rendements sont restés très faibles. Ils ne dépassent guère les huit quintaux à l'hectare. Cette faible production est due à une pluviométrie globalement déficitaire, et irrégulièrement répartie dans le temps et dans l'espace. A cela, s'ajoutent un travail du sol mal réalisé, une prolifération des mauvaises herbes, des problèmes phytosanitaires et un mauvais état des semences.

Parmi les problèmes phytosanitaires, les champignons telluriques constituent un des principaux facteurs limitant le développement de pois chiche, en provoquant la pourriture des racines et /ou le flétrissement.

Parmi les agents pathogènes qui constituent une menace permanente pour la culture de pois chiche, un champignon phytopathogène, *Fusarium oxysporum* Schelcht. Emend. Snyd. & Hans. f. sp. *ciceris* (Padwick) (FOC) est responsable d'une maladie désignée sous le nom du flétrissement vasculaire (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

Cette maladie du flétrissement rapportée initialement en Inde et par la suite dans de nombreux pays dont l'Algérie constitue la maladie la plus importante et la plus dévastatrice (Haware, 1990; Labdi, 1990 ; Jalali et Chand, 1992). Des pertes de rendement, d'une part, supérieures de 10-15% ont été attribuées en Inde et en Espagne, et d'autre part, supérieures à 40% en Tunisie (Singh et Dahiya, 1973; Booslama, 1980 ; Trapero-Casas et Jiménez - Díaz, 1985).

Le contrôle de ce pathogène reste toujours limité à des mesures prophylactiques. La désinfection du sol n'est jamais complète en raison d'une part, de la difficulté de sa réalisation et d'autre part, à l'induction de souches résistantes (Hervas *et al.*, 1997 ; Arunodhayam *et al.*, 2014).

La lutte biologique par l'utilisation des rhizobactéries antagonistes de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, constitue une alternative potentielle. En effet, la possibilité de rendre un sol suppressif à une maladie en y introduisant des microorganismes s'avère très prometteuse, surtout à une époque où les traitements phytosanitaires à base de produits chimiques de synthèse suscitent une méfiance de plus en plus grande (Lugtenberg *et al.*, 1991). La rhizosphère est la zone d'interaction entre le sol, la plante et les microorganismes (Dobbelaere *et al.*, 2003). La capacité des *Bacillus* de coloniser rapidement cette rhizosphère fait de ces bactéries un groupe taxonomique de grand intérêt en lutte biologique (Podile et Kishore, 2006).

Notre travail de recherche traite la problématique d'une maladie fongique d'origine tellurique dans l'Algérie qui est le flétrissement vasculaire de pois chiche ainsi que de l'absence d'une méthode de lutte efficace et durable. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés, en premier lieu, au parasite *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, sous un double aspect : sa morphologie et sa pathogénicité. En second, nous souhaitons durant nos travaux de recherches de mettre en évidence un modèle de lutte biologique à l'aide des bactéries appartenant au genre *Bacillus* de la rhizosphère de la culture de pois chiche. Ce modèle de lutte sera fondé sur une analyse approfondie *in vitro* et *in vivo* sur ces microorganismes qui s'articule sur :

- la mise au point d'un procédé d'isolement, de sélection, de caractérisation et d'évaluation des rhizobactéries antagonistes vis-à-vis de FOC,
- identification approfondie de quelques isolats les plus performants et
- évaluation de leur effet bénéfique sur l'incidence de flétrissement vasculaire et sur la croissance et le rendement de pois chiche.

Partie I : *Synthèse bibliographique*

I. Généralités sur le pois chiche

I. Généralités sur le pois chiche**I.1- Historique, origine et aire de culture**

Le pois chiche est parmi les premières légumineuses à graines domestiquées par l'homme depuis l'antiquité (Van der Maesen, 1987).

Le pois chiche est probablement originaire des régions de l'est de la Méditerranée, notamment, la Palestine actuelle et la Syrie. Les données archéologiques rapportent que des graines cultivées de cette espèce ont été trouvées à Ramad, près de Damas, et à Jéricho, respectivement depuis les années 9 200 et 8 500 ans A.J.C. L'expansion de cette culture a été rapide dans les régions méditerranéennes (Ladizinsky, 1987). Il est arrivé en Inde il y a seulement deux siècles en passant d'abord par l'Afghanistan (Van der Maesen, 1972).

Davis (1969) et Ladizinsky (1975) ont découvert deux espèces sauvages au Sud Est de la Turquie et les ont dénommées respectivement *Cicer echinospernum* Davis et *Cicer reticulatum* Ladiz. Ces deux espèces ne diffèrent pas beaucoup de l'espèce cultivée *Cicer arietinum* L. et ont, en commun avec elle, des caractères morphologiques. Toker (2009) a indiqué que *Cicer reticulatum* Ladiz., à 2n chromosomes =16, est identifié par des analyses des protéines et des enzymes, comme étant l'ancêtre spontané du pois chiche.

Le nom latin du genre pois chiche est *Cicer* dérivé du grec antique *kickere* des populations du Nord de la Grèce. Le nom hindi du pois chiche est *Kabuli chana* (*chana* correspond au pois chiche) et les variétés à petites graines sont appelées *Desi* (locale) (Van der Maesen, 1972).

I.2- Valeur nutritionnelle et énergétique

A travers le monde, le pois chiche est un aliment de base. Les cultivars du type « gros Kabuli » sont les plus appréciés par le consommateur, en raison de la très importante valeur alimentaire de ses graines, le pois chiche est destiné, en sa majeure partie, pour la consommation humaine et le reste est utilisé pour le bétail comme fourrage. Il est dépourvu de tout facteur antinutritionnel. Il a également une composition alimentaire très riche en protéines digestibles et contient une fraction lipidique qui renferme des acides non saturés tels que les acides linoléiques et oléiques (Upadhyaya *et al.*, 2001 ; Namvar et Sharifi, 2011 ; Jukanti1 *et al.*, 2012) (Tableau 1).

Tableau 1 : Composition organique et minérale du pois chiche (ICRISAT, 2008).

Composition organique (en %)		Composition minérale (en mg/100g)	
Protéine	23	Phosphore	340
Carbohydrates totaux	64	Calcium	190
Amidon	47	Magnésium	140
Lipides	5	Fer	7
Fibres grossières	6	Zinc	3
Sucre solubles	6		
Matière minérale	3		

Les pois chiches, sont de plus en plus intégrés à des régimes alimentaires sains pour favoriser le bien-être général et réduire le risque d'être malade. Comme ils sont riches en fibres, faibles en sodium et en matière grasse, et qu'ils ne contiennent pas de cholestérol, ils sont indiqués pour maintenir le cœur en bonne santé et pourraient aider à prévenir les maladies coronariennes et cardiovasculaires (Jukanti1 *et al.*, 2012).

I.3- Importance agronomique

Dans les régions semi-arides du bassin méditerranéen où les ressources en eau sont en constante régression, les agriculteurs se rendent compte, de plus en plus, du rôle appréciable que jouent les légumineuses à graines dans la fertilisation organique du sol, surtout, dans le système de l'agriculture durable (Pacucci *et al.*, 2006). En fait, le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est cultivé sur une large gamme de zones bioclimatiques qui s'étendent du subtropical, l'Inde et le nord-est de l'Australie, aux zones arides et semi-arides des régions du Bassin méditerranéen et de l'Australie Méridionale (Malhotra *et al.*, 1987 cité par Ansar Ahmad, 2010). Le pois chiche peut fixer, par voie symbiotique, plus de 140 kg.ha⁻¹ d'azote atmosphérique et satisfaire plus de 80% de ses besoins en azote. En raison des importantes quantités d'azote, incorporées dans le sol et délaissées dans les résidus, la culture du pois chiche maintient, pour une longue durée, la fertilité du sol et entre dans le système d'agriculture durable (Ben Mbarek, 2011).

I.4- Caractères taxonomiques et morphologiques

I.4.1- Caractères taxonomiques

Le pois chiche *Cicer arietinum* L. appartient à la famille des Papillonacées qui représente la plus grande partie de la superfamille des Leguminosae. Les taxonomistes se

sont accordés à diviser le pois chiche cultivé en plusieurs types dont les principaux sont Desi et Kabuli (Singh et Diwakar, 1995) :

- **Type Kabuli**

Il est caractérisé par un feuillage dont la couleur varie du vert clair au vert foncé et une floraison blanchâtre. Il a un port érigé ou semi érigé qui permet la mécanisation de la récolte. Généralement, la hauteur de la plante varie de 30 à 90 cm. En cas d'un sol fertile et profond et d'une alimentation hydrique suffisante, elle peut dépasser 1 m.

Les graines sont de couleur crème, couvertes d'un tégument mince (Figure 1a). Le type Kabuli se subdivise en deux sous groupes; le gros Kabuli dont les graines ont un diamètre de 8 à 9 mm et un poids de mille graines variant de 410 à 490 g et le petit Kabuli dont les graines sont caractérisées par une forme plus régulière, un diamètre de l'ordre de 7 mm et un poids de mille graines de 265 g environ (AAC, 2004).

- **Type Desi**

Il est caractérisé par un feuillage dont la couleur tend du vert violacé au glauque et une floraison violacée. Les graines sont de petite taille, de forme irrégulière et à surface ridée couverte d'un tégument épais de couleur foncée qui varie du marron au noir (Figure 1b). Le poids de 1000 graines varie de 100 à 130 g (AAC, 2004).

I.4.2- Caractères morphologiques

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est une espèce herbacée, annuelle diploïde. Cette espèce manifeste une grande variabilité phénotypique et génotypique. Deux types se distinguent, le type "Kabuli" et le type "Desi". Le premier, originaire de Kaboul, est largement répandu dans le monde (Singh et al., 1983); c'est le seul type cultivé dans le bassin méditerranéen (Jimenez-Diaz et Trapero-Casas, 1988). La collection des lignées de ce type, maintenue à l'ICARDA, est désignée par le préfixe ILC (Reddy et Singh, 1984); leurs graines de couleur crème sont de dimensions variables, petites, moyennes et grandes (Singh et al., 1987). Le deuxième type "Desi", utilisé surtout en Inde, se distingue par la couleur jaune, noire ou rouge de ses semences (Malhotra et al., 1987); la collection de ses lignées maintenue à l'ICRISAT est désignée par le préfixe ICC (Van der Maessen, 1987).

Le système racinaire mixte, dont la croissance s'arrête au démarrage de la floraison, permet à la plante d'explorer un grand volume de sol et lui confère une tolérance à la sécheresse (Slama, 1998). Il est composé d'une racine principale pivotante qui peut

atteindre 1m de profondeur et des racines secondaires traçantes. La profondeur dépend des techniques culturales, de l'état du système racinaire et de la nature du sol. En effet, la semelle du labour peut entraver l'élongation de la racine principale.

Les nodules, développés sur les racines permettent la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique pour satisfaire 80% des besoins de la plante en azote assimilable. Cette fixation symbiotique est à son optimum à la floraison et chute très rapidement par la suite (Slama, 1998).

Les feuilles ont la forme imparipennée et sont composées de 7 à 15 folioles ovales et dentelées (Figure 2), sans vrilles, en position alternée sur un rachis. Les faces inférieures des feuilles sont couvertes par un duvet formé de poils unis et pluricellulaires. Ces poils renferment des glandes qui synthétisent des acides organiques tels que l'acide oxalique (Slama, 1998). Comme pour les feuilles, la tige est couverte par des poils unis et pluricellulaires. Selon les génotypes de pois chiche, à une certaine hauteur, la tige se ramifie en deux ou trois branches pour donner des ramifications secondaires et par la suite des ramifications tertiaires.

Les fleurs sont zygomorphes, articulées, solitaires ou en grappes de deux fleurs insérées sur des pédoncules axillaires à l'aisselle des feuilles et au niveau des bifurcations (Figure 3). Le pois chiche est une espèce autogame (Ladizinsky, 1987) caractérisée par une floraison massive. Seulement son taux de nouaison est faible et varie de 28 à 37% respectivement chez les types kabuli et desi. L'apparition des premières fleurs dépend de plusieurs facteurs tels que la précocité de la variété, la date et la densité du semis et des techniques culturales. La floraison est rapide durant les jours longs et lentes durant les jours courts, selon les génotypes elle est de 30 à 45 jours. Toutefois, comme le pois chiche est une espèce à croissance indéterminée, sous des conditions hydriques favorables et des températures clémentes, les branches continuent à se développer, à fleurir et à produire des gousses et des graines (Figure 3) (Berger *et al.*, 2006 ; Ben Mbarek, 2011).

Les gousses sont ovales et réniformes, contiennent en général 1 à 2 graines (Figure 4), parfois 3 graines. Elles n'éclatent pas à la maturité. Les graines sont plus au moins rondes, pourvues d'un bec, leur taille et leur aspect varient selon les variétés, tout comme leur couleur: blanche, jaune et noire (Soltani *et al.*, 2006).



Fig. 1 : Types de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) Kabuli (a) et Desi (b) (Gaur *et al.*, 2010)

Fig. 2 : Morphologie de
Cicer arietinum L.
(Anonyme 1)
1 : Racines ; 2 : feuille
composée de folioles ; 3 :
fleur ; 4 : gousse ; 5 :
Graine germée





Fig.3 : Branches avec des gousses vertes et fleurs de *Cicer arietinum* L. (Personnelle non publiée)



Fig. 4: Gousses et graines de *Cicer arietinum* L. (ILC 482) (Personnelle non publiée)

I.4.3- Les espèces de pois chiche

Le genre *Cicer* comprend un grand nombre d'espèces. A fin de trouver des liens parentaux entre les espèces annuelles sauvages et cultivées du genre *Cicer*, Ladizinsky et Alder (1975) ont effectué des croisements interspécifiques entre les trois espèces sauvages *C. judaïcum* Boiss. , *C. pinnatifidum* Jaub et Spach et *C. bijucum* Rech. et l'espèce cultivée *C. arietinum* L. Les hybrides ainsi obtenus ne sont pas viables.

Van-Der Maessen (1979) a décrit les espèces du genre *Cicer* et les a réparti en trois groupes:

- **espèces annuelles sauvages** : *C. reticulatum*, *C. echinospermum*, *C. bijucum*, *C. judaïcum*, *C. pinnatifidum*, *C. cuneatum*, *C. yamashitae*, *C. chorassanicum* ;
- **espèces pérennes sauvages** : *C. montbretii*, *C. microphyllum*, *C. rechingeri*, *C. anotolicum*, *C. floribundum*, *C. pengens*, *C. graecum*.
- **espèce annuelle cultivée** : *C. arietinum* L.

I.5- Cycle de culture et exigences édaphi-climatiques**I.5.1- Cycle de culture**

Dans le bassin méditerranéen, le pois chiche est considéré comme une culture de printemps et d'hiver.

Le début généralement rapide de la sécheresse du printemps impose le choix d'une formation précoce de gousses comme stratégie primordiale pour éviter le stress hydrique. Toutefois, le pois chiche semble exiger des températures quotidiennes moyennes assez élevées (au-dessus de 15°C) pour réussir la formation de gousses à partir des fleurs précoces. Donc, outre la floraison précoce il est nécessaire d'avoir une tolérance aux températures sub-optimales du printemps. En général, la plante se développe vigoureusement et complète son cycle évolutif en 4 mois. C'est une plante rustique connue pour sa résistance à la sécheresse. Grâce à son enracinement profond, elle peut supporter les terrains secs et peut se développer dans les zones à faible pluviométrie (ICRISAT, 1990).

Le pois chiche est habituellement cultivé au printemps en raison de sa sensibilité à *Ascochyta rabiei*, agent inducteur de l'anthracnose, et au froid. Certains cultivars sont toutefois capables de supporter des basses températures qui atteignent -8°C sans qu'ils ne soient affectés, à condition que ces basses températures soient de courte durée. En tant que culture de printemps, le pois chiche est souvent soumis à d'importantes variations climatiques et à une importante microflore parasitaire (Singh, 1988).

I.5.2- Exigences édaphi-climatiques de la culture

Le pois chiche est peu exigeant en qualité du sol. A l'origine, les premiers écotypes ont été collectés à partir des sols marginaux, rocheux, à texture grossière et des sols profonds à texture fine dont le pH est neutre ou alcalin, variant de 7,3 à 8,2 (Berger *et al.*, 2003). Néanmoins, il est adapté aux sols bruns et bruns foncés (Jaiswal et Singh, 2001.)

Une température ambiante variant de 20 à 30 °C le jour et de l'ordre de 20 °C la nuit, assure un bon développement végétatif du pois chiche. Le pois chiche du type Kabuli craint les gels et il est facilement infecté par les champignons telluriques.

Au moment du semis, la température du sol doit être supérieure à 10 °C. En fait, un sol relativement chaud permet une réduction de l'exposition des semences aux maladies, une germination des graines et une émergence des plants rapides (Jaiswal et Singh, 2001).

Par comparaison aux autres espèces de la tribu des Viciées, grâce à son système racinaire profond, le pois chiche est doté d'une certaine rusticité et d'une tolérance à la sécheresse (Verghis *et al.*, 1999). D'après Wery, (1990), une consommation en eau de 100 à 150 mm confirme que le pois chiche est doté de bonnes capacités pour extraire l'eau stockée dans le sol. Néanmoins, quelque soit le type de culture, de printemps ou d'hiver, et le type de pois chiche, Dési ou Kabuli, la phase critique pour les besoins en eau est entre les phases phénologiques fin floraison et stade laiteux (Verghis *et al.*, 1999).

Slama (1998) a énoncé que le pois chiche craint le stress hydrique durant les stades de floraison et de remplissage des graines. Allen *et al.* (1998) ont délimité le cycle cultural du pois chiche de printemps à 95 jours et l'ont réparti en quatre phases phénologiques (Tableau 2).

Saxena, (1990) a rapporté que dans les régions du bassin méditerranéen, où la pluviométrie moyenne varie de 273 à 736 mm/an, le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est conduit en culture pluviale. D'après Saxena (1985), les génotypes de pois chiche, du type Kabuli, sont, généralement, cultivés dans les régions où les précipitations moyennes sont supérieures à 400 mm/an. Saxena (1987) a remarqué que le pois chiche peut être conduit sous des conditions pluviales caractérisées par de grandes variations dans le temps, inter et intra annuelles, et dans l'espace, en quantités, en fréquence et en durée. Le même auteur a remarqué que la consommation en eau du pois chiche dépend de l'humidité dans le sol. Il a rapporté qu'il y a une corrélation positive et hautement significative entre la dose d'eau d'irrigation administrée et le rendement en graines escompté. En fait, avec une dose

d'irrigation qui varie de 110 à 240 mm, le rendement en graines varie de 0,9 à 3 t.ha⁻¹. Pour une culture de pois chiche de printemps, les besoins hydriques sont de 297 mm dans les zones arides et de 413 mm dans les zones humides sont respectivement de 311 et 432 mm (Saxena, 1987).

Tableau 2 : Durées des stades de développement phénologiques d'une culture de pois chiche de printemps (Allen *et al.*, 1998).

Phases	Stades phénologiques	Durées (j)
I	Initial	20
II	Développement	25
III	Croissance	35
IV	Maturité	25

I.6- Importance et production de pois chiche dans le monde

A travers le monde, le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est l'une des plus importantes légumineuses à graines. Il occupe la seconde place avec une superficie de 11,2 millions d'hectares et une production annuelle estimée à 9,2 millions de tonnes et un rendement moyen de 820 kg.ha⁻¹ (Gaur *et al.* 2008 cité par Ben Mbarek, 2011). Entre les années 1998 et 2006 les superficies emblavées et la production du pois chiche ont varié respectivement de 9,8 à 11,9 millions d'hectares et de 6,3 à 9,5 millions de tonnes (Figure 5) (AAC, 2006). Néanmoins, entre 2000 et 2003, sous l'effet des contraintes biotiques et abiotiques, les superficies emblavées ainsi que la production du pois chiche ont connu une nette régression.

Singh (1987) a signalé que, sous des conditions édaphi-climatiques favorables, le pois chiche a enregistré un rendement potentiel de 6 t.ha⁻¹. En revanche, le rendement réel est largement inférieur à ce dernier et reste constamment faible. Saxena (1989) a signalé que depuis les années 1930, le rendement en graines du pois chiche n'a pas excédé 500 à 700 kg.ha⁻¹. D'après l'AAC (2006), entre 1998 et 2006, le rendement moyen en graines du pois chiche est de 800 kg.ha⁻¹. Le continent Asiatique est le plus important producteur de pois chiche avec un taux de 91% (Upadhyaya *et al.*, 2001). Par ailleurs, les plus grands pays producteurs de cette espèce sont: l'Inde, la Turquie, le Pakistan, l'Australie, le Canada, le Mexique, l'Iran et l'Ethiopie (AAC, 2006).

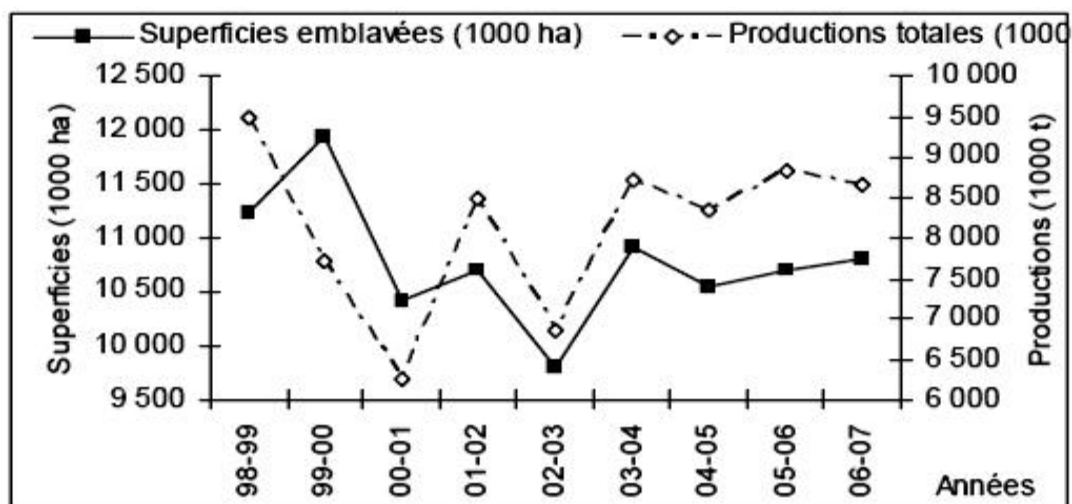


Fig. 5: Superficies emblavées dans le monde et production totale de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) (AAC, 2006).

Les plus grands pays exportateurs du pois chiche sont, notamment, l'Australie, le Mexique, la Turquie, le Canada, les Etats-Unis et l'Iran; alors que les plus importants pays importateurs sont, l'Inde, le Pakistan, l'Espagne, l'Algérie, le Bangladesh, l'Italie, l'Arabie saoudite, la Jordanie, la Tunisie et le Royaume-Uni (AAC, 2006).

Il a été remarqué à travers le monde, que le pois chiche du type Desi est plus cultivé que celui du type Kabuli. C'est ainsi que la production mondiale est composée de 75% du type Desi et 25 % du type Kabuli. Les pays du sous-continent Indien, ainsi que l'Australie, produisent surtout le type Desi; alors que le reste des pays produisent le type Kabuli. Les rendements en graines du type Desi et du petit Kabuli sont supérieurs de près de 20 % que ceux du gros Kabuli (AAC, 2006).

I.7- Importance et production de pois chiche en Algérie

En Algérie, le pois chiche est la seconde légumineuse alimentaire après la fève (Hamadache et Ait Abdallah, 1998). Il est cultivé essentiellement dans les zones littorales et les plaines intérieures, avec respectivement 46,3 % et 41,6 % de la superficie totale (Zaghouane, 1997). L'espèce *Cicer arietinum* occupe une grande place dans nos habitudes alimentaires; elle est de ce fait très demandée par la population. La production actuelle de pois chiche est très faible et les surfaces occupées par cette espèce sont en diminution (Abdelguerfi *et al.*, 2001).

Trente et une variétés locales ont servi de matériel de base pour des recherches en amélioration durant les années 50. Par ailleurs, plusieurs anciennes variétés ont été décrites (Sebdou, Sidi Bel Abbès, Rabat 9, Aïn Témouchent, Abdellys et Oran Précoce) dont trois seulement (Aïn Témouchent, Abdellys et Oran précoce) ont été mentionnées par Laumont et Chevassus (1956). Les variétés cultivées sont rencontrées le plus souvent en mélange plus ou moins accusé. Beaucoup de cultivars locaux ont disparu. Cependant, cette érosion génétique a été compensée en partie par des introductions de variétés étrangères et particulièrement les variétés ILC plus résistantes à l'anthracnose (Abdelgurfi *et al.*, 2000).

L'Algérie porte peu de variabilité pour le pois chiche. Les variétés cultivées méritent des études sérieuses pour en déterminer les caractéristiques qui font qu'elles soient encore appréciées par les agriculteurs. Les efforts de la recherche agronomique ont surtout porté sur la sélection du pois chiche. Ces efforts ont abouti à la sélection de 20 cultivars de pois chiche dont 9 sont en multiplication (Abdelgurfi *et al.*, 2000).

1.8- Maladies du pois chiche

Le pois chiche est une culture vivrière importante. Cette culture subit plusieurs maladies graves qui l'attaquent à tous les stades de développement. Dans plusieurs pays, la production du pois chiche est limitée par l'action de plusieurs facteurs de stress dont les plus importants restent les maladies causées par une large gamme d'organismes phytopathogènes comprenant des champignons (Tableau 3), des bactéries telles que *Xanthomonas campestris* pv. *Cassiae* et des virus (Nene *et al.*, 1991).

D'après Kumari *et al.* (2008) et El Aoufir (2001) certaines maladies virales sont économiquement importantes puisqu'elles sont responsables d'une réduction des rendements. Parmi elles: la maladie filiforme causée par le virus filiforme du pois chiche (CpFV), le nanisme buissonneux causé par le virus *Chickpea* bushy dwarf virus (CpBDV) et le rabougrissement causé par (CpSDAV).

1.9- Les ravageurs et les nématodes

Le pois chiche est la légumineuse la plus tolérante aux insectes, peut être du fait de l'importante quantité d'acide malique sécrétée par les feuilles. Des attaques de ravageurs rencontrés sur d'autres cultures comme les taupins et quelques dégâts de noctuelles (*Helicoverpa armigera*) qui percent les gousses et mangent les jeunes graines ont été observés. Mais seule la mineuse (*Liriomyza cicerina*) qui creuse des galeries dans les

feuilles pourrait présenter un risque sérieux. Par contre, le pois chiche est résistant aux sitones, aux pucerons et aux bruches (Gaur *et al.*, 2010).

Le puceron *Aphis carccivora* Koch, le vecteur du virus *Chickpea* bushy dwarf virus (CpBDV) qui provoque le rabougrissement (Schwinghamer *et al.*, 2009).

L'infestation des graines par les insectes de cet ordre est redoutable L'espèce *Callosobruchus maculatus* (La bruche du pois chiche) provoque une perte en poids et en éléments nutritifs de la graine (Gaur *et al.*, 2010).

Parmi les parasites qui peuvent causés des dégâts importants sur le pois chiche, les nématodes (ICRISAT, 1990):

- *Rotylenchulus reniformis* agent causal de la galle des racines.
- *Heterodera ciceri* et *Heterodera rosii* agents causals des racines perlées.
- *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne artiellia*, *Meloidogyne incognita* et *Meloidogyne javanica* agents causals de la maladie des nœuds des racines.
- *Pratylenchus brachyurus* et *Pratylenchus thornei* causants des lésions des racines.

Tableau 3 : Maladies fongiques les plus importantes du pois chiche.

La maladie	Agent causal	Symptômes	Références
Fusariose vasculaire	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. emend Snyder: Fr. f. sp. <i>ciceris</i> (Padwick) Matuo & K. Sato	- Racines: décoloration de tissus vasculaires. - Plantes: jaunissement foliaire progressif avec décoloration vasculaire, suivi par la mort de la plante après 40 jours (pathotype de jaunissement). Chlorose sévère et flaccidité, décoloration vasculaire et la mort de la plante dans 20 jours après inoculation (pathotype de flétrissement).	Nene <i>et al.</i> , 1991
Verticilliose	<i>Verticillium alboatrum</i> Reinke & Berth.	-les symptômes de cette maladie apparaissent sous forme d'un jaunissement finissant par un flétrissement totale de la plante. Les tissus de xylème prennent une coloration marron claire.	Nene <i>et al.</i> , 1991
Anthraxnose	<i>Ascochyta rabiei</i> (Pass.) Labr.	-Toutes les parties aériennes de la plante peuvent être attaquées, sur les tiges et les pétioles, des taches brunes, ovoïdes ou allongées sur les folioles, les macules d'abord brunâtres puis grisâtres, sont arrondies ou oblongues et bordées d'une marge plus foncée. Les folioles atteintes jaunissent par la suite et tombent sur le sol, sur les gousses, les taches pressentent une légère dépression avec également une bordure rougeâtre.	Haware <i>et al.</i> , 1986 ; Nene <i>et al.</i> , 1991
	<i>Phoma medicaginis</i> Malbr. & Roum	-Les symptômes peuvent être confondus avec ceux causés par <i>Ascochyta rabiei</i> . Des taches irrégulières, brunes claires sur les feuilles, les tiges et les gousses. -Les pycnides sont irrégulières, sombres et submergées.	Nene <i>et al.</i> , 1991
Pourriture molle des racines	<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	- Plantes: jaunissement et flétrissement à tout stade phénologique de la plante. - Racines: pourriture avec décoloration brun sombre qui étend au-dessus du niveau de la terre, les tissus de la racine sont mous et humides.	Nene <i>et al.</i> , 1991
Pourriture sèche des racines	<i>Rhizoctonia bataticola</i> Taub. (Butler)	-La maladie qui se manifeste généralement au stade floraison, s'accompagne d'un dessèchement et de l'éclatement de l'écorce des racines.	Nene <i>et al.</i> , 1991

Tableau 3 (la suite): Maladies fongiques les plus importantes du pois chiche.

La maladie	Agent causal	Symptômes	Références
Pourriture des racines et des graines	<i>Pythium ultimum</i> Trow	- <u>Plantes</u> : flétrissement progressif. - <u>Racines</u> : nécrotiques et décolorées.	Nene <i>et al.</i> , 1991
Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Fr.	-La maladie est très importante pour la culture, les symptômes sont caractérisés par des taches grises et marrons au niveau de la partie aérienne de la plante.	Nene <i>et al.</i> , 1991 ; Pande <i>et al.</i> , 2001
Pourriture blanche des tiges	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-Des taches sclérotiques irrégulières blanches sur la tige et la base des branches.	Josi et Sing, 1969 cité par Nene <i>et al.</i> , 1991
Pourriture racinaire	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	- Les plantes infectées manifestent un flétrissement partiel ou total accompagné de lésions radiculaires et d'un jaunissement foliaire sans coloration vasculaire, d'une réduction de la croissance suivie de la mort de la plante.	Nene <i>et al.</i> , 1991

Partie I : *Synthèse bibliographique*

II- Le flétrissement vasculaire du pois chiche

II- Le flétrissement vasculaire du pois chiche**II.1- L'agent pathogène: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC)****II.1.1- Historique et taxonomie**

Les espèces de *Fusarium* provoquent des maladies qui entraînent des pertes économiquement importantes comme le flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire et du collet chez des plantes cultivées aux champs et en serre (Fravel *et al.*, 2003). Le genre *Fusarium* doit être considéré comme un faisceau d'espèces très diversifiées du point de vue morphologique, chacune de ces espèces est représentée dans la nature par une majorité de souches saprophytes ou de parasites secondaires regroupant des formes plus ou moins spécialisées et douées d'une véritable virulence. Le genre *Fusarium* a été découvert par Link en 1809 et délimité dans son sens actuel par Appel et Wollenweber (1910) et correspond à la forme de reproduction asexuée.

Fusarium oxysporum (Schlecht). Snyder et Hansen (Snyder et Hansen, 1940) est l'espèce la plus répandue. Elle comporte des formes phytopathogènes les plus fréquentes et les plus importantes de la microflore fongique des sols cultivés (Baayen *et al.*, 2000).

Le genre *Fusarium* comporte une cinquantaine d'espèces dont certaines sont connues pour engendrer des pathologies. Dans le complexe d'espèces *F. oxysporum*, les noms attribués aux différentes formes spéciales sont directement dérivés de l'hôte sur lequel le champignon a été isolé. L'espèce *F. oxysporum* peut infecter un grand nombre de plantes, souvent de façon très spécifique. Plus de 120 formes spéciales et races ont été ainsi identifiées, basées sur leur spécificité d'hôtes (Armstrong et Armstrong, 1981), parmi lesquelles la forme spéciale *ciceris* qui est responsable de la fusariose vasculaire de pois chiche.

Le genre *Fusarium* appartient au phylum des Deutéromycètes (champignons imparfaits), car la plupart des espèces étaient d'abord décrites sur la base de caractères morphologiques et une reproduction sexuée n'a pas été observée. Il appartient à la sous-classe des Hyphomycètes et à la famille des tuberculariacées, il fait partie de la section *Elegans* (Nelson *et al.*, 1983).

Des formes sexuées (téléomorphes) ont été observées pour certaines espèces de *Fusarium*. Ces dernières font toutes partie du Phylum d'Ascomycota, de la famille des Nectriales et notamment des genres *Gibberella* et *Nectria* (Seifert, 2001). Il est proposé

d'être plutôt proche du groupe téléomorphique *Gibberella* que *Nectria* (Di Pietro *et al.*, 2003, Michielse et Rep, 2009).

La production de métabolites secondaires et notamment de toxines (mycotoxines et phytotoxines) est courante chez les *Fusarium*, et le profil de ces composés peut être utilisé pour la classification des espèces (Thrane, 2001).

II.1.2- Biologie et reproduction de *F. oxysporum*

Dans un milieu de culture solide, comme le milieu PDA (Potato Dextrose Agar), les différentes formes spéciales de *F. oxysporum* peuvent varier d'apparence. Généralement, au début de la croissance, le mycélium aérien est blanc et peut ensuite changer vers une grande variété de couleurs (du violet jusqu'au pourpre foncé) selon l'isolat de *F. oxysporum* (ou la forme spéciale). En revanche, si les sporodochium (amas de conidiophores provenant d'un stroma ou masse d'hyphes) sont abondants, la culture apparaîtra avec une couleur crème ou orange (Smith *et al.*, 1988).

Chez ce champignon, la phase sexuée n'existe pas ou, du moins, n'a jamais été observée. Le *F. oxysporum* ne se multiplie donc que par voie végétative ou par l'intermédiaire de spores asexuées, conduisant à des descendance de type clonal. Ces formes imparfaites (anamorphes) sont caractérisées par un mycélium septé et ramifié (Belabid, 2003). *Fusarium oxysporum* produit trois types de spores asexuées: microconidies, macroconidies et chlamydospores y compris la forme spéciale *ciceris* (Figure 6, Tableau 4).

Les microconidies sont unicellulaires ou bicellulaires et sont produites abondamment et fréquemment par ce champignon. C'est aussi le type de spore qui est observé fréquemment à l'intérieur des vaisseaux des plantes infectées. Les microconidies de *F. oxysporum* ont souvent la forme d'une virgule ou sont ellipsoïdales (Llorens *et al.*, 2006). Les macroconidies sont composées de trois à cinq cellules. Elles sont pointues et courbées jusqu'au bout; dans beaucoup d'espèces on observe une cellule basale en forme de pied (Seifert, 2001). Ces spores peuvent être observées dans des sporodochiums à la surface des plantes qui ont été détruites par le pathogène (Schippers et van Eck, 1981; Nelson *et al.*, 1983).

Les chlamydospores sont des spores rondes d'une ou deux cellules, entourées d'une paroi épaisse plus ou moins pigmentée. Elles sont observées en position terminale ou

intercalaire des hyphes mycéliens. Ces chlamydospores sont formés souvent en forme de paires et quelques fois en triplets mais rarement en forme associée sous forme d'amas de cellules (Nelson *et al.*, 1983).

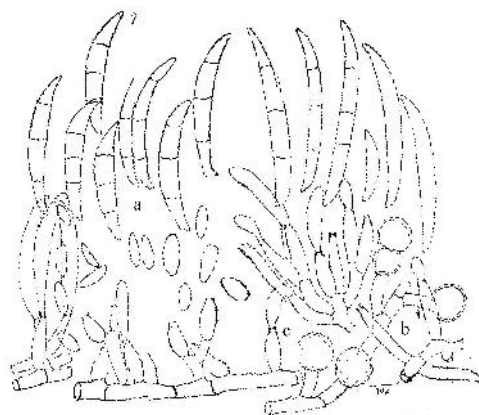


Fig. 6: Morphologie du *Fusarium oxysporum*, **a** : Conidies (Macroconidies et Microconidie), **b** : Conidiophores et **c** : Chlamydospores (Booth, 1971).

Tableau 4 : Types de spores asexuées de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Types de spores	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>
Microconidies	ovales, droites, ou incurvées (2,5-3,5 x 1-11 μ), portées par des conidiophores courts ou latéralement par les hyphes (El Aoufir, 2001).
Macroconidies	(3,5-4,5 x 25-65 μ), moins nombreuses et portées par des conidiophores ramifiés ayant 3 à 5 septa; elles sont fusoides et pointues aux deux extrémités (El Aoufir, 2001).
Chlamydospores	se forment dans les cultures âgées (El Aoufir, 2001).

II.2- La maladie

II.2.1- Importance et dégâts de flétrissement vasculaire du pois chiche

Le facteur majeur qui limite la production du pois chiche est le flétrissement vasculaire qui est causé par *F. oxysporum* Schlechtend. Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo et K. Sato. (Nene et Reddy, 1987 ; Haware, 1990 ; Jalali et Chand, 1992). Cette maladie est la plus redoutable et la plus dévastatrice du complexe de flétrissement et des pourritures radicaires dans de nombreuses zones productrices du pois chiche. Elle a été rapportée dans 33 pays du monde (Nene *et al.*, 1996). La fusariose vasculaire du pois chiche est

initialement rapportée en Inde (Butler, 1918 cité par Ahmad, 2010) où elle a été observée. Les pertes qu'elle occasionne sont variables et importantes; elles ont été estimées à 10-15 % du rendement annuel en Inde (Nene et Haware, 1980) et supérieures à 40 % en Tunisie; elles sont plus marquées quand le flétrissement survient au stade plantule (El Aoufir, 2001).

Cette maladie est plus répandue dans le sous-continent indien (Kausar, 1960), en Turkey (Soran, 1975), en Iran (Zamani *et al.*, 2004), en Syrie et Éthiopie (Saxena et Singh, 1987), au Pakistan (Iqbal *et al.*, 2005), au Chili, au Pérou, en Espagne (Carranza, 1965), aux États-Unis (Westerlund *et al.*, 1974), au Bangladesh (Saxena et Singh, 1987), au Mexique, en Tunisie, en Algérie et au Maroc (Halila et Strange, 1996; El Aoufir, 2001).

II.2.2- Epidémiologie et cycle évolutif de FOC

II.2.2.1- L'inoculum primaire

Le *Fusarium oxysporum* est un parasite tellurique doué d'une vie saprophytique où il croît sur des débris de plantes ou survit en forme de chlamydospores, il est capable de survivre pendant plusieurs années dans les conditions les plus défavorables (Haware *et al.*, 1978). Le *F. oxysporum* peuvent même coloniser des zones profondes du sol ; c'est le cas de la forme spéciale *ciceris* (Haware *et al.*, 1986). Selon Blancard (1988), le *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* persistent dans le sol et à grande profondeur (80 cm). Le *F. oxysporum* f. sp. *melonis* persistent dans le sol à une profondeur jusqu'à 1 m, voire 1,5 m.

II.2.2.2- Infection et symptômes

Elle se fait au moyen des chlamydospores (Haware *et al.*, 1986) qui restent dormantes jusqu'à la stimulation de la germination par des substrats organiques ou des exsudats racinaires. Suite à la germination, il y a formation d'un mycélium. Si les conditions sont favorables, le thalle produit des conidies (Beckman et Roberts, 1995; Agrios, 2005). En présence d'une plante hôte, le mycélium envahit tout d'abord les racines suite à la pénétration de l'épiderme (Beckman et Roberts, 1995). Le tube germinatif qui s'introduit à travers l'épiderme du système racinaire envahit les vaisseaux conducteurs (Figure 7), dans les quels les microconidies sont transportées de façon passive par le flux du xylème et peuvent ainsi infecter des parties aériennes. La présence de mycélium et de ces conidies ainsi que les réponses locales de la plante (formation des tyloses, gommages)

vont provoquer un blocage du transport d'eau et d'éléments nutritifs dans les vaisseaux suivi de l'apparition des symptômes de flétrissement (Klein et Correll, 2001).

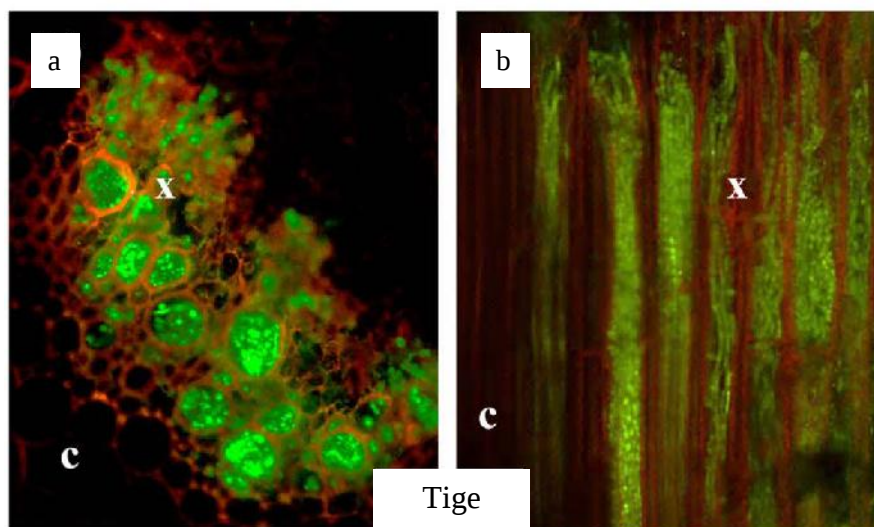


Fig.7: Colonisation des vaisseaux conducteurs du pois chiche (cultivar JG. 62) par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (a–b); c: cortex, x: xylème (Jiménez-Fernandez *et al.*, 2013).

L'infection s'accompagne d'une réduction de la chlorophylle et parallèlement d'une augmentation des acides organiques, des polyphénols et des hydrates de carbone. Les symptômes peuvent se manifester à deux stades de développement de la culture (Trapero-Casas et Jimenez-Diaz, 1985). Ils apparaissent au stade plantule, trois semaines après le semis: les feuilles des plantes affectées montrent une flaccidité suivie d'une coloration vert-terne et d'un dessèchement conduisant à la mort précoce de la plante. Il s'agit d'un flétrissement typique. Les symptômes peuvent se manifester aussi chez les plantes adultes sous forme d'un jaunissement progressif de bas en haut avec une nécrose des folioles. Il s'agit d'un flétrissement tardif appelé aussi jaunissement vasculaire. Dans les deux cas, les racines des plantes affectées gardent une apparence saine et leurs tiges montrent une coloration brune des tissus internes quand elles sont sectionnées verticalement.

Il est probable que ces deux types de symptômes soient induits par des biotypes différents de l'agent pathogène (El Aoufir, 2001).

Le cycle infectieux de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* est présenté sur la figure 8.

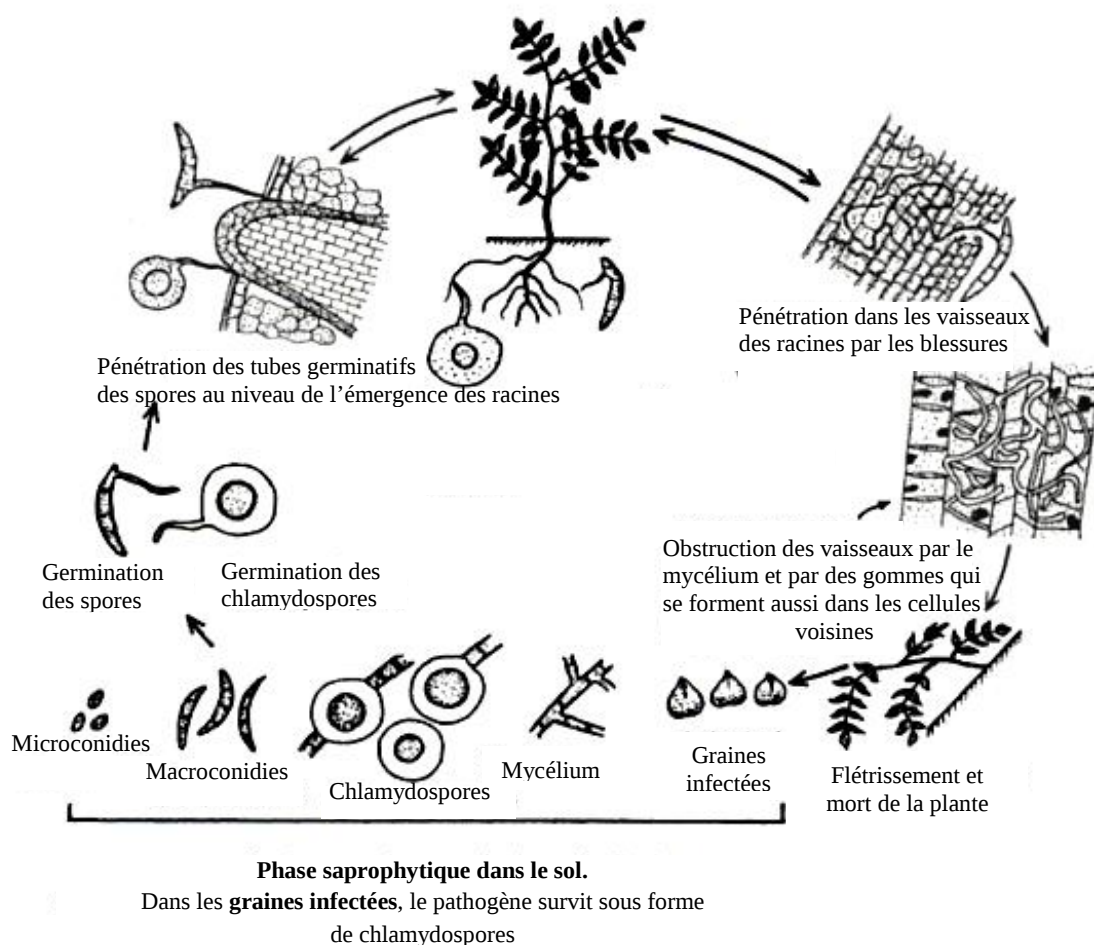


Fig. 8: Cycle infectieux de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Jalali et Chand, 1992).

II.2.2.3- Transmission du champignon

Le *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* a été transmis par les graines récoltées du pois chiche infectées (Haware *et al.*, 1978). La transmission de FOC par les semences fut rapportée pour la première fois en Californie (Westerlund *et al.*, 1974), ensuite en Espagne, en Inde (Haware *et al.*, 1986), au Maroc où le degré d'infection des semences locales a atteint 17% (El Aoufir, 2001). Il est évident que le traitement des semences est indispensable pour éviter l'introduction du FOC dans des aires de cultures saines et son installation dans le sol.

II.2.3- Moyens de lutte contre la maladie

Le contrôle de la fusariose vasculaire est difficile en raison de la nature du pathogène transmis par le sol et sa capacité de persister de longues périodes, même en

l'absence de la plante hôte (Frederix et Den Brader, 1989). En outre, les chlamydospores de FOC peuvent survivre 6 ans dans le sol.

Les mesures préventives sont importantes et efficaces car une fois le champignon est présent dans le sol, l'emploi des autres méthodes de lutte seront très coûteuses. Ces pratiques contre le flétrissement vasculaire consistent à éviter les conditions qui favorisent la maladie soit, un sol léger et acide et un arrosage à l'eau froide soit, un manque d'azote et de calcium (Barna *et al.*, 1985; Duval, 1991). Les pratiques culturales à savoir la destruction des débris de récolte des plantes fusariées, la jachère de longue durée, la rotation culturale avec des cultures non- hôtes, peuvent agir sur la densité de l'inoculum présent dans le sol (Booth, 1971; Edel *et al.*, 1995). Cette pratique d'alternance de culture apporte des effets bénéfiques compte tenu de la préservation nécessaire des ressources du sol. De plus, elle induit une variation naturelle de la flore favorable à la résistance aux pathogènes. Il a été signalé l'importance de certaines méthodes prophylactiques telle que la solarisation des sols et le choix conforme d'une conduite culturale défavorisant l'installation et la croissance de l'agent pathogène. Les fusarioses vasculaires sévissent moins en conditions d'irrigation réduite ainsi que dans des sols à pH élevé, riches en calcium et potassium, pauvres en oligoéléments, magnésium et dont l'azote est surtout sous forme nitrique plutôt qu'ammoniacale (Woltz et Jones, 1981).

Toutes ces conditions ne sont pas suffisantes pour protéger totalement la culture contre les infections et en outre, la plupart d'entre elles sont défavorables à une bonne productivité (Bulit *et al.*, 1967). De plus, il est connu que des formes spéciales comme *melonis*, *ciceris* et *lentis* peuvent coloniser d'autres plantes sans provoquer de symptômes apparents, ce qui rend impossible l'éradication de la maladie par la pratique des cultures en rotation (Belabid, 2003).

De nombreux fongicides sont disponibles pour lutter contre les champignons pathogènes. Singh et Jha (2003) ont évalué l'efficacité *in vitro* de sept fongicides, à savoir thiram, Bavistin (carbendazim), Blitox (cuivre oxychloride), Captaf (captan), Indofil le M 45 (mancozeb+thiophanate-méthyl) Ridomil MZ (mancozeb+metalaxyl) et Kitazin (iprobénfos), vis – à – vis du flétrissement vasculaire du pois chiche (*in vitro* chacun à la concentration de 1 % et *in vivo*). Des travaux similaires ont été réalisés par Elfatih *et al.* (2002) afin d'évaluer l'effet des fongicides Tecto-TM et Quinolate sur l'agent du flétrissement vasculaire du pois chiche en plein champ. L'augmentation de l'utilisation des fongicides provoque plusieurs effets négatifs comme le développement de la résistance des

agents pathogènes. Ces fongicides ont aussi un effet néfaste sur l'environnement (Gerhardson, 2002).

Comme pour de nombreuses maladies, la résistance génétique des cultivars s'est avérée être le moyen le plus efficace pour la lutte contre les agents du complexe de flétrissement et de pourritures radiculaires. Des gènes de résistance vis-à-vis du *F. oxysporum* existent chez beaucoup d'espèces végétales et ont été introduits par sélection dans des variétés cultivées. Ainsi, chez la tomate, le melon, le haricot et le pois chiche des gènes dominants de résistance ont été identifiés (Huang et Lindhout, 1997; Hawkins *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2001; Halila *et al.*, 2008; Diener et Ausubel, 2005).

Le pois chiche fait partie des espèces végétales impliquées dans des projets de séquençage comme d'ailleurs d'autres cultures stratégiques telles que le riz. Aussi, et suite à des essais de sélection, des cultivars résistants au flétrissement vasculaire ont été identifiés et utilisés dans les programmes de croisement. Cependant, des cultivars connus pour leur résistance vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* ont manifesté une nette sensibilité à la maladie dans certaines localités, ce qui a suggéré l'existence de races au sein de cette forme spéciale (El Aoufir, 2001). Kapoor *et al.* (1991) ont évalué 39 variétés pour la résistance vis-à-vis du flétrissement vasculaire du pois chiche. Parmi ces variétés, GNG-795 et PDG 83-31 ont montré une faible incidence de maladie variant entre 0-20%, donc se sont considérées comme étant des variétés résistantes.

Cependant, l'efficacité de variétés résistantes dans le contrôle d'une maladie peut être sérieusement limitée par la variabilité de la pathogénicité, y compris l'apparition de nouvelles races pathogènes et pathotypes (Jiménez Gasco *et al.*, 2004).

Comme pour toutes les maladies causées par des microorganismes telluriques, les fusarioses ne peuvent pas être éradiquées par des produits chimiques alors que la seule et l'unique mesure pour contrôler les maladies aux champs est l'utilisation de variétés des plantes résistantes. En conséquence, les stratégies du contrôle biologique des fusarioses ont acquis un intérêt particulier. On sait depuis longtemps que l'incidence de la fusariose peut varier sur des sols différents infestés de *Fusarium*. Ce phénomène de « sols suppressifs » a été trouvé corrélé parfois aux caractéristiques pédologiques mais surtout à sa population microbienne (Alabouvette *et al.*, 2006). Des études qui portent sur ce phénomène et les microorganismes impliqués sont nombreuses (Alabouvette *et al.*, 1984 ; Alabouvette, 1986, Kaur *et al.*, 2010).

D'ailleurs, des bactéries et des champignons ont été isolés à partir de sols suppressifs et leur potentiel en lutte biologique est étudié. Parmi ces bactéries, des espèces du genre *Pseudomonas* ont été décrites pour empêcher le développement de la maladie du *Fusarium* root rot chez la tomate (Simons *et al.*, 1996; Dekkers *et al.*, 2000; Bolwerk *et al.*, 2003). Il est particulièrement intéressant que parmi les champignons des sols suppressifs on trouve des souches saprophytes de *Fusarium*. Des souches non pathogènes de *F. oxysporum* et *F. solani* ont été isolées à partir de sol de Châteaurenard en France et ont fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* dans le but de tester leur capacité à protéger des plantes de tomate contre la fusariose vasculaire (Alabouvette, 1986; Fravel, 2005). L'effet protecteur d'une souche de *F. oxysporum* 47 (*Fo47*) a été particulièrement étudié. Fuchs *et al.*, (1997) ont montré que *Fo47* induisait des réactions de défense chez la tomate, ce qui indique une participation de la résistance induite dans la protection. Mais des mécanismes de compétition pour les nutriments au sol et la rhizosphère jouent également un rôle non négligeable (Benhamou *et al.*, 2002; Fravel, 2005). La présence de *Fo47* dans le sol était capable de protéger plusieurs espèces végétales comme le lin, melon et tomate contre ses respectives formes spéciales de *F.oxysporum* : *lini*, *melonis* et *lycopersici* (Aimé *et al.*, 2008).

De façon générale l'utilisation de souches protectrices de *F. oxysporum* pour le contrôle du flétrissement vasculaire a été rapportée pour plusieurs plantes et souches fongiques, comme dans le cas du bananier, du concombre, du melon, du lin, de l'épinard et de la pastèque (Fravel *et al.*, 2003).

Certains champignons sont des parasites d'autres champignons, le cas pour de nombreuses espèces du genre *Trichoderma*. Probablement ce phénomène de parasitisme est du au système enzymatique puissant de ce genre de champignon. En effet, *T. harzianum* a été décrit comme capable de contrôler les pathologies induites par *F. oxysporum* sur le bananier (Thangavelu *et al.*, 2004). Sunil *et al.* (2007) ont évalué l'antagonisme de 10 isolats appartenant aux trois espèces de *Trichoderma* (*T. viride*, *T. harzianum* et *T. virens*) contre quatre races différentes de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* généralement répandues en Inde : Dharwad (race 1), Kanpur (race 2), Ludhiana (Race 3) et Delhi (race 4).

Jayalakshmi *et al.* (2009) ont examiné l'induction de défense de la plante contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* par inoculation des racines du pois chiche cultivar JG 62 avec l'agent de lutte biologique *Trichoderma harzianum* L1.

En Syrie, l'utilisation de l'isolat *Bacillus* spp., isolé à partir du sol, n'a pas affecté la germination de la semence de lentille; il a par contre réduit significativement la sévérité de la maladie (Belabid, 2003). En revanche, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* isolée de la rhizosphère du pois chiche est capable de protéger les plants de pois chiches et de pois contre le flétrissement vasculaire causé par *FOC*; l'inoculation avec *Pseudomonas aeruginosa* a diminué significativement l'incidence de la maladie chez des géotypes du pois chiche et du pois sensibles ou modérément résistants (Landa *et al.*, 1997).

El-Mohamedy et Abd El-Baky (2008) ont évalué l'efficacité de l'enrobage des graines par des agents de contrôle biologique (*T. harzianum*, *Bacillus subtilis* et *P. fluorescens*) et qui par conséquent a réduit l'incidence de la maladie.

Partie I : *Synthèse bibliographique*

III. <i>Bacillus</i> rhizosphériques promotrices de la croissance des plantes (PGPR) et agents de lutte biologique
--

III. *Bacillus* rhizosphériques promotrices de la croissance des plantes (PGPR) et agents de lutte biologique

III- 1. Intérêt de la lutte biologique dans le contrôle des maladies phytopathogènes

D'après la définition de Cook et Baker (1983), la lutte biologique consiste à réduire la densité d'un agent pathogène et/ou l'activité de celui-ci (le potentiel infectieux) en mettant en œuvre un ou plusieurs organismes autres que l'homme.

Dans le sens écologique strict, l'application de la lutte biologique peut être considérée comme une stratégie pour restaurer la biodiversité dans les agro-écosystèmes par l'addition des antagonistes naturels (parasite ou prédateur) (Altieri, 1999 ; Nautiyal *et al.*, 2000 cités par Aouar, 2012).

La lutte biologique a une efficacité relative et demande plus de connaissances et d'observations, mais à long terme, elle est beaucoup plus intéressante sur le plan environnemental et économique (Toussaint, 1996). En effet, la possibilité de rendre un sol suppressif à une maladie en y introduisant des microorganismes s'avère très prometteuse, surtout à une époque où les traitements phytosanitaires à base de produits chimiques de synthèse suscitent une méfiance de plus en plus grande (Lugtenberg *et al.*, 1991). Les traitements chimiques tels que les fongicides donnent de bons résultats à court terme, mais à long terme leur accumulation ou l'accumulation de leurs résidus dans l'environnement représente un danger qu'on ne peut plus négliger (Toussaint, 1996).

En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité dans les écosystèmes, la lutte biologique présente un rôle important dans le contrôle des maladies phytopathogènes. Emmert et Handelsman (1999) affirment que la lutte biologique peut être aussi efficace dans le contrôle des maladies phytopathogènes que l'utilisation des fongicides chimiques.

L'utilisation de microorganismes fait partie des alternatives prometteuses à l'emploi des fongicides, de part l'ubiquité de ces microorganismes, leur grande diversité et leur dissémination dans les sols rhizosphériques (Berg *et al.*, 2005).

La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de biocontrôle efficace. L'efficacité est notamment liée à l'utilisation de plusieurs modes d'action (Cook, 1993 ; Benbrook *et al.*, 1996) et à la capacité de l'agent de lutte biologique à coloniser et à s'installer dans le milieu rhizosphérique des plantes (Singh *et al.*, 2003).

Ce paramètre correspond à la compétence rhizosphérique (Whipps, 2001). Cette dernière réside dans l'adaptation de l'agent antagoniste aux conditions biotiques et abiotiques du sol. L'agent aussi doit être doté d'une capacité à coloniser les racines de la

plante hôte (Nautiyal, 2000 ; Whipps, 2001). En plus de cette compétence, l'agent de biocontrôle doit disposer de divers mécanismes de lutte biologique lui permettant d'inhiber le développement de l'agent phytopathogène et de réduire ainsi l'incidence de la maladie qu'il provoque (Errakhi, 2008).

Ces dernières années, l'exploration et l'introduction des agents de contrôle biologiques dans les systèmes de production des cultures est en hausse continue (Nicot *et al.*, 2011). Ceci va en parallèle avec l'augmentation des articles publiés sur ce sujet, soit 300 publications/ an en 1990 à environ 800 en 2010 (Nicot *et al.*, 2011). La recherche et l'isolement de ces agents de lutte biologiques se fait généralement à partir de la rhizosphère qui est le lieu d'interaction entre le sol, la plante et les microorganismes. La recherche de ces agents potentiels de contrôle biologique doit cibler les microorganismes qui colonisent cette rhizosphère (Standing *et al.*, 2008).

La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (Haas et Defago 2005 cité par Adam, 2008). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique des maladies d'origines telluriques. Ils ont aussi la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont facilement manipulables. De plus, les bacillus offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes aux conditions défavorables du milieu (Raaijmakers *et al.*, 2002).

III-2. La rhizosphère et les rhizobactéries

Les racines produisent et sécrètent continuellement des composés dans la rhizosphère (Bais *et al.*, 2006). Cette dernière est décrite comme « une étroite zone du sol sujette à l'influence des racines, ce qui se manifeste par la perte ou l'exsudation de substances affectant l'activité microbienne » (Westover *et al.*, 1997). On distingue en général le rhizoplan qui est l'interface racine/sol et le sol rhizosphérique situé au voisinage immédiat de la racine et soumis à son influence.

Au niveau de la rhizosphère, les racines libèrent des composés sous forme de mucilage, plus de 40% des produits de photosynthèse passent dans le système racinaire (Whipps, 2011). Les exsudats représentent la partie la plus importante des substances libérées par les racines, surtout dans la région apicale (Figure 9). C'est également celle qui

est la plus rapidement métabolisée par les microorganismes. Selon Lesuffleur *et al.* (2007), l'exsudation est définie comme la libération de composés solubles de faible poids moléculaire. Ces exsudats sont généralement composés de sucres, d'acides aminés, de facteurs de croissance, de vitamines, d'enzymes et d'acides organiques. Il est apparu que les bactéries étaient capables de localiser les racines grâce aux exsudats tels que les hydrates de carbone ou les acides aminés, qui stimuleraient leur chimiotaxie (Somers *et al.*, 2004). De même, de nombreuses bactéries se multiplient dans la rhizosphère en réponse à la libération de flavonoïdes (Hartwig *et al.*, 1991) et, en retour, stimulent l'exsudation de ces composés dans la rhizosphère (Recourt *et al.*, 1991).

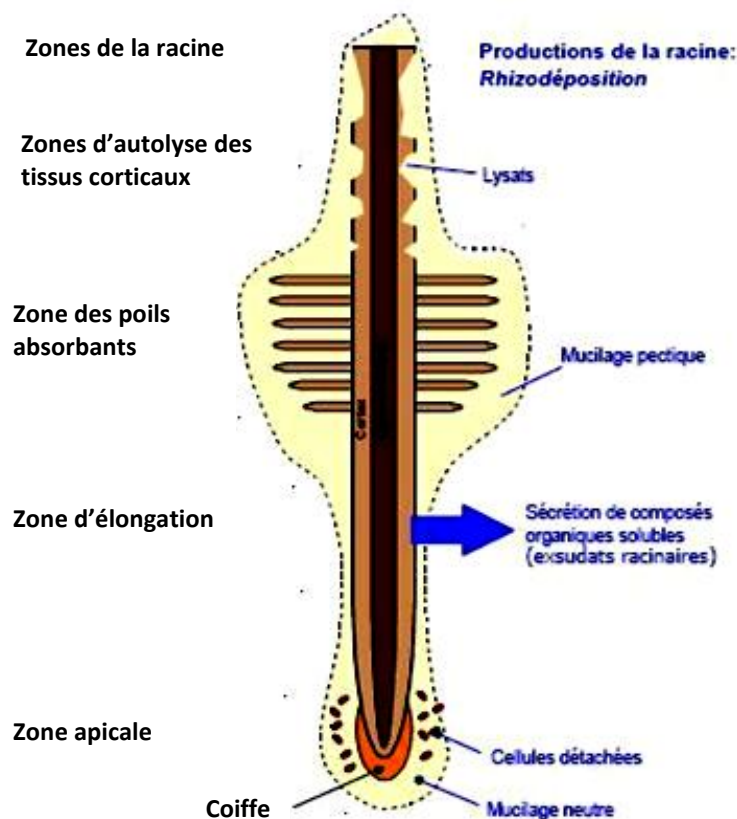


Fig. 9: Schéma simplifié d'une racine fine et des rhizodépôts en fonction de la structure racinaire (Aragno et Tarnawski, 2002).

Les exsudats racinaires représentent une source nutritionnelle pour la microflore rhizosphérique, et qui agissent soit en stimulant ou en inhibant certaines espèces (effet rhizosphérique) (Bertrand *et al.*, 2000 ; Ann *et al.*, 2003). En outre, la compétition entre les

microorganismes pour les nutriments et la colonisation des sites contribue à cette dynamique microbienne au niveau de la rhizosphère.

La structure des communautés microbiennes demeure complexe et dépend de la composition des exsudats racinaires (Yang et Crowley, 2000) mais également de l'âge de la plante, du type de racines et de la composition du sol (Chiarini *et al.*, 1998).

Parmi les bactéries de la rhizosphère, certaines peuvent fortement agir sur la nutrition des plantes par des mécanismes variés, et notamment les bactéries dites PGPR (Plant-Growth- Promoting Rhizobacteria) également appelées rhizobactéries (Lugtenberg et Kamilova, 2009). Parmi les PGPR, de nombreux genres sont recensés tels *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Thiobacillus* (Kloepper *et al.*, 2004 ; Gray et Smith, 2005).

La colonisation bactérienne des racines se réalise progressivement à partir de cellules isolées qui se développent ensuite en biofilm (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

Cette colonisation du système racinaire constitue une étape clé dans l'expression de l'effet bénéfique des antagonistes introduits artificiellement dans le système plante-sol. Elle est régie par de nombreux facteurs relatifs aux souches bactériennes et aux conditions biotiques et abiotiques de l'environnement de la plante (système racinaire) (Milus et Rothrock, 1991). L'apport des antagonistes dans le système plante-sol peut s'effectuer de trois manières différentes :

- soit directement dans le sol par simple aspersion avec une suspension bactérienne de concentration connue (Digat *et al.*, 1988),
- soit au niveau des racines par trempage de celles-ci dans une suspension bactérienne (Digat *et al.*, 1988). Cette méthode est souvent utilisée conjointement avec la première.
- soit au niveau des semences par leur bactérisation (Digat, 1992). La bactérisation des semences, reste la méthode la plus prometteuse et la plus utilisée pour l'introduction des agents antagonistes dans l'écosystème sol-plante.

L'installation précoce de ces agents biologiques favorisera la colonisation de la spermosphère et de la rhizosphère et pourra empêcher l'agression de la semence par certaines bactéries et champignons pathogènes (Digat, 1989).

Quatre techniques de bactérisation des semences peuvent être appliquées : le trempage, le pelliculage, l'enrobage et l'encapsulation (Digat, 1989 ; Digat, 1992). Le principe de base de ces différentes méthodes est de parvenir à immobiliser temporairement

les bactéries sur les semences, tout en conservant un taux convenable de survie bactérienne et de germination de la graine (Amkraz, 2013).

La colonisation de la spermosphère est le facteur principal déterminant de la colonisation racinaire, d'où l'intérêt indéniable de la bactérisation des semences (Digat, 1989).

III-3. Généralités sur les *Bacillus* : taxonomie, écologie et habitat, phénomène de la formation des spores

Le genre *Bacillus* a été établi par Cohn en 1872, initialement avec deux espèces formant les endospores : *B. anthracis* et *B. subtilis*. Depuis, ce genre a subi des changements taxonomiques considérables pour atteindre 146 espèces dans la 5^{ième} édition du Bergey's manuel of Systematic Bacteriology (Bergey *et al.*, 1939 ; Hernández *et al.*, 2013). Les études de Smith *et al.* (1952) et Gordon *et al.* (1973) sur plus de 1114 souches de bactéries aérobies formant des endospores ont aidé à réduire ce nombre à 22 espèces bien définies dans la 8^{ième} édition du Bergey's manuel of Systematic Bacteriology (Fritze, 2004).

Dans la deuxième édition du Bergey's manuel of Systematic Bacteriology (2ed, 2004), 37 nouveaux genres avec *Bacillus* sont inclus dans la famille des *Bacillaceae*.

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae* et à l'ordre *Bacillales* (Jackson *et al.*, 1999). Les bactéries de cette famille sont de grands bacilles en forme de bâtonnets à Gram positif, groupées en chaînettes (Figure 10), et sont donc classifiées comme aérobies strictes ou des anaérobies facultatives (Collins et Jacobsen, 2003), et intégrées par 88 espèces (Fritze, 2004).

La taxonomie du genre *Bacillus* est constituée de deux groupes d'organismes couramment appelé le groupe *B. subtilis* et le groupe *B. cereus*. Les espèces de groupe *B. subtilis* sont étroitement liées et donc pas facilement distinguables et inclus les deux sous-espèces de *B. subtilis* (*B. subtilis* subsp. *subtilis* et *B. subtilis* subsp. *spizizenii*), *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis*, *B. sorensis* et *B. vallismortis* (Slepecky et Hemphill, 2006). Les espèces du groupe *B. cereus* comprennent des espèces étroitement apparentées telles que *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, et *B. pseudomycoides*. L'espèce *B. weihenstephanensis* semble composée de souches de *B. mycoides* et *B. cereus* (Jackson *et al.*, 1999).

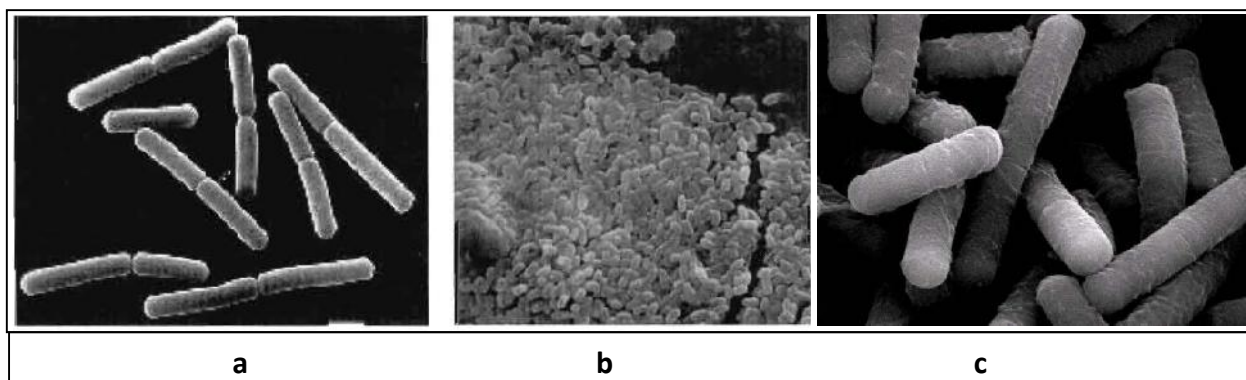


Fig. 10 : Caractéristiques morphologiques des *Bacillus* (**a** : cellules végétatives, **b** : spores) (Cheikh Rouhou, 2006).
c : *B. subtilis* observé en microscopie électronique à balayage
 (de R. Carballido-López cité par Marchadier, 2009)

Le genre *Bacillus* est abondant dans les diverses niches écologiques qui incluent le sol, la plante, l'eau et l'air (Zhang *et al.*, 2009; Longan et Halket, 2011). La plupart des espèces appartenant à ce genre sont des microorganismes ubiquitaires et vie en mode saprophyte. Le genre *Bacillus* apparaît extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique que phénotypique notamment dans sa distribution dans l'environnement (Claus et Berkeley, 1986 ; Gordon *et al.*, 1973 cités par Cheikh Rouhou, 2006).

L'habitat primaire du genre *Bacillus* est le sol et la rhizosphère (particulièrement les systèmes racinaires des plantes). Des espèces de *Bacillus* sont retrouvées dans la rhizosphère de diverses plantes cultivées : le blé, le maïs, le sorgho, la canne à sucre, l'orge et des arbres forestiers (Holl et Chanway, 1992). En effet, *B. subtilis* est isolé à partir de la rhizosphère de nombreuses espèces végétales à une concentration aussi élevée que 10^7 par gramme de sol (Mahaffee et Backman, 1993).

En outre, ils sont retrouvées en abondance sur les feuilles des plantes (Collier *et al.*, 2005).

D'autres espèces de *Bacillus* sont aussi retrouvées comme des polluants alimentaires. *Bacillus cereus*, par exemple, peut se multiplier dans les aliments et y produire une entérotoxine qui provoque des diarrhées par un mécanisme similaire à celui de l'entérotoxine d'*E. coli* (Jackson *et al.*, 1995). Certaines souches des *Bacillaceae* sont non pathogènes pour l'homme, d'autres provoquent des infections et peuvent parfois causer la mort (Parry *et al.*, 1983). *Bacillus anthracis* est, sans doute, le pathogène le plus virulent du genre *Bacillus* (Turnbull *et al.*, 1992). D'autres souches de ce genre, comme *B.*

thuringiensis et *B. sphaericus*, sont pathogènes pour certaines catégories d'insectes ou de parasites : elles sont utilisées par le secteur agronomique dans la lutte biologique (Wipat et Harwood, 1999 ; Armengol *et al.*, 2007).

Dans les conditions environnementales défavorables, les espèces de *Bacillus* ont la capacité de former des endospores qui leur permet de survivre pendant de longues périodes dans le sol à des stress et des carences en nutriments (Yara *et al.*, 1997 ; Wipat et Harwood, 1999 ; Marchadier, 2009). Cette forme de spore est résistante à des hautes températures et des désinfectants chimiques actuels (Collins et Jacobsen, 2003).

Les genres sporulants les plus communs sont *Bacillus* et *Clostridium* (Barnabé, 2000). La structure de la spore est complexe et mérite une attention particulière pour bien comprendre les phénomènes de la sporulation et de la germination des spores (Barnabé, 2000). Produites une par cellule, les endospores varient dans leur forme et leur position à l'intérieur de la cellule. Les spores sont brillantes sous microscope à fond clair et il est possible de les différencier des cellules végétatives au microscope à cause de leur membrane épaisse et hautement réfractrice (Pelzcar, 1994 ; cité par Barnabé, 2000).

En réponse à une carence, une endospore se forme à l'intérieur d'une autre cellule à la suite d'une division et d'un processus de différenciation (Figure 11). Elle vit alors en état de dormance jusqu'à sa germination et son développement en cellule végétative active (Hilbert et Piggot, 2004).

Une division cellulaire asymétrique permet la formation d'un septum séparant la cellule mère et la pré-spore (étape II) (Figure 11). Cette dernière contient alors 30% du matériel génétique de la cellule végétative initiale. C'est entre l'étape II et l'étape III que la formation de la spore devient irréversible (Parker *et al.*, 1996). La formation de membranes sporales interne et externe permet ensuite l'invagination de la pré-spore dans la cellule mère (étape III). Ces membranes sont de fonctionnalités et de polarités opposées. La membrane interne est une barrière de perméabilité, tandis que la membrane externe permet le transport de métabolites dans la pré-spore. Entre ces deux membranes, se développe ensuite le cortex (étapes IV et V), qui assure la déshydratation de la structure centrale de la spore en appliquant une pression osmotique et mécanique sur la membrane interne et le protoplaste. Une fois ces structures matures, la cellule mère est lysée. La spore est alors appelée spore libre (étapes VI et VII) (Hilbert et Piggot, 2004).

La transformation des endospores dormantes en cellules végétatives se fait en trois événements séquentiels, soit l'activation, la germination et la surcroissance (Gould, 1969 ; Sneath, 1984 cités par Barnabé, 2000).

III.4- Potentiels bénéfiques des rhizobactéries du genre *Bacillus* en agriculture

Les rhizobactéries du genre *Bacillus* sont parmi les genres les plus étudiés des PGPR qui exercent des effets bénéfiques et avantageux sur le développement de la plante. Leur application est souvent associée à une augmentation du taux de la croissance de la plante. Ces bactéries présentent une aptitude à coloniser les racines de façon intense (Idris, 2007).

L'amélioration de la croissance et la productivité des plantes par les applications de *Bacillus* est méditée par trois mécanismes écologiques différents : la promotion de la croissance et de la nutrition de la plante hôte, l'antagonisme contre les agents pathogènes des plantes et des insectes nuisibles, et la stimulation des mécanismes de défense de la plante (Govindasamy *et al* , 2010).

Dans la rhizosphère, des espèces du genre *Bacillus* sont impliquées dans la fixation d'azote atmosphérique (Xie *et al.*, 1998), la solubilisation du phosphore et l'absorption des micronutriments du sol (Rodriguez et Fraga 1999 ; Yazdani *et al.*, 2009) ainsi que la production de phytohormones et des métabolites antimicrobiennes (Berg *et al.*, 2001 ; Govindasamy *et al* , 2010).

Xie *et al.* (1998) ont rapporté que les espèces suivantes étaient des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique basées sur l'activité de la nitrogénase (une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (Weyens *et al.*, 2010)): *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis* et *Bacillus firmus*.

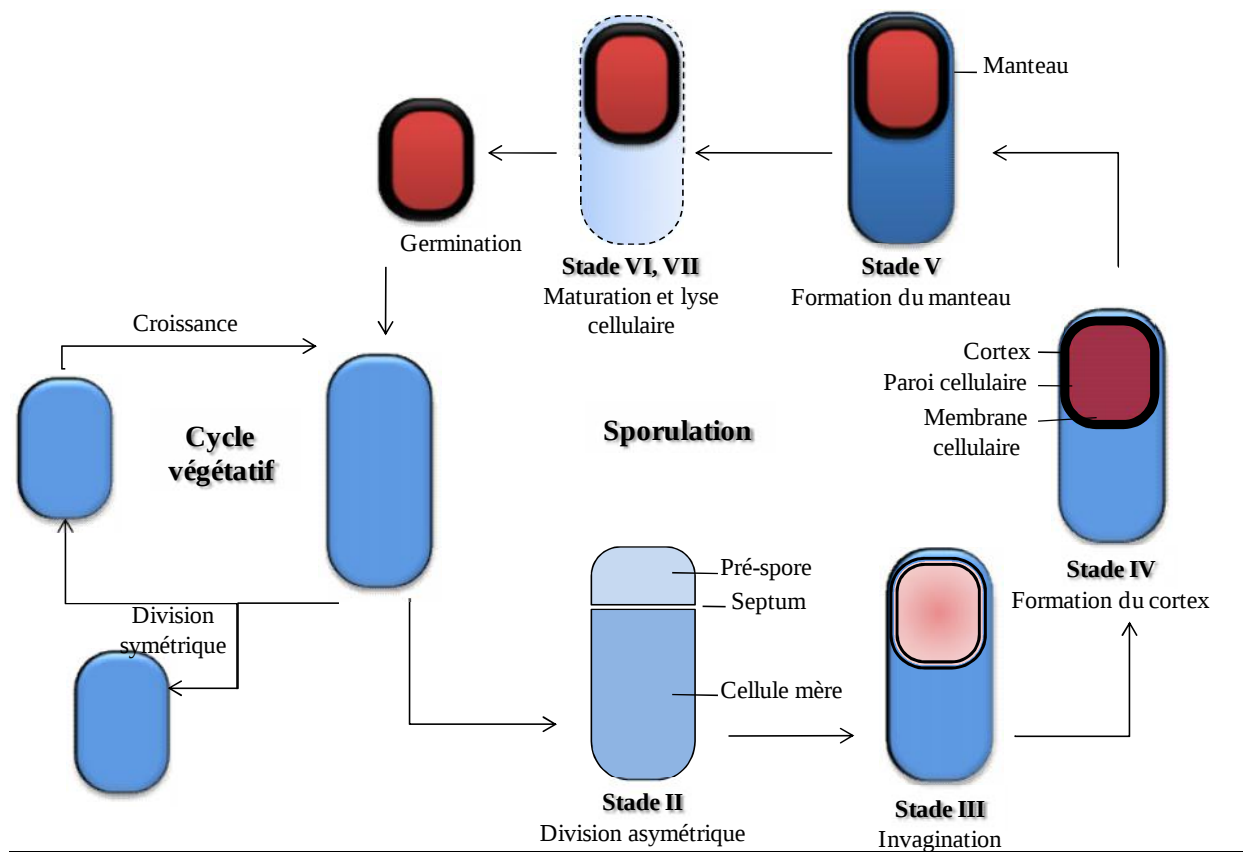


Fig. 11 : cycle de sporulation de *Bacillus subtilis* (Errington, 2003)

Le phosphore joue un rôle essentiel dans le transfert de l'énergie nécessaire à la croissance et à l'amélioration de la productivité des plantes. C'est un élément indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes. Les espèces les plus importantes qui pourraient être visées comme des solubilisatrices de phosphates sont : *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. circulans* (Yazdani *et al.*, 2009). Généralement les chercheurs associent la solubilisation des phosphates à une baisse du pH du milieu (Rodríguez et Fraga, 1999). La production des acides organiques est considérée comme le principal mécanisme pour la solubilisation du phosphate par les bactéries (Rodríguez et Fraga, 1999).

Des études ont démontré que des *Bacillus* de la rhizosphère peuvent accroître la disponibilité et la mobilité de micronutriments dont le fer (Fe) par la production de sidérophores (Govindasamy *et al.*, 2010 ; Chérif, 2014). Ces derniers sont des composés de faibles poids moléculaires. Le fer est un élément essentiel pour la croissance et la survie de la plupart des champignons phytopathogènes (Loqman, 2009). La compétition pour le fer et la production de sidérophores par *Bacillus* permettent de chélater le fer du milieu et ainsi d'inhiber la croissance des agents phytopathogènes (Chet et Inbar, 1994 ; Thomashow, 1996 ; Bouitez *et al.*, 2004 cités par Loqman, 2009).

Au niveau de la rhizosphère, plusieurs espèces microbiennes, y compris *Bacillus*, ont la capacité de produire des phytohormones qui jouent un rôle important dans les interactions hôte-parasite et en particulier la régulation de la croissance des plantes (Hamill, 1993). Il existe cinq catégories de régulateurs de la croissance végétale AIA (Acide Indole Acétique), produites particulièrement par les rhizobactéries : les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Patten et Glick 1996 ; Arshad et Frankenberger, 1998 ; Zahir *et al.*, 2004). L'acide indole-3-acétique est la phytohormone la plus répandue, il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen *et al.*, 2007). L'éthylène est une phytohormone capable de lever la dormance des graines. Elle favorise également la maturation des fruits et déclenche l'abscission des feuilles (Bleecker et Kende, 2000). La production de cette hormone et ses effets sur la croissance des plantes par *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus mycoides*, ont été rapportés par Fukuda *et al.* (1989).

L'effet stimulant des microorganismes présents dans la rhizosphère peut également être lié à leur capacité de synthétiser l'ACC désaminase. Cette enzyme dégrade

l'acide-1-Aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) en ammonium et en α -ketobutyrate par hydrolyse, ce qui réduit la quantité d'ACC dans la rhizosphère. Afin de maintenir un équilibre, la plante exsude une plus grande quantité d'ACC au niveau des racines, réduisant ainsi la quantité de ce précurseur pouvant être transformée en éthylène (Penrose et Glick, 2001). Cette enzyme est exprimée chez plusieurs rhizobactéries dont *Bacillus pumilus* (Glick *et al.*, 2007).

Le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR contre les microorganismes phytopathogènes est probablement l'antibiose. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Certaines souches de *Bacillus* agissent par antibiose contre les champignons phytopathogènes. Elles ont la capacité de dégrader les parois cellulaires fongiques par la production d'enzymes chitinolytiques et hydrolytiques tels β -1,3-glucanase, exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whippes, 2001 ; Huang *et al.*, 2005).

Le genre *Bacillus* produit une vaste gamme des molécules biologiquement actives (environ 167 composés) qui sont potentiellement inhibitrices de la croissance des agents phytopathogènes (Bottone et Peluso, 2003). Parmi les composés antifongiques, les lipopeptides cycliques comme : Iturine, Fengycine, Bacillopeptines et Surfactine (Monteiro *et al.*, 2005 ; Ongena et Jacques 2007). Ces lipopeptides peuvent aussi influencer les aptitudes écologiques de la souche productrice en termes de la colonisation des racines (et ainsi la persistance dans la rhizosphère) et qu'ils ont un rôle clé dans l'interaction bénéfique des espèces de *Bacillus* avec les plantes en stimulant leurs systèmes de défense (Ongena *et al.*, 2009).

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un agent pathogène (Van Loon, 2007). Ce mode d'action des PGPR antagonistes est expliqué en induisant des mécanismes de défense chez les plantes par la résistance systémique induite (ISR) (Jourdan *et al.*, 2008). Lors de ce phénomène, des rhizobactéries non pathogènes peuvent conférer à la plante un certain degré de protection à des attaques ultérieures par un phytopathogène via la stimulation de mécanismes de défense systémique. Cette « immunité » s'initie suite à la perception par la plante de molécules dites élicitrices produites par le microorganisme bénéfique (Jourdan *et al.*, 2008). Ce phénomène d'induction de résistance systémique par les rhizobactéries est

considéré comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies des cultures (Ramos Solano *et al.*, 2008). La résistance systémique peut être induite par des souches spécifiques de *Bacillus* : *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus* et *B. sphaericus* où des réductions significatives de l'incidence ou de la gravité de diverses maladies ont été obtenues sur des hôtes diverses (Kloepper *et al.*, 2004, Jourdan *et al.*, 2008).

De nombreux composés volatiles, synthétisés par des espèces de *Bacillus* spp., seraient impliqués dans l'induction de l'ISR chez différentes plantes (Ping et Boland, 2004). L'importance de l'ISR serait liée à la nature de ces composés. Certains composés volatiles (le butane-2,3-diol et l'acétoïne) produits par *Bacillus subtilis* GB03 et par *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a sont capables d'induire un état d'ISR chez *Arabidopsis thaliana* contre *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ryu *et al.*, 2004).

D'autres composés volatiles, comme l'acide cyanhydrique HCN, libérés par des PGPR, constituent un moyen efficace dans la lutte biologique contre les microorganismes phytopathogènes. La production de HCN est une activité très commune chez *Pseudomonas* et *Bacillus* dans le sol rhizosphériques (Ahmad *et al.*, 2008).

III.5- Produits à base de *Bacillus* en agriculture

Certain nombre de souches de *Bacillus* sont développées dans le commerce en tant que des promoteurs de la croissance des végétaux (PGPR) et des agents de lutte biologique (Tableau 5). *Bacillus thuringiensis*, utilisé spécifiquement pour le contrôle des insectes parasites, représente plus de 70 % des ventes totales (Ongena et Jacques, 2007; Sanchis et Bourguet, 2008). Quant au reste, des produits à base de *Bacillus*, comme *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus pumilus*, représente environ la moitié des agents bactériens de lutte biologique disponible dans le commerce (Ongena et Jacques 2007).

Bien que le développement des produits biologiques à base des microorganismes bénéfiques semble être une approche très récente et «moderne» ; durant les années 1897, l'entreprise Bayer avait mis sur le marché allemande un produit, sous le nom de la marque «Alinit», fabriqué à base de bactéries stimulantes de la croissance des céréales. Le bio-engrais a été fabriqué à l'aide de la souche *Bacillus subtilis*.

À grande échelle, l'inoculation des rhizobactéries sur les champs a été réalisée par l'Union Soviétique en 1958 sur 10 millions d'hectares. Les bactéries utilisées appartenaient

principalement aux espèces *Azotobacter chroococcum* et *Bacillus megaterium* (Cassidy *et al.*, 1996).

Dans les années 1990, plusieurs produits à base de PGPR sont commercialisés aux Etats-Unis. Des tentatives pour commercialiser des produits contenant *Pseudomonas fluorescents* ont échoué en raison du manque de la viabilité à long terme (Kloepper *et al.*, 2004). La Sélection et des tests intensifs sur le terrain ont conduit au développement commercial des souches de diverses *Bacillus* comme agents de lutte biologique (McSpadden Gardener et Fravel, 2002). Aux États-Unis, la rhizobactérie *B. subtilis* a commencé à être employée sur 2 millions d'hectares de cultures. Les données accumulées (1974-1994) de l'inoculation sur le terrain dans le monde suggèrent que les techniques d'inoculation ont connu une augmentation significative du rendement des cultures de l'ordre de 5-30% (Okon et Labandera-Gonzalez, 1994).

Tableau 5: Exemples de produits commercialisés et utilisés en agriculture à base de *Bacillus* (Govindasamy *et al.*, 2010 ; Maheshwari, 2011)

Nom commercial	Souches de <i>Bacillus</i>	Activité/fonction	Compagnie
-Wide variety of products	<i>Bacillus polymyxa</i> et autres espèces	- Fixation atmosphérique d'azote	Non disponible
- Phosphobacter	<i>Bacillus megaterium</i> et <i>B. coagulans</i>	-Solubilisation minérale du phosphate	Non disponible
- SERENADE®	<i>B. subtilis</i> QST 713	- Les champignons et les bactéries des fruits et des légumes	AgraQuest Inc., Davis, California, CA
- Ecoguard™	<i>B. licheniformis</i>	-Champignons du gazon	Lebanon Seaboard Corporation, Lebanon, USA
- Kodiak™	<i>B. subtilis</i> GB03	-Traitement des semences / Champignons du coton et du soja	Bayer Crop Science, Caroline du nord, NC (former Gustafson, LLC)
- Yield Shield®	<i>B. pumilis</i> GB34 (=INR7)	- Biofongicide, ISR /Champignons du soja	
- BioYield™	<i>B. amyloliquefasciens</i> GB99 + <i>B. subtilis</i> GB122	- ISR (GB99) + PGR (GB122) / Champignons des Plantes à repiquer	
- Subtilex®	<i>B. subtilis</i> MBI600	- Champignons du coton et du soja	Becker Underwood Saskatoon, Saskatchewan, Canada
- VAULT®	<i>B. subtilis</i> MBI600 + souches <i>rhizobium</i>	-Amélioration de la croissance des graines de soja et du pois	
- HiStick	<i>B. subtilis</i> MBI600 et <i>Rhizobium</i>	- Champignons du soja	
- SONATA®	<i>B. pumilus</i> QST2808	- Biofongicide, le contrôle de l'oïdium	AgraQuest Inc., Davis, Californie, CA
- RhizoVital® 42 liquid	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	-Biofertiliseur, activité PGP, bioprotection contre diverses maladies telluriques	ABiTEP GmbH, Berlin, Allemagne

Nom commercial	Souches de <i>Bacillus</i>	Activité/fonction	Compagnie
RhizoPlus®	<i>Bacillus subtilis</i> FZB24a	PGPR et agent de lutte biologique. Il peut être utilisé pour les pommes de terre, le maïs, les légumes, les fruits et également le gazon.	ABiTEP GmbH, Berlin, Allemagne
Taegro®	<i>Bacillus subtilis</i> FZB24a	Biofongicide, pour une utilisation en Amérique du Nord	Earth Biosciences Inc., USA/ maintenant acquis par Novozymes Biologicals, Inc., Salem, Virginie, VA
POMEX	<i>Bacillus subtilis</i> CMB26	Fongicide microbien, le contrôle + effet inhibiteur de la germination sur l'oïdium, <i>Cladosporium fulvum</i> et <i>Botrytis cinerea</i>	NIN Co. Ltd., Corée du Sud

PGP: plant growth promoting ; **PGPR** : plant growth promoting rhizobacteria ; **ISR** : induction of systemic resistance

Partie II : *Matériel et méthodes*

Partie II : Matériel et méthodes**1- Milieux de culture**

Suivant les besoins expérimentaux, divers types de milieux de culture sont mis en œuvre. La composition des milieux de culture utilisés est indiquée dans l'annexe 1.

- Milieux d'isolement et de purification

Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) a été utilisé pour l'isolement et la purification des isolats fongiques pour l'inoculation artificielle des plantes de pois chiche. Le milieu PDB (Potato Dextrose Broth) liquide a été utilisé pour la production d'inoculum de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC) afin de le conserver sur papier filtre.

- Milieu de caractérisation morphologique

Le milieu PDA a été utilisé pour la détermination des morphotypes, la pigmentation et la vitesse de la croissance de l'ensemble des isolats fongiques.

- Milieux d'isolement, de purification et de conservation des rhizobactéries

Le milieu de culture GN (Gélose Nutritif) est utilisé pour l'isolement de rhizobactéries. Ces derniers sont conservés sur le milieu LB.

- Milieu de sélection des rhizobactéries

L'activité antifongique des isolats bactériens a été testée sur milieu PDA.

- Milieu de caractérisation des rhizobactéries antagonistes

Le milieu Pikovasky (PVK) solide et liquide additionné du bleu de bromophénol a été utilisé pour le test de la solubilisation du phosphate (Pikovskaya, 1948).

Le milieu Trypticase de soja additionné de glycine a été utilisé pour vérifier la capacité des isolats pré-sélectionnés à produire l'acide cyanhydrique (HCN) (Bakker et Schippers, 1987 ; Wei *et al.*, 1991).

Le milieu solide ou liquide de Luria-Bertani additionné de tryptophane (5g/l) (LBT) a été utilisé, pour caractériser les isolats producteurs de AIA ou des substances apparentées (Bric *et al.*, 1991).

Le milieu M9 supplémentée de 10g cellulose, a été utilisé pour tester le pouvoir hydrolytique des isolats par production de cellulases (Miller, 1974).

L'activité chitinolytique a été mise en évidence sur le milieu M9 supplémenté de la chitine Reniwick *et al.* (1991).

- Milieu « Api 50 CHB/E Medium »

Le Milieu «Api 50 CHB/E Medium » a été utilisé pour la préparation de l'inoculum bactérien pour ensemençer la galerie Api 50 CHB.

2- Matériel végétal

Le cultivar du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) ILC 482 est choisi sur la base de sa sensibilité vis-à-vis le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* afin d'effectuer des inoculations artificielles. Les graines de ce cultivar ont été fournies par l'ITGC (Institut technique des grandes cultures) de Saïda.

3- Matériel fongique**3.1- obtention de l'agent pathogène**

Au cours de la campagne agricole 2008, Onze (11) parcelles ont été prospectées dans quatre wilayas du nord-ouest Algérien favorables à la culture du pois chiche (Mascara, Sidi Bel-Abbès, Mostaganem et Relizane) (Tableau 6).

Ces prospections ont été effectuées au stade de maturité physiologique du pois chiche, en période de formation des graines pour la culture de printemps. Elles avaient pour objectif de:

- localiser les foyers de flétrissement de pois chiche ;
- évaluer l'importance de cette maladie et identifier les espèces responsables ;
- et confirmer l'identité de l'agent pathogène majeur responsable de la fusariose vasculaire de pois chiche sur la base des symptômes de la maladie et des caractéristiques morphologiques des isolats.

Le diagnostic de la fusariose vasculaire est basé sur l'observation des symptômes visibles. Les plantes malades ayant des feuilles et des tiges jaunâtres ainsi qu'une taille réduite sont considérées fusariées et sont prélevées. Ce diagnostic est complété par des analyses de laboratoires.

3.1.1- Isolement et purification de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*

Les parties inférieures des tiges ont été désinfectées à l'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 3 min, soigneusement rincées à l'eau distillée stérile et séchées entre 2 feuilles de papier filtre stérile puis découpées en 7 fragments de 1cm et placées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Annexe 1). Les fragments déposés dans les boîtes de Pétri

sont numérotés de 0 à 7 en fonction de la position de chaque segment sur le végétal. L'incubation a été réalisée à l'obscurité et à une température de 25° C pendant 48h à 72h. Cette dernière est considérée comme optimale pour la croissance de ce champignon (Gupta *et al.*, 1986).

Les graines prélevées à partir des plantes de pois chiche malades sont désinfectées puis incubées sur le milieu PDA dans les mêmes conditions que précédemment.

Tableau 6 : Les parcelles prospectées du pois chiche de quatre régions choisies du nord-ouest Algérien

Régions	Sites de prélèvement	Parcelles (P) : Latitude / Longitude	Date des Prospections
Mascara (5 parcelles prospectées)	- Maoussa	P1 : 35°22'42.20"N 0°12'50.53"E	Juin 2008
	- Tighennif	P2 : 35°24'45.37"N 0°18'45.54"E	
	- Ain Farés	P3 : 35°28'27.00"N 0°14'27.13"E	
	- El Bordj	P4 : 35°30'14.13"N 0°18'38.06"E	
	-Ferme expérimentale	P5 : 35°22'26.67"N 0°11'1.66"E	
Sidi Bel-Abbès (SBA)	- Tassala	P6 : 35°14'33.75"N 0°45'50.94"O	
	- Sidi Lahcene	P7 : 35° 9'22.66"N 0°41'54.83"O	
Mostaganem	- Sidi Lakhdar 1	P8 : 36°10'10.58"N 0°26'51.33"E	
	- Sidi Lakhdar 2	P9 : 36° 9'42.20"N 0°25'35.26"E	
Relizane (2 parcelles prospectées)	- Mendes 1	P10 : 35°39'19.38"N 0°51'18.08"E	
	- Mendes 2	P11 : 35°39'21.85"N 0°51'55.14"E	

3.1.2-- Purification et obtention des cultures monospores

Les isolats de FOC ont été purifiés sous forme de monospores afin d'éviter une dérive génétique des populations au cours des essais successifs où nous employons des isolements monoconidiens, assimilables à des clones. Pour deux isolats issus de chaque lot d'échantillons, des cultures monospores sont obtenues de la manière suivante (Belabid, 2003) :

Des cultures de FOC sur milieu PDA de 6 à 10 jours sont recouvertes par 5 ml d'eau stérile. La surface de la colonie est grattée, et la suspension est filtrée sur un papier filtre stérile. Cette suspension de conidies est diluée dans de l'eau distillée stérile, de façon à obtenir une faible concentration avoisinant 20 microconidies/ml.

Une goutte de la suspension contenant généralement 2 à 5 microconidies/ml est déposée puis étalée en stries à la surface du milieu PDA (Annexe 1) en boîte Pétri.

Après 24 heures d'incubation, à l'obscurité à 20°C, les germinations issues d'une microconidie unique sont d'abord repérées au fort grossissement de la loupe binoculaire puis prélevées stérilement et déposées séparément sur le milieu PDA en boîte de Pétri. Les cultures monospores ont été repiquées dans des tubes à essais, sur le milieu PDA (Rapilly, 1968).

3.2- Identification de l'agent pathogène

L'identification repose, dans un premier temps, sur une étude macroscopique des caractères culturels sur milieu solide (aspect avers et revers des colonies) et dans une seconde étape, une étude microscopique des caractères morphologiques des organes de reproduction asexuée et du mycélium. L'examen direct au microscope optique d'un petit fragment de culture de champignon âgé de 5 à 7 jours entre lame et lamelle, dans une goutte de bleu de coton permet d'observer la forme, la taille des macroconidies, la présence ou l'absence de microconidies et des chlamydospores.

L'aspect microscopique des arrangements spatiaux des conidies sur les conidiophores a été observé en réalisant une microculture du champignon sur une mince couche de milieu PDA préparé aseptiquement sur une lame microscopique et recouverte d'une lamelle.

Le champignon est ensemencé sur les bords des 4 côtés de la lamelle. La lame portant la culture est ensuite déposée dans une boîte de Pétri contenant un disque de papier filtre imbibé d'eau distillée stérile. La culture est incubée à 25°C pendant 2 à 3 jours.

L'identification des espèces fongiques isolées est effectuée en utilisant les clés de classification du genre *Fusarium* (Messiaen et Cassini, 1968 ; Booth, 1971 ; Nelson *et al.*, 1983 ; Leslie et Summerell, 2006).

3.3- Détermination de la forme spéciale *ciceris* et test de la virulence

Dans le but de confirmer la forme spéciale *ciceris*, la pathogénicité des isolats de *F. oxysporum*, isolés des segments de la tige et de semences du pois chiche a été testée sur une variété de pois chiche, sensible au FOC (ILC 482).

La virulence des isolats de FOC a été évaluée et elle avait pour but de sélectionner deux (02) isolats parmi le lot des plus virulents ; le premier est isolé à partir des segments

de la tige alors que l'autre est isolé des semences de pois chiche. Ce dernier a été choisi pour cette étude en raison du caractère de transmission de l'agent pathogène.

3.3.1- Obtention des plantules du pois chiche

Pour préparer le matériel végétal, des pots de dimensions (20 x 35 cm) sont lavés puis désinfectés à l'hypochlorite de sodium. Ils sont ensuite remplis d'un mélange de terre végétale-tourbe (2v :1v) stérilisé à l'autoclave pendant 1 heure à 120°C ; l'autoclavage a été répété 3 fois à 24 d'heures d'intervalle. Des graines, du cultivar ILC 482, ont été désinfectées par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 3 minutes puis rincées 3 fois dans de l'eau distillée stérile et séchées sur du papier filtre stérile (Belabid *et al.*, 2004). Elles ont ensuite été semées dans des pots avec un espacement de 5 cm. Les pots ainsi préparés sont ensuite placés dans le laboratoire et arrosés une fois par semaine.

Les plantules du pois chiche sont élevées dans les conditions suivantes :

- La photopériode est de 12 heures sous un flux énergétique fourni par des tubes fluorescents émettant une lumière blanche, disposés à une hauteur d'environ 50 cm au dessus des plantules;
- La température : 25°C±1 le jour.
- L'humidité relative : 70 %.

Au bout de 8 jours, des plantules, arrivées au stade des deux premières feuilles étalées ont été sélectionnées pour l'inoculation.

3.3.2- Technique d'inoculation

a- Préparation de l'inoculum

Le FOC est ensemencé sur un milieu PDA (Annexe 1) et incubé à 25°C pendant 15 jours. Les spores ont été récoltées en grattant la surface de la culture préalablement inondée d'eau distillée stérile et la suspension a été filtrée à travers une couche de papier filtre stérile (El Aoufir, 2001). La concentration de la suspension en conidies du FOC a été ajustée à l'aide de la cellule de Malassez à 10⁶ microconidies/ml (El Aoufir, 2001).

b- Inoculation par trempage des racines sectionnées

L'inoculation est effectuée à 8 jours, après la levée des plantules, par trempage des racines des jeunes plantules dans la suspension de microconidies.

Les plantules du pois chiche sont retirées délicatement du pot, après lavage de leurs racines, et sont trempées pendant 30 min dans un récipient contenant l'inoculum de FOC. Les plantules inoculées sont repiquées à raison de trois par pot. Les plantules témoins sont trempées dans l'eau distillée stérile (El Aoufir, 2001).

3.3.3- Evaluation de l'action de FOC et estimation des symptômes

La fusariose vasculaire se traduit par des troubles physiologiques et métaboliques se manifestant morphologiquement par des jaunissements et des flétrissements des feuilles et des plantes.

Les plantes inoculées ont été examinées au bout de 40 jours et le nombre de feuilles montrant des symptômes de jaunissement a été noté pour chaque plante.

L'évaluation de la maladie a été effectuée en fonction de la gravité des symptômes de 2 à 3 jours d'intervalle, en utilisant une échelle de notation proposée par Landa *et al.* (1997) allant de 0 à 4, ce classement est basé sur le pourcentage de feuillage avec jaunissement ou une nécrose.

Cette échelle comprend :

- 0 = 0% (plantule saine)
- 1 = 1-33% (léger jaunissement)
- 2 = 34-66% (jaunissement important des feuilles)
- 3 = 67-100% (jaunissement avec nécrose)
- 4 = mort de la plantule

3.3.4- Evaluation de la virulence des isolats de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*

Les plantes inoculées ont été examinées et le nombre de feuilles montrant des symptômes de jaunissement a été noté pour chaque plante. La gravité de la maladie exprimée en incidence de la maladie (IM) a été évaluée par la formule (Villajuan-Abgona *et al.* 1996 ; El Aoufir, 2004):

$$\text{IM/plante} = \frac{\text{Nombre de feuilles atteintes}}{\text{Nombre total de feuilles}} \times 100$$

Les IM et par conséquent, les degrés de virulence des isolats, ont été ordonnés en classes: 0-20% (isolats très peu virulents), 21-40% (isolats peu virulents), 41-60% (isolats moyennement virulents), 61-80% (isolats virulents), 81-100% (isolats très virulents).

Pour vérifier l'implication de FOC dans l'infection des plantules inoculées, on réisole le champignon à partir du collet et de la tige (vérification du postulat du Koch). La technique d'isolement est identique à celle décrite précédemment (paragraphe 3.1.1). Les cultures fongiques obtenues sur PDA sont comparées à leurs cultures mères.

3.4- Conservation des isolats de FOC

Deux méthodes de conservation ont été utilisées :

3.4.1- Conservation sur gélose inclinée

La méthode consiste à repiquer le champignon purifié en tubes sur le milieu PDA incliné, les cultures sont maintenues pendant 3 jours à la température de 22°C puis stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (Belabid, 2003).

3.4.2- Conservation sur papier filtre

La méthode consiste à ensemercer le champignon dans les boîtes de Pétri contenant un disque de papier filtre imbibé d'une solution nutritive pauvre (Annexe 1) et l'incuber à 22°C pendant 10 jours. Après le développement du champignon, les boîtes sont disposées pendant une semaine, dans une étuve réglée 30°C pour le séchage du papier filtre, celui-ci est ensuite aseptiquement découpé en petits morceaux que l'on introduit dans des petits tubes stériles. Les tubes hermétiquement fermés sont conservés à la température ambiante. Cette méthode de conservation du champignon sous formes de spores assure à l'espèce une longévité de plusieurs années (Belabid, 2003).

3.5- Caractérisation morphologique et biométrique des isolats de FOC

La collection de FOC utilisée pour étudier les caractéristiques morphologiques et biométriques du FOC, comporte 10 isolats provenant du nord-ouest Algérien (Tableau 7) et de différentes parties d'isollements : tiges et graines des plantes de pois chiche présentant les symptômes caractéristiques du flétrissement vasculaire, identiques à ceux décrits par de nombreux auteurs (Nene et Reddy, 1987 ; El Aoufir, 2001; Ravikumar *et al.*, 2007 ; Ansar Ahmad, 2010).

L'étude des ces caractéristiques a été réalisée sur un milieu PDA. Ce milieu est communément utilisé pour caractériser les *Fusarium* (Tousson et Nelson, 1976).

Tableau 7 : Les isolats de FOC utilisés dans la caractérisation morphologique et biométrique

N°	Isolats	Région	Site de prélèvement	Partie d'isolement
1	Mas1 (FOC1)	Mascara	Maoussa	Tiges
2	Mas2 (FOC2)		Ferme expérimentale	Graines
3	Mas3		El Bordj	Tiges
4	Mas4		Tighennif	Tiges
5	Sba1	Sidi Bel-Abbès	Tassala	Tiges
6	Sba2		Sidi Lahcene	
7	Mos1	Mostaganem	Sidi Lakhdar	Tiges
8	Mos2			
9	Rel1	Relizane	Mendes	Tiges
10	Rel2			

3.5.1- Détermination des morphotypes et pigmentation

Un disque de 6 mm de diamètre, d'une culture monospore âgée de 6 jours, a été ensemencé sur le milieu PDA en boîte de Pétri. Après incubation des boîtes à 25°C pendant 7 jours, les morphotypes et la pigmentation de chaque isolat ont été décrits.

3.5.2- Etude biométrique des conidies et des chlamdospores

L'examen direct au microscope photonique d'un petit fragment entre lame et lamelle, dans une goutte de bleu de coton, permet d'effectuer les mensurations (longueur et largeur) des macroconidies, des microconidies et de chlamydospores produites par les isolats de FOC. Les mensurations ont été évaluées à l'aide d'un micromètre à partir d'une culture âgée de 6 jours.

3.6- Analyses statistiques

Chaque expérience a fait l'objet de trois répétitions. Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide d'un programme informatique Statistica 8. Les résultats expérimentaux sont comparés en utilisant le test de Newman-Keuls à 5%.

4- Matériel bactérien (Agents antagonistes)

4.1- Prélèvement et préparation des échantillons des sols rhizosphériques

Les prélèvements des échantillons de sols ont été effectués dans neuf régions du nord-ouest et nord-est Algérien : Mascara, Sidi Bel-Abbès, Tlemcen, Tiaret, Mostaganem, Relizane, Chlef, Guelma et Constantine, pendant les mois d'Avril, Mai, Juin au cours des années 2008, 2009 et 2010. Les sites de prélèvements des échantillons sont indiqués dans la figure 12.

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une spatule propre à une profondeur de 15-25 cm pour arracher entièrement la plante saine du pois chiche avec le sol adhérent aux racines (la rhizosphère). Les échantillons des sols rhizosphériques prélevés ont été placés dans des sacs, bien fermés et conservés au réfrigérateur à 4°C.

La diversité des zones de prélèvement des échantillons des sols rhizosphériques avait pour objectif de:

- Obtenir une collection d'isolats de rhizobactéries.
- Évaluer leurs pouvoirs antagonistes pour sélectionner les espèces les plus performantes.
- Identifier les espèces les plus performantes selon des critères morphologiques (macroscopiques et microscopiques) physiologiques et biochimiques.
- Évaluer leur effet sur l'incidence de la maladie (Flétrissement vasculaire de pois chiche) par un essai de lutte biologique.

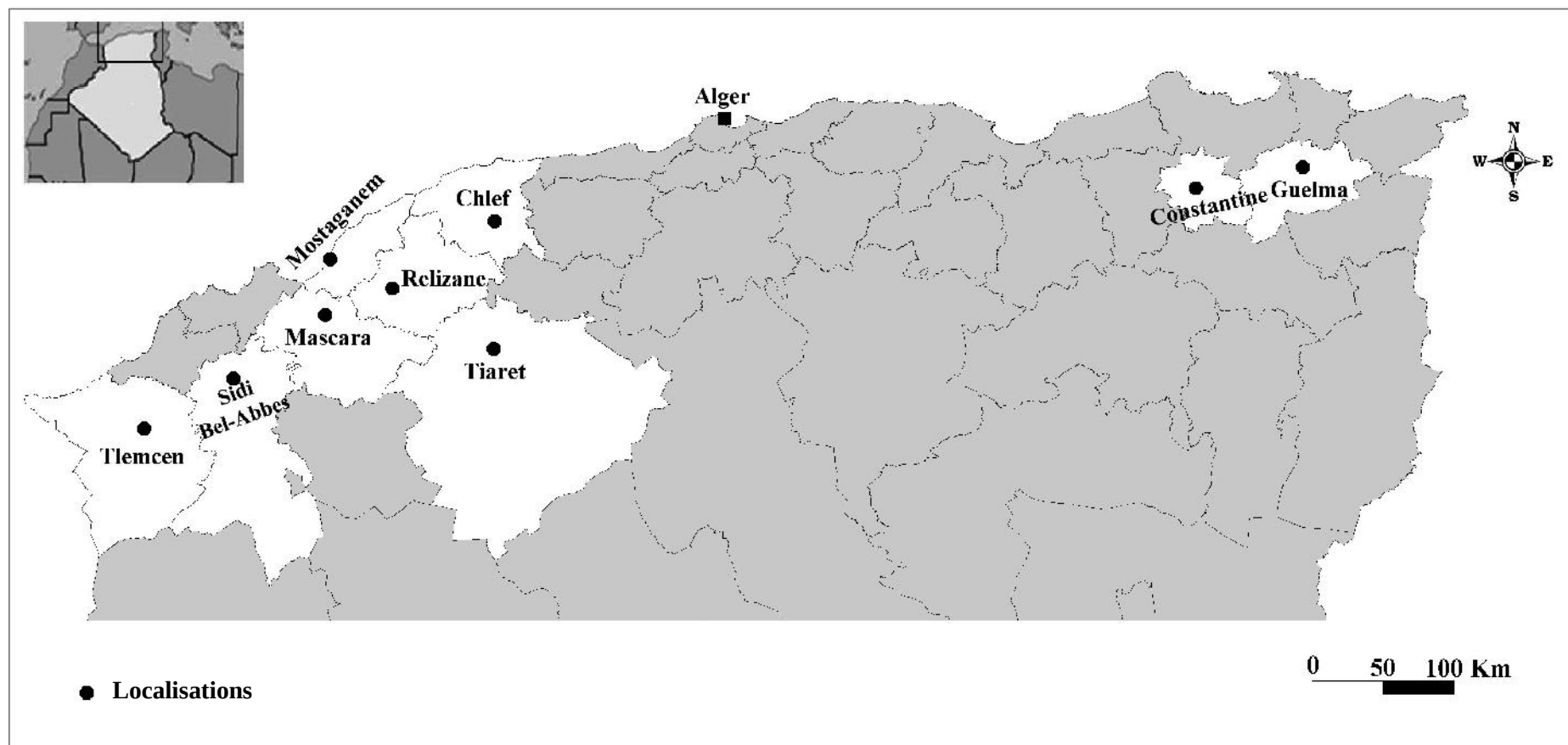


Fig. 12 : Les sites de prélèvements des échantillons des sols rhizosphériques

4.2- Isolement des rhizobactéries antagonistes

Les bactéries antagonistes ont été isolées à partir des sols rhizosphériques des plantes du pois chiche sain pour être utilisées comme agents naturels de lutte biologique.

L'isolement des antagonistes rhizosphériques est performant en utilisant la technique de suspension-dilution décrite par Fang (1998).

Le principe consiste à mettre le sol en suspension dans de l'eau distillée stérile, puis à incorporer les différentes dilutions de cette suspension dans le milieu d'isolement.

Les racines sont d'abord débarrassées de la terre facilement détachable, ensuite de chaque échantillon sont récupérés 1 g du sol adhérent aux racines.

La préparation des dilutions consiste tout d'abord à ajouter 1 g du sol rhizosphérique à 9 ml d'eau distillée stérile, puis à agiter pendant quelque minute, ce qui constitue la dilution 10^{-1} . Des prélèvements successifs de 1 ml dans cette suspension, puis dans les suivantes, ajoutés chaque fois à 9 ml d'eau distillée stérile, vont constituer les dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} . Rappelons que pour réaliser ces différents prélèvements, il est essentiel d'utiliser des pipettes stériles qui sont changées à chaque dilution.

Ainsi que, 0,1 ml de différentes dilutions aqueuses de 10^{-3} à 10^{-6} de la suspension seraient cultivées sur des boîtes contenant 15 ml de milieu fondu à environ 45°C auront ajoutés. Les boîtes seront agitées doucement, les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 24h pour l'isolement des rhizobactéries.

Le milieu de culture GN (Annexe 1) est utilisé pour l'isolement des rhizobactéries.

Après incubation à 28°C, nous avons procédé à isoler le maximum de colonies de rhizobactéries d'apparences différentes qui ont poussé sur le milieu de culture et chaque colonie est repiquée sur une boîte de Pétri puis incubée à 28°C. La purification des rhizobactéries ainsi isolées est obtenue par passages successifs sur le même milieu d'isolement.

Les boîtes contenant les cultures pures seront conservées à 4°C jusqu'à d'autres examens.

4.3- Conservation des rhizobactéries

Les rhizobactéries isolées sont conservées selon deux techniques (Boudmagh, 2007):

- Conservation en gélose inclinée sur milieu LB (Annexe 1) à 4°C pour une durée de deux mois environ.
- Au congélateur après une culture liquide en milieu LB (Annexe 1) et en présence du glycérol (15 %, v/v) utilisé comme cryo-protecteur pour une durée plus longue.

5- Sélection de rhizobactéries antagonistes (Activité antagoniste « *in vitro* » des rhizobactéries isolées à partir de la rhizosphère du pois chiche vis-à-vis du FOC)

La collection obtenue et qui constituée des rhizobactéries isolées à partir de la rhizosphère du pois chiche a été testée pour évaluer leur pouvoir antagoniste par confrontation directe contre deux isolats de FOC agent du flétrissement vasculaire du pois chiche : FOC1 et FOC2. Seulement les isolats qui ont montré une bonne action inhibitrice envers ces deux derniers pathogènes $\geq 20\%$ sont retenus pour les utiliser dans les tests de la lutte biologique.

L'activité antagoniste *in vitro* des isolats bactériens a été étudiée selon deux méthodes. Elle avait pour but de sélectionner les espèces les plus antagonistes sur la base des effets inhibiteurs sur la croissance mycélienne des pathogènes. Cinq rhizobactéries les plus performantes ont été testées *in vivo* contre FOC1.

5.1- Confrontation par contact direct sur milieu de culture

La méthode utilisée a été décrite par Landa *et al.* (1997) et Swain et Ray (2007) qui consiste à ensemencer quatre pastilles gélosées de la même bactérie isolée à une distance de 4 cm du centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Annexe 1) puis incubées à 28°C pendant 24h.

Par la suite et après un jour d'incubation de cette boîte de Pétri ensemencée par la bactérie, une pastille gélosée de 6 mm de diamètre du FOC a été ensemencée au centre de la boîte.

Le témoin est constitué par un repiquage des pathogènes au centre de la boîte sans les bactéries.

L'incubation des boîtes a été effectuée à 25°C pendant 6 jours.

La lecture des résultats consiste à mesurer la distance développée par le champignon en direction de l'antagoniste bactérien. Ainsi l'évaluation de l'inhibition exercée par la bactérie antagoniste est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOC selon (Suarez-Estrella *et al.* 2007). Après 2 à 6 jours d'incubation la région d'interface a été observée sous microscope optique.

$$(\%) \text{ inhibition} = \frac{(R \text{ témoin} - R \text{ test}) \times 100}{R \text{ témoin}}$$

R témoin : distance radiale max de la croissance du champignon.

R test : distance radiale sur une ligne en direction de l'antagoniste.

L'inhibition de la croissance mycélienne a été évaluée selon une échelle de 0 à 3: 0 (pas d'inhibition), 1 (1-25%), 2 (26-50%) et 3 (51-75%) (Korsten *et al.*, 1995).

5.2- Confrontation à distance sur milieu de culture

L'inhibition bactérienne grâce à la production des substances antifongiques volatiles a été mesurée selon la méthode modifiée et utilisée par Fiddaman et Rossall (1995).

Quatre disques de bactérie prélevée à partir d'une culture sur gélose nutritive ont été placés de façon équidistante le long du périmètre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA.

Après incubation à 28°C pendant 24 h, une seconde boîte de Pétri contenant le milieu PDA etensemencée avec un disque de 6 mm de FOC au centre des la boîte de Pétri est placée au dessus de celle qui contient la bactérie après l'enlèvement des couvercles aseptiquement où les deux fonds adhérents sont fermés par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles.

Pour le témoin, un fond de boîte contenant le milieu PDA seul est placé en dessous d'un fond de boîte contenant le pathogène.

Après six jours d'incubation à 25°C à l'obscurité, l'inhibition de la croissance mycélienne est estimée et évaluée comme la méthode décrite précédemment.

6. Caractérisation des rhizobactéries antagonistes (Caractéristiques promotrices de la croissance végétale et production de substance favorisant la croissance des plantes)

6.1- Solubilisation de phosphate

Ce test permet d'évaluer la capacité des rhizobactéries à solubiliser les phosphates sur milieu phosphate de Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948). Etant un milieu de base préconisé à l'isolement des microorganismes solubilisant les phosphates insolubles, il contient du phosphate tricalcique (PTC) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphate (Annexe 1). Ce test est réalisé par deux méthodes :

- **Test de solubilisation sur milieu solide**

La capacité des rhizobactéries antagonistes sélectionnées à dissoudre le PTC a été testée selon la méthode décrite par Konate (2007). Le test de solubilisation du phosphate a été effectué sur milieu Pikovskaya solide additionné de bleu de bromophénol (Pikovskaya, 1948). Les boîtes de Pétri sont inoculées avec 10 µl de suspensions bactériennes issues de pré-cultures fraîches âgées d'un jour. Les boîtes sont incubées à 28°C. La lecture des résultats est effectuée après 7 jours par la mesure du diamètre de solubilisation (halo + colonie) en comparaison avec le diamètre de la colonie bactérienne qui représente le témoin. L'indice de solubilisation est ensuite calculé par le rapport du diamètre total (halo+colonie) et le diamètre de la colonie (Edi-Premono *et al.*, 1996).

- **Test de solubilisation en milieu liquide**

Pour une estimation quantitative du phosphate solubilisé, 100 µl des cultures bactériennes sontensemencées dans 5ml de milieu PVK liquide additionné de bleu de bromophénol puis incubées à 30°C pendant 7 jours sous agitation modérée. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 20mn. La quantité du phosphore soluble est mesurée dans le surnageant par la méthode colorimétrique de Olsen (Olsen et Sommers, 1982). Dans une fiole de 50 ml contenant 1 ml du surnageant, sont ajoutés 10 ml de molybdate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2 \text{MoO}_4$ à 12 mM et 1 ml de chlorure d'étain (SnCl_2) 5 mM. Le volume est ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée. L'intensité de la couleur bleue mesurée à 620 nm est directement proportionnelle à la concentration de phosphates dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage standard est effectuée avec une solution de KH_2PO_4 (Olsen et Sommers, 1982).

6.2- Production d'acide cyanhydrique (HCN) (Cyanogenèse)

La capacité des isolats pré-sélectionnés à produire l'acide cyanhydrique a été vérifiée selon la méthode de Bakker et Schippers (1987) et Wei *et al.* (1991). Ainsi, chaque isolat a été inoculé, à l'aide d'une anse sous forme de stries, sur une boîte de Pétri contenant le milieu Trypticase de soja additionné de glycine (Annexe 1). Un papier filtre stérile de 9 cm de diamètre, est déposé dans le couvercle de chaque boîte de Pétri en position inversée. Ce papier est par la suite imprégné d'une solution de couleur jaune contenant l'acide picrique et le carbonate de sodium (Miller et Higgins, 1970 cité par Rangaraj *et al.*, 2002). Les boîtes de Pétri sont scellées avec du parafilm et gardées en position inverse dans un incubateur à 28°C pendant 5 jours. Les boîtes sont vérifiées quotidiennement afin d'identifier les isolats HCN⁺.

La production d'acide cyanhydrique (HCN) a été évaluée par le changement de couleur observée sur le papier filtre virée du jaune au marron ou au marron-rougeâtre. La réaction a été marquée comme faible (marron claire), modérée (marron foncé) et forte (marron rougeâtre) (Mallesh, 2008).

6.3- Production d'acide indole acétique (AIA)

- **Production d'acide indole acétique (AIA) sur milieu solide**

La capacité des isolats pré-sélectionnés à produire l'AIA ou des substances apparentées a été vérifiée selon la méthode modifiée de Bric *et al.*, 1991. Chaque isolat a été inoculé, à l'aide d'une anse sous forme de stries, sur une boîte de Pétri contenant le milieu Luria-Bertani solide additionné de tryptophane (5g/l) (LBT) (Annexe 1). Un papier Watmann N°2 stérile de 9 cm de diamètre, est déposé directement sur le milieu LBT. Les boîtes de Pétris inoculées, ont été incubées en position inversée à 30°C. Après 3 jours d'incubation, le papier Watmann dont les colonies montrent une bonne croissance, a été imprégné de 2,5 ml du réactif de Salkowski puis ré-incubé pendant 20mn à l'obscurité.

Les bactéries qui synthétisent de l'AIA sont identifiées par le changement de couleur (rose-rouge) observée.

- **Production d'acide indole acétique (AIA) en milieu liquide**

La production de l'AIA est testée sur milieu Luria-Bertani liquide additionné de tryptophane (5g/l) (Bric *et al.*, 1991) (Annexe 1). Le milieu estensemencé par 100 µl des cultures bactériennes incubées à 30°C/96 h. Le dosage colorimétrique est réalisé selon la

méthode de Loper et Scroth (1986). Les cultures sont centrifugées à 5000 rpm/ 20min. 1ml du surnageant est additionné de 2 ml du réactif de Salkowski (50ml d'acide perchlorique 35% et 1ml de FeCl_3 à 0.5 M). La densité optique est mesurée à 535 nm après 20 mn d'incubation à l'obscurité. Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue dans un intervalle 0 à 10^{-3} M d'AIA.

6.4- Production d'enzymes

- **Cellulases**

La production de cellulases est déterminée selon la méthode décrite par Cattelan et al. (1999). Le milieu M9 (Miller, 1974) supplémentée de 10 g de cellulose et 1,2 g d'extrait de levures, est utilisée pour tester le pouvoir hydrolytique par production de cellulases. Les isolats sont étalés puis incubés pendant 8 jours à 28°C. Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (Verma *et al.*, 2007).

- **Chitinases**

L'activité chitinolytique est estimée selon la méthode décrite par Reniwick *et al.* (1991) sur le milieu M9 supplémenté de la chitine. La formation d'halos clairs autour des colonies après 5 jours d'incubation à 30° C indique une chitinase positive (Naik et Sakthivel, 2006).

6.5- Analyses statistiques

Pour chaque paramètre étudié (la solubilisation des phosphates, la production de l'AIA, l'HCN et des enzymes), une analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée par le logiciel de traitement statistique Statistica 8. Le test de Newman-Keuls est utilisé pour comparer les moyennes pour ces paramètres chaque fois que le F calculé était significatif.

Une analyse des composantes principales (ACP) a été réalisée pour tous les paramètres PGPR étudiés, y compris l'activité antifongique, dans le but d'établir une relation entre plusieurs variables et définir le comportement d'individus vis-à-vis de ces variables. Cette méthode statistique a été aussi utilisée dans le but de procéder à un choix des isolats de *Bacillus* les plus performantes par le biais de la mesure de leurs capacités PGPR.

7- Identification des rhizobactéries

Suite aux tests d'antagonisme que nous avons effectué entre les isolats antagonistes et les deux isolats phytopathogènes (FOC1 et FOC2), cinq isolats de rhizobactéries antagonistes (Rb29, Rb4, Rb6, Rb12 et Rb15) sont retenus pour identification.

L'identification de ces rhizobactéries isolées est réalisée en se basant sur les études morphologique, biochimique et physiologique.

L'identification préliminaire des espèces de *Bacillus* spp. est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques (morphologie cellulaire), la coloration de Gram, la mobilité, la recherche de la catalase et de l'oxydase, voie d'utilisation du glucose, ainsi que l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques (Holt *et al.*, 1994).

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés de l'appartenance de nos isolats au genre *Bacillus* (Claus et Berkeley, 1986) par l'étude de :

- les caractéristiques des colonies ont été étudiées sur des cultures de 48 h en GN et TSA (Annexe 1),
- la présence de spores, aspect, position et leur forme qui ont été observés,
- la mobilité qui a été appréciée en utilisant la gélose molle au Mannitol.
- la morphologie des bactéries microscopiquement, leur arrangement, le type de Gram et le degré de pureté de la culture.

La **présence de la catalase** est un test standardisé pour les identifications bactériologiques. Il a été réalisé sur des colonies pures et bien isolées. Cette enzyme ferroprotéique, présente chez de nombreuses bactéries, est décelée en déposant une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 1,5 % sur une colonie âgée de 24 h (gélose nutritive). L'apparition de bulles au niveau de la colonie indique que la souche est catalase positive, sinon elle est catalase négative (Prescott *et al.*, 2003).

La **recherche de l'oxydase** est un test qui permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase ; enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction. Le test est réalisé en frottant une culture de 24 h en gélose nutritive sur un disque imprégné de diméthyl-p-phénylène diamine (bioMérieux). L'isolat est oxydase-positif si la colonie devient violet foncé puis noire, sinon elle est oxydase-négative (Prescott *et al.*, 2003).

La **recherche de caractères biochimiques** a ensuite été effectuée à l'aide des galeries API 50 CHB et 20E (Logan *et al.*, 2000).

La galerie Api 50 CHB (REF 50 430), en combinaison avec le milieu "Api 50 CHB/E Medium" pour la préparation de l'inoculum bactérien, est une version miniaturisée, standardisée et automatisée des techniques biochimiques conventionnelles permettant d'identifier des *Bacillus* et apparentés, des *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*. Le système se présente sous forme de galeries d'identification, avec une série de tube-cupules prête à l'emploi et contenant des substrats lyophilisés nécessaires aux différents tests biochimiques. Cette galerie est composée de 50 microtubes contenant des substrats déshydratés, qui appartiennent aux hydrates de carbone et dérivés. Ils permettent de réaliser 49 tests de fermentation après inoculation de la galerie avec Api 50 CHB/E Medium. La galerie API 20E (REF 20 100/20 160) est utilisée en complément de la galerie API 50 CHB. La galerie API 20E contient 20 tests enzymatiques et de fermentation des sucres, permettent l'identification des bacilles.

En suivant les recommandations du fabricant (Biomérieux, FRANCE), les galeries ont été inoculées et incubées à une température de 30 °C au moins pendant 24h et 48 heures (Annexe 2).

La lecture des galeries d'Api 50 CHB est effectuée en recherchant dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du rouge de phénol contenu dans le milieu. Pour le test esculine (tube n° 25), on observe un virage du rouge au noir.

L'ensemble des résultats des galeries permettent d'établir un profil biochimique de l'isolat étudié. Le profil a été identifié en utilisant le logiciel d'identification apiwebTM après authentification sur le site du fabricant (<https://apiweb.biomerieux.com>) qui permet de comparer les profils obtenus à ceux correspondant aux genres et espèces bactériennes en se basant sur une base de données régulièrement mise à jour. Il en découle une proposition des noms du genre et de l'espèce auxquels l'isolat est apparenté.

Un isolat a fait l'objet d'une identification génotypique, classé morphologiquement et physiologiquement selon le genre *Baillus*. L'isolat Rb29 a été confié à l'institut pasteur de Paris (Pôle d'identification bactérienne) pour une identification moléculaire par le séquençage du gène *rrs* (ARNr 16S). Elle a porté sur l'amplification puis le séquençage du gène *rrs* codant l'ARN ribosomal 16 S suivi de la comparaison de la séquence obtenue à des bases de données (Figure 13).

La colonie bactérienne à identifier est simplement lysée. Le gène *rrs* codant pour l'ARNr 16 S est amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR) en utilisant deux amorces universelles complémentaires des extrémités 5' et 3' conservées. Un fragment est ainsi obtenu. Ce produit d'amplification est ensuite séquencé par un séquenceur semi-automatique. Pour la séquence obtenue, des séquences homologues sont recherchées dans des banques de données via le réseau Internet à l'aide des programmes BLASTN du National Center for Biotechnology Information (NCBI) ou BIBI pour Bio Informatique Bacterial Identification de l'Université de Lyon. Le logiciel fournit un pourcentage d'homologie entre la séquence étudiée et celles contenues dans les banques de données (Wilhelm *et al.*, 2005).

La souche bactérienne peut enfin être positionnée parmi l'ensemble des espèces connues sous forme d'un arbre phylogénétique construit par un logiciel.

Au Centre d'Identification Moléculaire des Bactéries de l'Institut Pasteur, l'identification n'est terminée qu'après obtention d'un arbre phylogénétique en tenant compte de l'homologie / hétérogénéité des espèces concernées et de la netteté de la séparation des espèces proches.

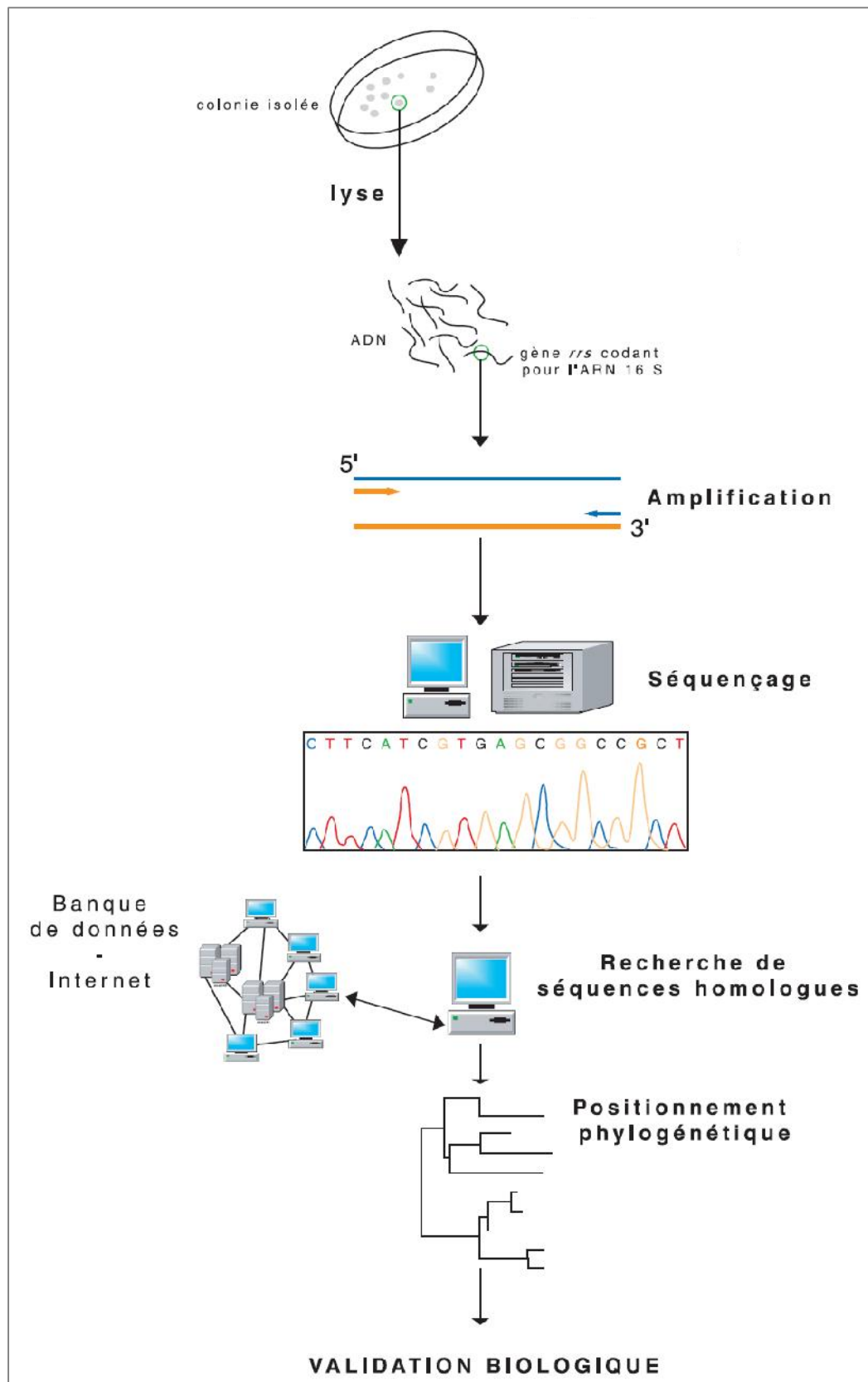


Fig. 13 : Les étapes de l'identification bactérienne par séquençage du gène *rrs* codant l'ARN ribosomal 16 S (Wilhelm *et al.*, 2005).

8- Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Bacillus* spp. sur FOC en pots et en plein champ

8.1- Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Bacillus* spp. sur l'incidence de la maladie

Cinq isolats de *Bacillus* spp., les plus performants *in vitro*, ont été sélectionnés pour tester leur efficacité *in vivo*, en pots et en plein champ

a- Préparation des graines, de l'inoculum de FOC et de *Bacillus* spp.

Les graines de cultivar ILC482 de pois chiche sont préparées comme décrite précédemment (paragraphe 3.3.1).

La technique de préparation de l'inoculum de FOC est identique à celle décrite précédemment (paragraphe 3.3.2-a).

Les isolats bactériens ont été cultivés dans un bouillon nutritif sur un agitateur rotatif à 28°C et 180 tours par minute pendant 24 h. La suspension a été centrifugée dans des tubes en plastique stériles d'une capacité de 50 ml à 5000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est recueilli et la densité de la suspension a été ajustée par de l'eau distillée stérile pour donner une concentration finale de 10^8 bactéries/ml (Idris *et al.*, 2007).

b- Inoculation et traitement des graines

L'inoculation par le champignon phytopathogène FOC1 a été réalisée par immersion des graines dans une suspension de spores de 10^6 microconidies/ml pendant 30 min.

La bactérisation par trempage a été utilisée pour traiter les graines dans chaque inoculum bactérien (10^8 bactéries/ml) pendant 30 min.

Les graines bactérisées et inoculées par FOC1 sont immergées dans un mélange (v/v) constitué d'une suspension de spores de FOC1 et d'une suspension bactérienne pour chaque bactérie antagoniste sélectionner.

Les graines du témoin sont immergées dans l'eau distillée stérile.

c- Semis des graines en pot et en plein champ

Des pots en plastique (15 cm de diamètre et 20 cm de hauteur), préalablement désinfectés par l'hypochlorite de sodium (2 %), ont été remplis par le substrat désinfecté composé du mélange terre végétale – tourbe (2v : 1v). En suite, un semis a été réalisé à raison de trois graines par pot et 3 pots pour chaque traitement. L'expérimentation est

réalisée au niveau du laboratoire L.R.S.B.G de l'université de Mascara durant une période de 40 jours. Les plantules du pois chiche sont élevées dans les mêmes conditions décrites précédemment (paragraphe 3.3.1-).

Un semis en plein champ a été effectué le 02 mars 2009 à la ferme expérimentale de l'université de Mascara (altitude 494 m, latitude 35°22'26.67"N, longitude 0°11'1.66"E). Le sol est de texture argilo-sableuse et de pH égal à 7,2. Le semis a été réalisé à raison de 3 blocs pour chaque traitement. Chaque bloc comportait 3 lignes pour un total de 24 graines.

Les 4 types de traitements étaient : (1) des graines saines (témoin) non infectées par FOC1 et non traitées par *Bacillus* spp. ; (2) des graines inoculées uniquement par FOC1 ; (3) des graines inoculées par FOC1 et traitées par *Bacillus* spp. ; (4) des graines traitées uniquement par *Bacillus* spp.

d- Evaluation de l'efficacité de *Bacillus* spp. sur FOC *in vivo*

Des estimations de l'incidence (IM) et le pourcentage de réduction (RM) de la maladie des plantes inoculées par FOC1 et traitées avec *Bacillus* spp. par rapport aux plantes inoculées uniquement par FOC1 ont été réalisés.

L'incidence de la maladie (IM) a été calculée par la formule suivante (Landa *et al.*, 1997):

$$IM (\%) = (\text{nombre de plantes infectées} / \text{nombre total de plantes}) \times 100$$

Le pourcentage de réduction de la maladie (RM) a été calculé en fonction de l'indice de gravité de la maladie (Villajuan-Abgona *et al.*, 1996).

$$RM (\%) = [(A - B) / A \times 100]$$

Où : **A** est l'indice de gravité de la maladie due uniquement par FOC1 et

B est l'indice de gravité de la maladie après inoculation par FOC1 et bactérisation par *Bacillus* spp.

La maladie a été évaluée en fonction de la gravité des symptômes, en utilisant une échelle de notation proposée par Landa *et al.* (1997) allant de 0 à 4 et qui a été décrit précédemment (3.3.3- Evaluation de l'action de FOC et estimation des symptômes).

8.2- Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Bacillus* spp. sur la croissance et le rendement de pois chiche

Les paramètres de croissance ont été mesurés à la fin de la période végétative, soit 4 mois au stade de maturation des gousses en plein champ.

Les plantes issues de chaque traitement ont fait l'objet de mesures et de comptages.

Les paramètres étudiés sont la hauteur des plantes (H), le nombre total de gousses (Nt Go), le nombre de gousses par plante (Go/pl), le nombre total de graines (Nt Gr), le nombre de graines par plante (Gr/pl), le nombre de graines par gousse (Gr/Go), le poids total graine (Pt Gr) et le poids de 100 graines (P100).

8.3-Analyse statistique

Les données obtenues pour chaque traitement ont fait l'objet d'analyses statistiques. Des analyses de la variance (ANOVA) ont été effectuées. Le test de Newman-Keuls est utilisé pour comparer les moyennes pour ces paramètres chaque fois que le F calculé était significatif.

Partie III : Résultat et discussion

Chapitre 1 :

**Importance du flétrissement vasculaire du pois chiche dans
le nord-ouest Algérien**

Chapitre 1 :

Importance du flétrissement vasculaire du pois chiche dans le nord-ouest Algérien

1.1- Introduction

Chaque recherche dans le cadre de la lutte biologique ne saurait être efficace que si on menait au préalable une étude approfondie de l'agent pathogène responsable de la maladie pour laquelle la méthode de lutte fiable va être recherchée. Linderman (1983) cité par Boudyach (2004), avance que la maîtrise d'une lutte biologique contre un agent phytopathogène donné nécessite la connaissance de la biologie du pathogène et de la maladie qu'il cause ainsi que sa distribution géographique et les facteurs abiotiques, qui agissent sur l'expression de la maladie.

En Algérie, les études effectuées sur la pathologie du pois chiche ont surtout porté sur l'anthracnose (Bouznad *et al.*, 1996 ; Mabsoute *et al.*, 1996 ; Benzohra *et al.*, 2012 ; Benzohra *et al.*, 2013), véritable obstacle à la culture auquel s'ajoute le flétrissement vasculaire (Labdi, 1990). Peu de connaissances sont acquises concernant le flétrissement vasculaire induit par le FOC en Algérie. Aussi, dans le cadre de ce travail, des isollements de l'agent pathogène ont été effectués à partir des échantillons infectés en vue de constituer une collection d'isolats de FOC. Son pouvoir pathogène a été examiné dans le but de préciser son rôle dans la manifestation des symptômes observés au champ.

Dans le but d'approfondir nos connaissances acquises lors de l'étude bibliographique relative au FOC, nous avons consacré une partie de cette recherche à l'étude de ce champignon phytopathogène. L'objectif de cette démarche est de :

- i. préparer d'abord une collection d'isolats de FOC.
- ii. ensuite d'évaluer le pouvoir pathogène de ces isolats.
- iii. Après la réalisation de (i et ii), les deux isolats les plus virulents seront sélectionnés pour le criblage des antagonistes et également selon leur agressivité afin d'effectuer les essais de la lutte biologique.

1.2- Symptomatologie

Les prospections effectuées dans les quatre régions du nord-ouest Algérien : Mascara, Sidi Bel-Abbès, Mostaganem et Relizane, comprenant 11 champs de pois chiche nous ont permis de détecter la présence des symptômes de la fusariose vasculaire dans tous les champs prospectés.

Les symptômes typiques de la fusariose vasculaire du pois chiche se manifestent plus tard sous forme d'un jaunissement vasculaire partiel ou total du feuillage qui avait atteint d'abord les feuilles les plus basses et qui avait progressé vers le haut (Figure 14 et 15). Ce cas était le plus fréquent dans toutes les parcelles prospectées. Les vaisseaux conducteurs de la tige des plantes malades présentent une décoloration. Le système racinaire des plantes malades présente une réduction des ramifications secondaires.

1.3- Isolement de FOC à partir de tige et graine du pois chiche

Le pourcentage d'isollements calculés pour chaque région, représente le nombre d'isollements positifs de FOC rapporté au nombre d'isollements effectués. Les résultats montrent que FOC est présent dans toutes les régions prospectées. Le pourcentage de l'isolement de ce champignon est variable et élevé, compris entre 69 et 100%. Cette différence de pourcentage est probablement due aux conditions climatiques qui déterminent l'expression précoce ou tardive de l'attaque et à la spécificité de la région.

Le FOC a été le seul champignon qui fût isolé à partir des tiges (Figure 16) avec une fréquence qui a atteint des valeurs supérieures à 60 % au stade de formation des graines.

Concernant les graines issues des plantes malades, aucun isolement de champignon pathogène n'a été obtenu aux parcelles des régions prospectées à l'exception de la région de Mascara où les analyses réalisées sur les semences du pois chiche ont montré la présence d'un seul thalle correspondant au champignon recherché.

1.4- Pathogénicité des isolats de *F. oxysporum*

L'ensemble des isolats de *F. oxysporum*, isolés soit à partir des segments de la tige ou à partir des graines de pois chiche ont manifesté les mêmes symptômes caractéristiques de la fusariose vasculaire sur le cultivar ILC 482. Ces symptômes sont identiques à ceux observés en plein champs. De mêmes, les cultures fongiques issues des isollements effectués à partir des plantules inoculées artificiellement sont morphologiquement identiques à leurs cultures mères respectives.

L'induction de la maladie et la reproduction des mêmes symptômes témoignent de l'appartenance des isolats inoculés à la forme spéciale *ciceris*. Le réisolement du FOC effectué à partir des plantes inoculées a permis de confirmer l'implication de cet agent pathogène dans l'induction du flétrissement vasculaire (Figure 17).

1.5- Evaluation de l'incidence de maladie et la virulence des isolats de FOC

Parmi les isolats obtenus à partir des tiges et des semences de plantes présentant des symptômes de flétrissement, 10 ont été choisis en fonction de l'organe d'isolement et de la région dont ils étaient issus. Leur virulence vis-à-vis du cultivar ILC 482, connu pour sa sensibilité envers le FOC a été évaluée.

Les résultats présentés dans le tableau 8, indiquent que l'ensemble des isolats inoculés à la variété ILC 482 a provoqué des symptômes typiques de la fusariose vasculaire du pois chiche. Les symptômes s'observent généralement dès la troisième semaine d'inoculation, pour l'ensemble des isolats. Les symptômes consistent en un jaunissement qui avait progressé depuis les feuilles les plus basses vers les parties apicales (Figure 18), avec une chute des folioles nécrosées et un brunissement des tissus vasculaires. De tels symptômes caractéristiques du flétrissement, étaient similaires à ceux observés au champ, leur sévérité avait varié en fonction de l'isolat inoculé à la plante hôte. Durant toute la durée de l'essai, les plantes témoins maintenues dans les mêmes conditions que les plantes inoculées n'avaient manifesté d'aucun symptôme.

L'incidence de la maladie (IM) a été calculée 40 jours après l'inoculation. Les degrés de virulence des isolats sont groupés en 5 classes: 0-20% (très peu virulents); 21-40% (peu virulents); 41-60% (moyennement virulents); 61-80% (virulents); 81-100% (très virulents).

Les 10 isolats ont montré une variabilité de la virulence (Tableau 8), les incidences de la maladie (IM) variaient entre 18,6% et 100%. Parmi les 10 isolats de FOC testés, 54,5% se sont révélés moyennement virulents. Il ressort de cette étude que 2 isolats se sont révélés virulents avec un IM se situant entre 61 et 80% et seulement un isolat semble être très virulent.

L'analyse de la variance des résultats obtenus après 40 jours d'inoculation (Annexe 3), a montré des différences significatives entre les 10 isolats. L'IM calculée a permis de classer les isolats en cinq groupes homogènes (Tableau 9).



Fig. 14 : Un plant du pois chiche cultivé présentant un jaunissement des feuilles :
symptômes causés par FOC (Région de Mascara)



Fig. 15 : Symptômes de la fusariose vasculaire causés par FOC d'un plant cultivé du pois chiche (à droite) en comparaison avec un plant sain (à gauche) du même champ.

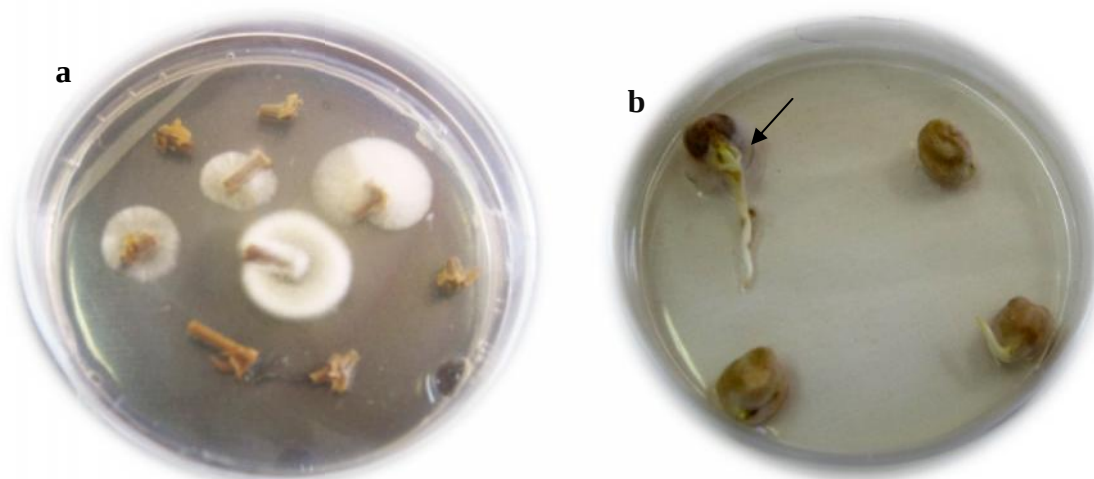


Fig. 16 : Développement du FOC à partir de fragments d'une tige (a) et des graines (b) affectées par le flétrissement



Fig. 17 : Réisolement de FOC à partir de fragments d'une tige

Tableau 8 : Classement des isolats de FOC selon l'origine d'isolement et les incidences de la maladie (IM) induites

Origine des isolats	Nombre des isolats	Nombre des isolats / Classe d'IM (%)				
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100
Mascara	04			Mas4 et Mas3	Mas2 (FOC2)	Mas1(FOC1)
Sidi Bel-Abbès	02			Sba1	Sba2	
Mostaganem	02		Mos1	Mos2		
Relizane	02	Rel1		Rel 2		



Fig. 18 : Comportement de la variété du pois chiche ILC 482 inoculée par FOC

Tableau 9 : Incidence de la maladie (IM en %) des isolats de FOC classés en 5 groupes

Isolats	Moyenne IM * $\pm$ Erreur standard	Groupes
Mas 1(FOC1)	98 ^a $\pm$ 1,58	Groupe 1 : isolat très virulent
Mas2(FOC2)	75 ^b $\pm$ 1,29	Groupe 2 : isolats virulents
Sba2	75 ^b $\pm$ 1,29	
Mas4	51 ^c $\pm$ 1,29	Groupe 3 : isolats moyennement virulents
Rel2	49 ^{c,d} $\pm$ 1,29	
Sba1	47 ^{c,d} $\pm$ 1,29	
Mos1	45 ^d $\pm$ 1,29	
Mas3	44 ^d $\pm$ 1,29	
Mos2	30 ^e $\pm$ 1,29	Groupe 4 : isolats peu virulents
Rel1	17 ^f $\pm$ 1,29	Groupe 5 : isolat très peu virulent

* Test de Newman-Keuls à 5%

1.6- Caractérisation morphologique et biométrique

Une étude morphologique de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* a porté sur les caractères cultureux (aspects du mycélium aérien, pigmentation du thalle et du mycélium) ainsi que les caractéristiques biométriques des spores (macro et microconidies) et la présence ou absence des chlamydospores.

Contrairement à beaucoup d'autres champignons pour lesquels l'aspect culturel de la colonie n'est pas pris en considération, l'expérience a montré qu'il n'en est pas de même pour les *Fusarium* spp. C'est ce qui nous a amené au cours de nos isollements pratiqués de différents organes (tiges et semences), à retenir ce critère dans une première approche à l'identification des isolats.

Notons que l'aspect général d'une colonie, est déterminé par la couleur de la colonie, sa texture et enfin la présence de chlamydospores.

1.6.1- Caractérisation culturelle

Dans l'ensemble des essais réalisés, trois morphotypes mycéliens ont été rencontrés: cotonneux, duveteux et ras muqueux; par contre, les types sporodochial, pionnotal et sclérotial n'ont pas été observés. La description des trois morphotypes (cotonneux, duveteux et ras muqueux) est la suivante (Figure 19):

Le type cotonneux se caractérise par un mycélium aérien qui est très abondant et vigoureux, épais et dense. Le **type duveteux** se présente par un mycélium aérien qui est assez court, mais dense, portant de nombreuses microconidies. Les chlamydospores se forment tardivement. Quelques isolats sont caractérisés par le **type ras muqueux**. Ce morphotype ne présente pas de mycélium aérien. Les microconidies sont abondantes, les macroconidies sont rares alors que les chlamydospores sont abondantes et tardives.

L'observation des caractères morphologiques des isolats retenus (Tableau 10 et Figure 19) a révélé une hétérogénéité au sein de la forme spéciale *ciceris*.

A travers cette étude, nous avons pu relever une pigmentation très diversifiée sur le milieu PDA. Après 6 jours d'incubation, le mycélium présente des pigmentations blanche, rose, saumon et violette (Figure 20). La pigmentation blanchâtre semble être majoritaire et elle est rencontrée chez 6 isolats (Mas1, Mas4, Sba2, Mos1, Mos2, Rel1). En revanche, elle est violette chez 2 isolats (Mas2, Sba1), par contre les deux pigmentations Saumon et rose n'ont été signalées respectivement que chez 2 isolats (Mas3) et (Rel2).

Tableau 10 : Caractéristiques culturelles des morphotypes de 10 isolats de FOC

Origine des isolats	Isolats	Organe d'isolement	Morphotype	Pigment	Chlamydospores
Mascara	Mas1(FOC1)	<i>Tige</i>	Cotonneux	Blanc	+
	Mas2(FOC2)	<i>Graine</i>	Duveteux	Violet	+
	Mas3	<i>Tige</i>	Cotonneux	Saumon	+
	Mas4	<i>Tige</i>	Ras muqueux	Blanc	+
Sidi Bel-Abbès	Sba1	<i>Tige</i>	Duveteux	Violet	+
	Sba2		Cotonneux	Blanc	+
Mostaganem	Mos1	<i>Tige</i>	Cotonneux	Blanc	+
	Mos2		Duveteux	Blanc	+
Relizane	Rel1	<i>Tige</i>	Ras muqueux	Blanc	+
	Rel2		Cotonneux	Rose	+

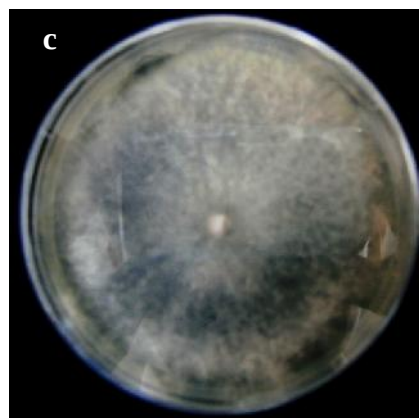
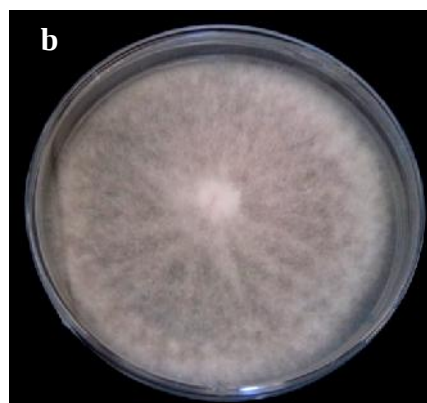
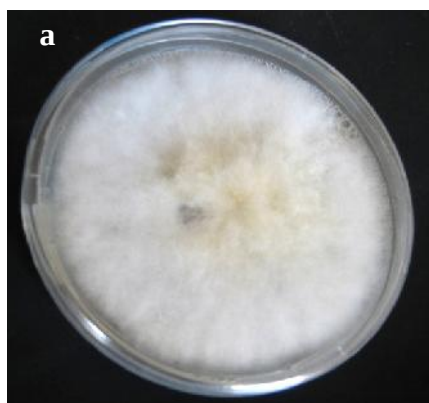


Fig. 19 : Morphotype cotonneux (a), duveteux (b) et ras muqueux (c) de FOC sur le milieu PDA.

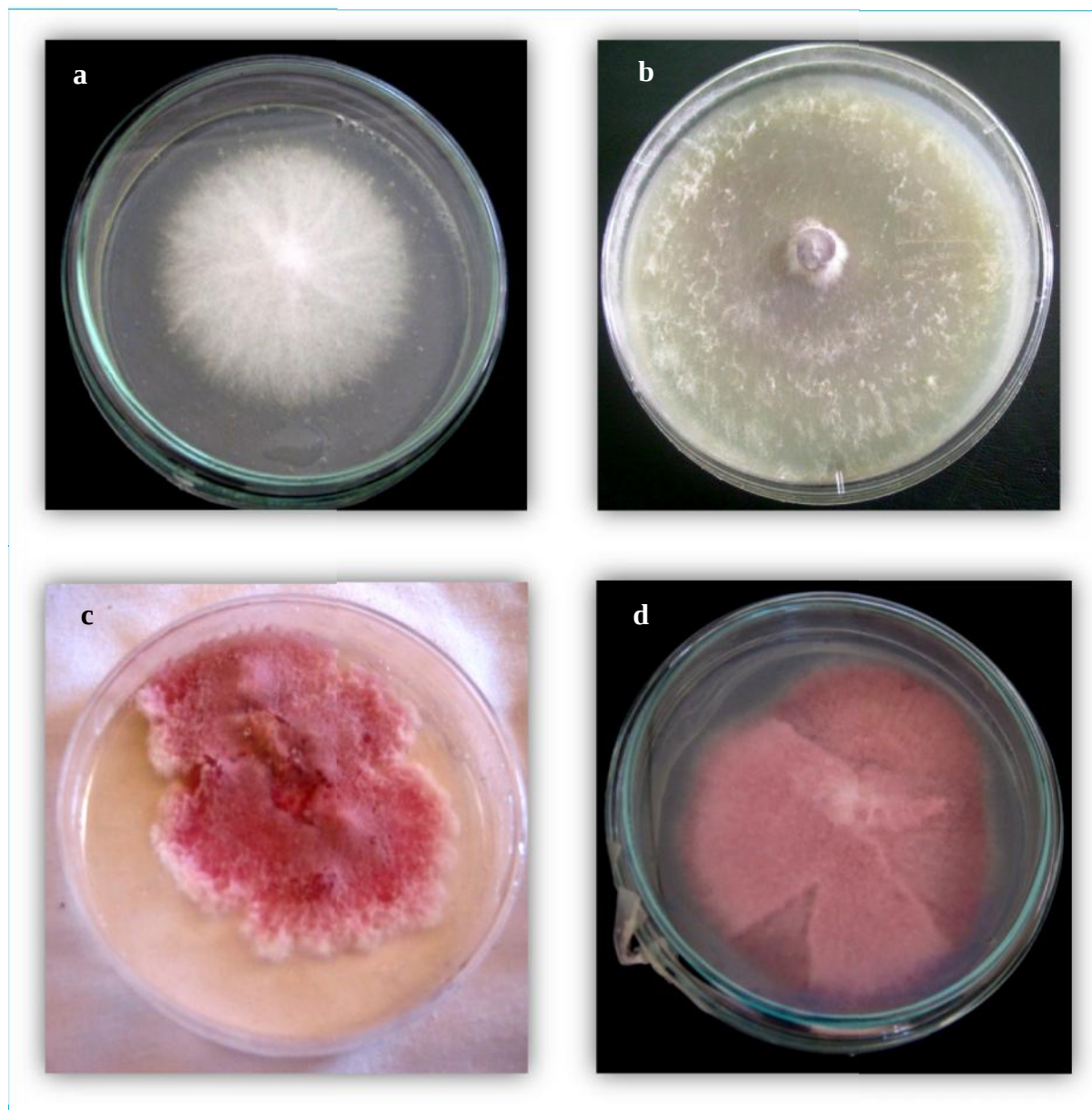


Fig. 20 : Cultures de FOC montrant les pigmentations du thalle (après 6 jours d'incubation sur le milieu PDA). **a** : blanc ; **b** : violet; **c** : rose ; **d** : Saumon

1.6.2- Caractéristiques biométriques des spores

Les mensurations des macroconidies et des microconidies produites par les isolats de FOC figurent dans le tableau 11.

a- Les microconidies

L'ensemble des 10 isolats étudiés est caractérisé par la présence abondante de microconidies ovales, droites ou incurvées (Figure 21), portées par des conidiophores ramifiés. Elles sont généralement unicellulaires et mesurent 3,25 à 4,25 de large et 6,47 à 9,06 μm de long. L'analyse statistique portant sur la longueur et la largeur des microconidies (Annexe 3) nous a montré qu'il n'existe pas de différences significatives entre les 10 isolats de FOC. Les longueurs et les largeurs de microconidies sont homogènes. Cette homogénéité a donné de corrélation de $r = 0,91$ entre les mensurations de la largeur et de la longueur des microconidies des 10 isolats à origine géographique différente.

b- Les macroconidies

La production des macroconidies est très faible chez FOC. Les macroconidies sont souvent légèrement arquées (Figure 21); elles sont formées de 3 à 5 cellules et leur dimension varie de 3,55 à 4,25 de long et de 29 à 37,1 μm de large. Ces spores sont regroupées sous forme de fausses têtes sèches à l'extrémité de microconidiophores allongés, dispersés sur le filament mycélien. Les résultats de l'analyse statistique des mensurations de la longueur et la largeur des macroconidies ne sont pas significatifs à 5 % et 1 % (Annexe 3). L'analyse de la variance a permis de distinguer que les isolats de FOC sont homogènes.

Cette étude montre donc que les mensurations en longueur et largeur des macroconidies sont homogènes. Cette homogénéité a donné une corrélation entre la longueur et la largeur des macroconidies ($r = 0,79$) des 10 isolats à origine géographique différente.

c- Les chlamydospores

Après 2 à 3 semaines de culture, de nombreuses chlamydospores intercalaires ou terminales apparaissent sur le mycélium et rarement sur les macroconidies. Elles sont arrondies, en ballonnet, avec une double paroi très caractéristique et leur dimension est 8,10 μm de diamètre. L'ensemble des isolats produit des chlamydospores (Figure 21).

Tableau 11 : Mensurations (μm) des microconidies et des macroconidies de 10 isolats de FOC

Isolats	Microconidies		Macroconidies	
	Longueur (μm)	Largeur (μm)	Longueur (μm)	Largeur (μm)
Mas1	6,47	3,25	37,1	4,25
Mas2	6,47	3,25	32,25	3,55
Mas3	9	3,9	35,5	3,9
Mas4	6,47	3,25	32,25	3,55
Sba1	6,47	3,25	29	3,55
Sba2	6,47	3,25	29	3,55
Mos1	6,47	3,25	35,5	4,25
Mos2	6,47	3,25	30	3,87
Rel1	9,06	4,25	35,5	4,25
Rel2	8,67	3,55	32,25	3,55
Moyenne	7,20	3,44	32,83	3,83

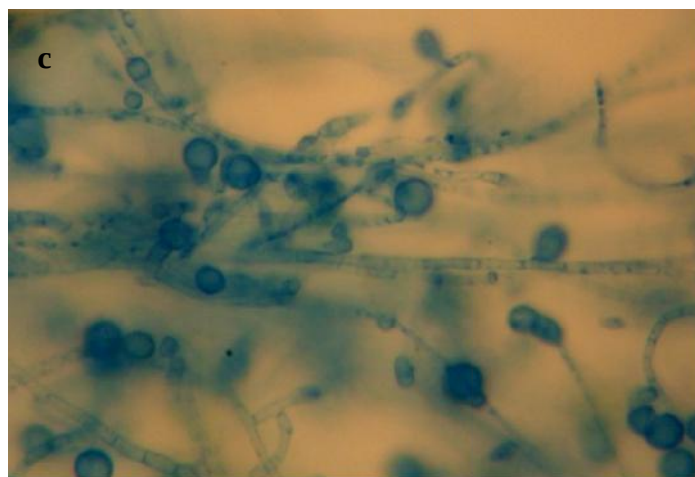
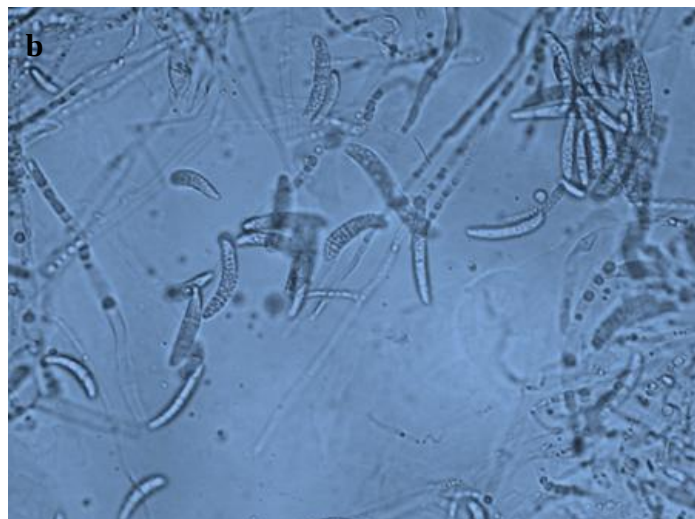
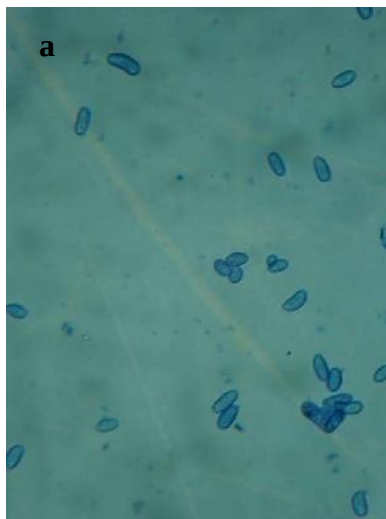


Fig. 21 : Microconidies (a)
macroconidies (b) et
chlamydospores de FOC
(grossissement 40X)

1.7- Discussion

Les symptômes de flétrissement vasculaire observés dans les parcelles prospectées sont similaires à ceux rapportés en Californie (Westerlund *et al.*, 1974), en Inde (Nene et Reddy, 1987; Haware, 1988), en Espagne (Jiménez-Gasco et Jiménez-Díaz, 2003), au Maroc (El Aoufir, 2001). Les symptômes les plus fréquemment observés dans les champs visités étaient le jaunissement vasculaire induit par le FOC tel qu'il a été rapporté en Espagne et qui correspond au flétrissement tardif décrit par Jiménez Jiménez-Díaz *et al.*, 2015. Cependant, pour certaines plantes, le FOC avait induit un flétrissement typique précoce qui correspond au "Wilt" décrit par divers auteurs (El Aoufir, 2001 ; Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003 ; Jiménez-Díaz *et al.*, 2015). Ce type de flétrissement qui est apparu au stade préfloraison et qui a abouti à la mort des plantes avant qu'elles n'atteignent le stade floraison cause plus de pertes que le jaunissement vasculaire progressif qui apparaisse plus tardivement, ne s'oppose pas à la formation des gousses. Néanmoins, l'observation de ces dernières avait souvent révélé la présence de graines atrophiées, ce qui est en accord avec l'observation de Navas-Cortes *et al.* (2000).

La manifestation de ces deux types de symptômes avec une fréquence plus grande du jaunissement vasculaire a été rapportée dans les cas d'attaque du melon par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Mas et Risser, 1966). Il est probable aussi que l'évolution de la fréquence d'isolement soit le résultat d'une augmentation avec l'âge de la sensibilité de la plante vis-à-vis du *Fusarium* telle qu'elle a été démontrée par les auteurs Gupta *et al.* (1987) et Van Rheenen *et al.* (1988). Des résultats similaires ont été démontrés par Essalmani (2004) où il apparaît que la sensibilité des plantes de lentille est plus accrue lorsqu'elles sont âgées de 14 jours. En effet, ces plantes secrètent des substances favorisant la germination des spores de *F. oxysporum* f.sp. *lentis* tandis qu'à 21 jours il y a production par les racines d'un exsudat renfermant la glycine et la phénylalanine qui limitent la germination des spores de ce champignon (Claudius et Mehrotra, 1973 cité par Essalmani, 2004). Par ailleurs, l'inoculation des plantes du pois chiche en les arrachant de leur substrat et en immergent leurs racines après avoir été sectionnées dans une suspension de spores permet la manifestation rapide des symptômes de la fusariose après 14 jours d'inoculation. Il est connu que les blessures occasionnées au niveau des racines, facilitent l'entrée du flux de spores (Latin et Snell, 1986) et donc la précocité d'apparition des symptômes (Amstrong et Amstong, 1974).

Le système racinaire est entièrement exposé ce qui permet à un grand nombre de site d'infection d'être en contact avec l'inoculum (Rush et Kraft, 1986). Notamment, une certaine proportionnalité existe entre le nombre de site d'infection et le développement rapide de la fusariose (Nyvall et Haglund, 1972). L'inoculation par immersion des racines sectionnées dans une suspension de spores est considérée comme une méthode déterminante de la pathogénécité mais ne tient pas compte de l'effet de l'hôte au niveau de la rhizosphère ni des effets des interactions possible entre l'agent pathogène et les microorganismes du sol.

La caractérisation morphologique de *F. oxysporum* est basée sur la forme et la structure des trois types de spores asexuées à savoir : les microconidies, les macroconidies et les chlamydospores (Nelson *et al.*, 1983 ; Beckman, 1987). Ces spores sont produites sur des monophialides et des sporodochies, et sont dispersées librement sur la surface d'un mycélium (Griffin, 1994). Les chlamydospores sont des spores accessoires viables, produites de façon asexuée résultant d'une modification structurelle du secteur des hyphes végétatifs ou de la cellule conidienne possédant une paroi épaisse, principalement produite pour la survie dans le sol et consistant principalement dans la paroi cellulaire nouvellement synthétisée (Schippers et Van Eck, 1981).

Cette étude montre également que l'ensemble des isolats de FOC produit des microconidies, macroconidies et des chlamydospores. Les résultats présentés dans le tableau 11 montrent une homogénéité de la longueur et la largeur des microconidies de FOC ; ce résultat diffère de ceux obtenus par Abbas (1995) en Syrie chez le *F. oxysporum* f. sp. *lentis*. Ainsi que, les mensurations en longueur et largeur des macroconidies sont homogènes. Par contre, des travaux sur la forme et les dimensions des conidies de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* races 1, 2 et 3 présentent des variations importantes, même à l'intérieur de cette forme spéciale ou à l'échelle d'une race (Messiaen et Cassini, 1968).

Selon la variabilité morphologique de FOC, nos résultats concordent avec ceux obtenus par Trujillo *et al.*, (2005), qui ont également détecté un haut degré de variabilité phénotypique des souches de *Fusarium spp.* responsable de flétrissement dans les œillets.

1.8- Conclusion

Par ailleurs, les différentes prospections effectuées ont permis d'une part, de déceler la présence de la fusariose sur la culture du pois chiche dans toutes les régions: Mascara, Sidi Bel-Abbès, Tlemcen, Mostaganem et Relizane et d'autre part, de constituer une collection de souches de FOC a pathogénicité variable.

Les isolats les plus pathogènes sont ceux provenant des la région de Mascara. Malgré le nombre réduit des champs prospectés dans certaines régions, nous avons pu montrer l'importance de cette maladie qui constitue donc une menace pour cette culture en absence de toute mesure sanitaire. Cependant, les deux isolats de Mascara : FOC1 un isolat très virulent isolé de la tige et FOC2 un isolat virulent mais le fait qu'il est le seul qui provient de graine, fait penser à leurs réaction vis-à-vis des antagonistes isolés à partir de la rhizosphère des plants sains du pois chiche.

Partie III : Résultat et discussion

Chapitre 2 : **Isolement et sélection des rhizobactéries antagonistes**

Chapitre 2 :

Isolement et sélection des rhizobactéries antagonistes

2.1-Introduction

L'isolement des rhizobactéries, agents potentiels de contrôle biologique des champignons phytopathogènes doit se faire à partir de la rhizosphère des plantes à protéger qui poussent sur un sol infecté par le ou les pathogènes en question (Cook, 1993; Chanway *et al.*, 1993 ; Boudyach, 2004). Ceci est dicté par le souci d'avoir une rhizobactérie compétitive et bien adaptée à l'environnement tellurique créé et géré par les interactions des racines de la plante hôte et de l'agent pathogène à combattre. Un autre aspect doit être respecté lors de l'isolement de ce type de microorganisme, c'est le choix des racines des plantes vigoureuses et saines dans un foyer de la maladie à contrôler. Ainsi, Les bactéries qui vivent dans la rhizosphère constitueraient donc un réservoir très riche duquel on peut isoler des candidats potentiels de lutte biologique.

Plusieurs bactéries du genre *Bacillus* qui colonisent la rhizosphère possèdent beaucoup de caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement attrayantes pour protéger les plantes contre les pathogènes. Pour la plupart, ces bactéries ont une capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population remarquable (Haas et Keel 2003), sans doute grâce aux échanges de métabolites avec la plante au niveau de la rhizosphère. De nombreuses rhizobactéries sont capables d'agir directement sur l'agent pathogène (par compétition vis-à-vis des éléments nutritifs ou de l'espace, par antibiose ou par parasitisme), ou indirectement via l'induction d'une résistance systémique (ISR) chez la plante hôte, ce qui engendre une protection contre un grand nombre d'agents pathogènes fongiques et bactériens (Van Loon *et al.*, 1998).

Dans cette partie de notre travail, nous allons aborder les volets suivants :

- Isolement des bactéries antagonistes à partir de la rhizosphère des plantes saines de pois chiche.
- Screening *in vitro* des rhizobactéries isolées sur la base de leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis deux isolats de FOC.

2.2- Isolement des rhizobactéries antagonistes à partir de la rhizosphère de pois chiche

L'isolement des rhizobactéries a été effectué à partir des échantillons de sol rhizosphérique de pois chiche sain dans neuf régions du nord-est et du nord-ouest Algérien : Mascara, Sidi Bel-Abbès, Tlemcen, Tiaret, Mostaganem, Relizane, Chlef, Guelma et Constantine nous a permis de constituer une collection de 131 rhizobactéries.

La répartition de ces rhizobactéries dans les neuf régions montre une dominance à Mascara, soit 20 isolats ; suivi par celle de Sidi Bel-Abbès, 18 isolats ; Mostaganem, 17 isolats ; Tlemcen, 15 isolats. Les trois régions de Relizane, Tiaret et Constantine représentent chacune 13 isolats du total des isolats ; suivi par celle de Guelma, 12 isolats. Par contre, dans la région de Chlef nous avons pu obtenir que 10 isolats. Le pourcentage d'isolement de rhizobactéries issues de chaque région de collecte est présenté par la figure 22.

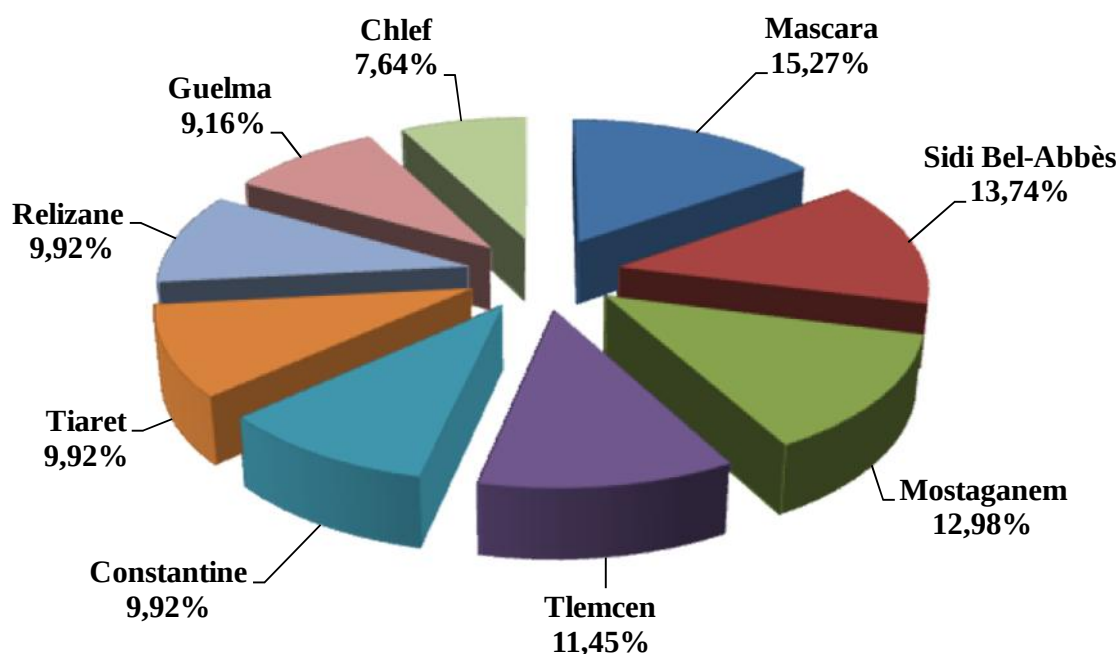


Fig. 22: Répartition en pourcentage et par région de 131 rhizobactéries isolées

2.3- Etude de l'activité antagoniste et sélection des rhizobactéries *in vitro*

2.3.1-Confrontation directe sur milieu de culture entre FOC et les rhizobactéries isolées

Le screening de 131 rhizobactéries, par confrontation directe, a montré un pouvoir antagoniste important (> de 20%) de 29 isolats, soit un taux de 22,13% du total des rhizobactéries isolées.

L'étude de l'inhibition de la croissance mycélienne de deux champignons phytopathogènes (FOC1 et FOC2) confrontés aux 29 rhizobactéries montre une réduction de la croissance par rapports aux témoins après six jours d'incubation (Tableau 12 et Figure 23).

Selon l'isolat testé, la réduction de la croissance mycélienne varie de 25,63 à 71,11% (Tableau 12). La croissance mycélienne enregistrée chez les témoins est nettement supérieure à celle des interactions rhizobactéries/isolats fongiques. La croissance mycélienne enregistrée pour FOC1et FOC2 est de 30 mm et 35 mm respectivement.

L'évaluation du potentiel antagoniste de 29 rhizobactéries a montré que cinq isolats (Rb29, Rb6, Rb12, Rb4, et Rb15) font les isolats les plus performants en raison de leur capacité d'inhibition de la croissance mycélienne des deux isolats FOC1et FOC2 à plus de 50% (Tableau 12, Figure 24 et 25). Un taux d'inhibition de 71,11% a été enregistré par l'isolat Rb29 et qui est nettement supérieur à celui exhibé par les autres isolats.

Dans la même disposition, 18 isolats (Rb1, Rb2, Rb5, Rb7, Rb8, Rb9, Rb11, Rb13, Rb14, Rb16, Rb17, Rb18, Rb19, Rb20, Rb21, Rb25, Rb26 et Rb28) sont des rhizobactéries efficaces avec une moyenne de taux d'inhibition varié de 37,11 à 47,59%. Par contre les isolats : Rb3, Rb10, Rb22, Rb23, Rb24, Rb27 sont moins actifs avec une moyenne de pourcentage d'inhibition inférieure à 34%, ce qui correspond à un faible taux d'inhibition par apport aux autres rhizobactéries.

Les figures 24 et 25 représentent l'effet inhibiteur exercé par les 29 rhizobactéries sur la croissance mycélienne des isolats de FOC après six jours d'incubation à 25°C.

Certains des isolats inhibent non seulement la croissance mycélienne mais également ont changé la coloration des mycéliums de FOC du blanc au brun rougeâtre et rouge (Figure 26).

L'activité antagoniste de certains isolats est en fonction de la production de substances antifongiques qu'on peut apprécier sur gélose. Ces substances sont produites de manières constitutives observables sur PDA, où les colonies sont nettement colorées en marron foncé, et où la coloration est plus accentuée lors de confrontations fongiques à proximité du mycélium (Figure 27).

L'observation microscopique du mycélium de FOC collecté au niveau de l'interface des isolats de rhizobactéries les plus performants a démontré des modifications de couleur du mycélium d'une part et de l'aspect microscopique du FOC d'une autre part. Ces modifications sont :

- un changement de couleur du mycélium de FOC de transparent à rouge (Figure 28a), rouge-marron (Figure 28b) et marron foncé (Figure 31) ;
- l'apparition des grandes vacuoles (Figure 29) ;
- présence de petites vésicules et coagulation du cytoplasme (Figure 30).

Dans le même contexte, un effet destructif de FOC par les rhizobactéries a été observé sous forme d'une dégradation des hyphes ou "la lyse" (Figure 31).

Tableau 12: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOC par confrontation directe avec les 29 rhizobactéries sélectionnées.

isolats de rhizo- bactéries	Inhibition de la croissance mycélienne de FOC (%) *			Classe ^c
	confrontation directe			
	FOC1 ^a	FOC2 ^a	Moyenne ^b ± ES	
Rb1	43,33	34,26	38,80 f±4,54	2
Rb2	37,77	36,45	37,11 f±0,66	2
Rb3	26,66	28,61	27,64 h±0,98	2
Rb4	57,50	55,71	56,60 c±0,89	3
Rb5	38,98	39,02	39,00 f±0,02	2
Rb6	64,16	54,71	59,44 b±4,73	3
Rb7	44,43	35,86	40,15 f±4,28	2
Rb8	45,55	40,56	43,05 f±2,50	2
Rb9	41,42	36,80	39,11 f±2,31	2
Rb10	35,55	31,83	33,69 g±1,86	2
Rb11	53,33	41,85	47,59 e±5,74	2
Rb12	58,53	50,54	54,54 d±4,00	3
Rb13	46,55	40,20	43,38 f±3,18	2
Rb14	43,33	42,71	43,02 f±0,31	2
Rb15	56,72	52,56	54,64 d±2,08	3
Rb16	35,66	37,17	36,42 f±0,75	2
Rb17	48,88	35,77	42,33 f±6,56	2
Rb18	45,55	35,72	40,64 f±4,92	2
Rb19	47,50	38,57	43,03 f±4,46	2
Rb20	45,44	38,53	41,99 f±3,46	2
Rb21	45,77	32,85	39,31 f±6,46	2
Rb22	36,66	31,56	34,11 fg±2,55	2
Rb23	30,00	31,71	30,86 g±0,85	2
Rb24	33,33	30,71	32,02 g±1,31	2
Rb25	46,66	39,60	43,13 f±3,53	2
Rb26	52,22	42,56	47,39 e±4,83	2
Rb27	25,63	28,42	27,03 i±1,40	2
Rb28	50,00	42,84	46,42 e±3,58	2
Rb29	71,11	60,65	65,88a±5,23	3

* Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* après 6 jours d'incubation.

^a les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

^b au niveau de chaque colonne les moyennes des valeurs suivies par différentes lettres sont significativement différentes au seuil ($P \leq 0,05$) (Annexe 4).

^c Inhibition de la croissance mycélienne a été évaluée selon une échelle de 0 à 3: **0** (pas d'inhibition), **1** (1-25%), **2** (26-50%) et **3** (51-75%).

ES : Erreur standard

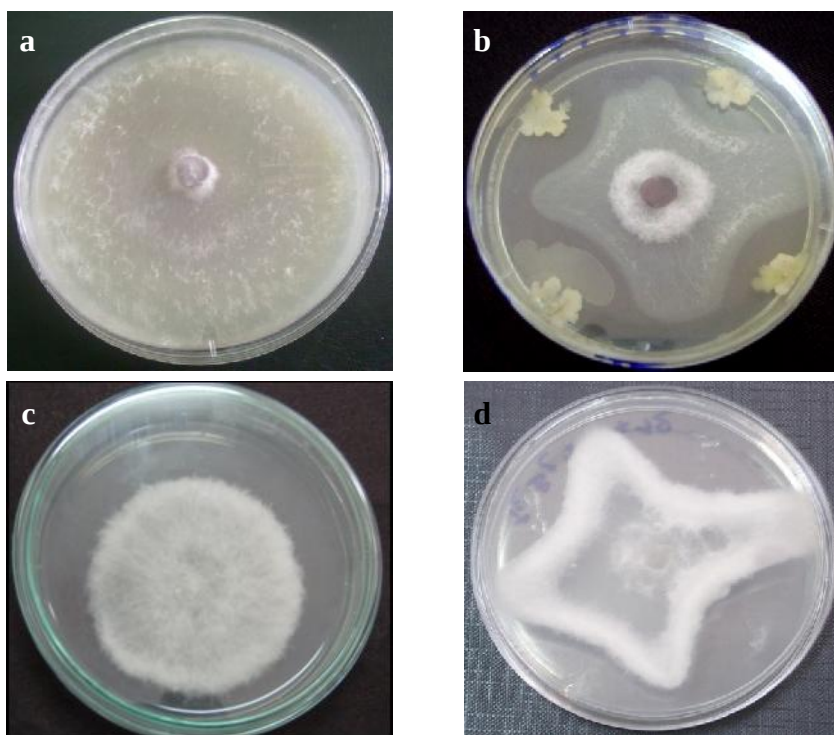


Fig. 23: Inhibition de la croissance mycélienne de FOC1 **(b)** et FOC2 **(d)** par rapport au témoin **(a et c)**, après confrontation directe sur milieu PDA à 25°C pendant six jours d'incubation

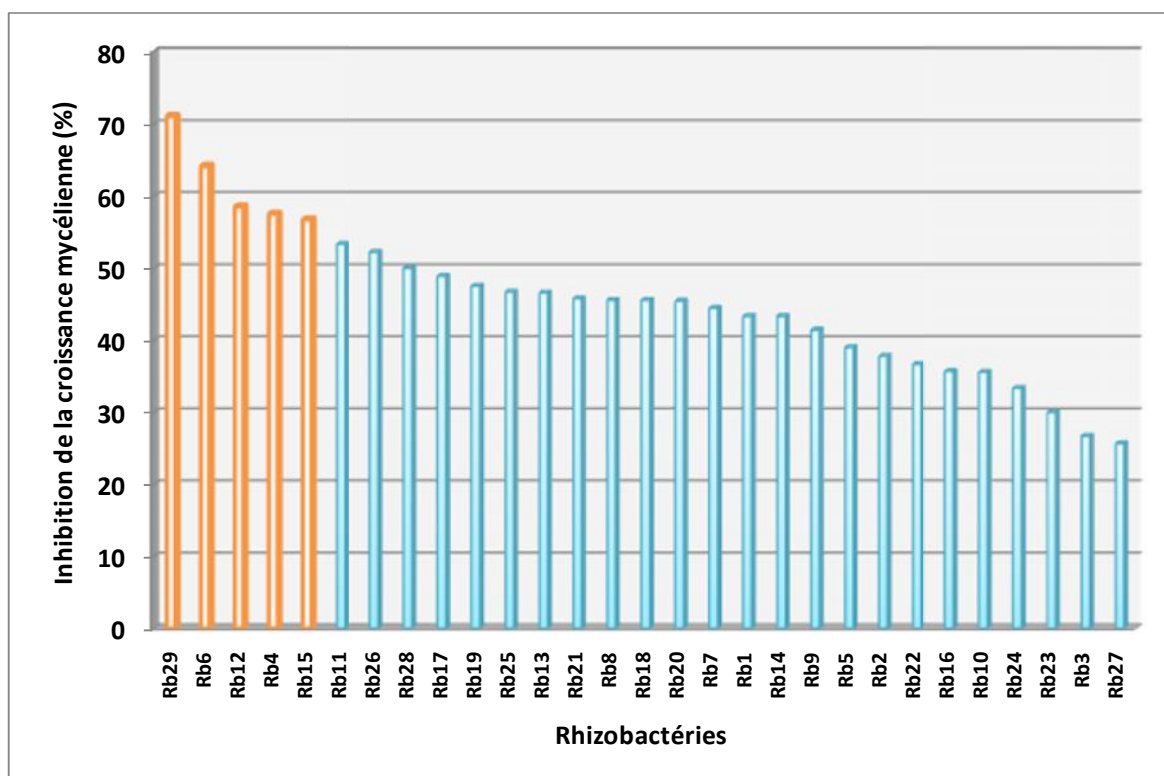


Fig. 24: Pourcentage d'inhibition des 29 rhizobactéries antagonistes sur la croissance mycélienne de FOC1 après six jours d'incubation à 25 °C

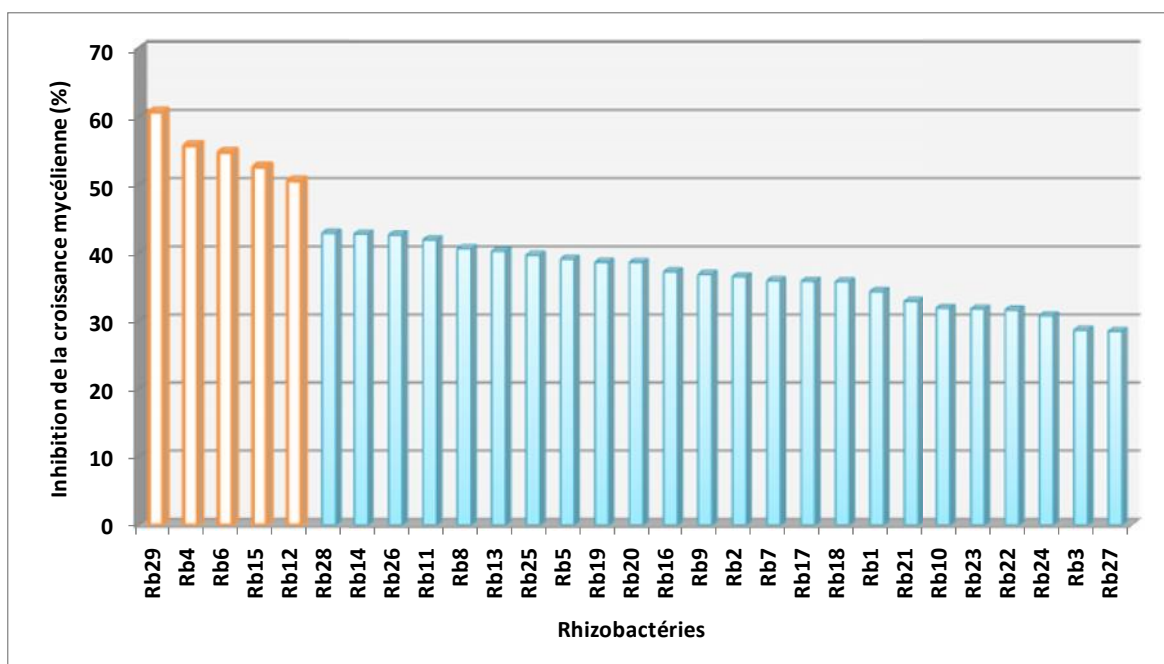


Fig. 25: Pourcentage d'inhibition exercé par les 29 bactéries antagonistes sur la croissance mycélienne de FOC2 après six jours d'incubation à 25 °C

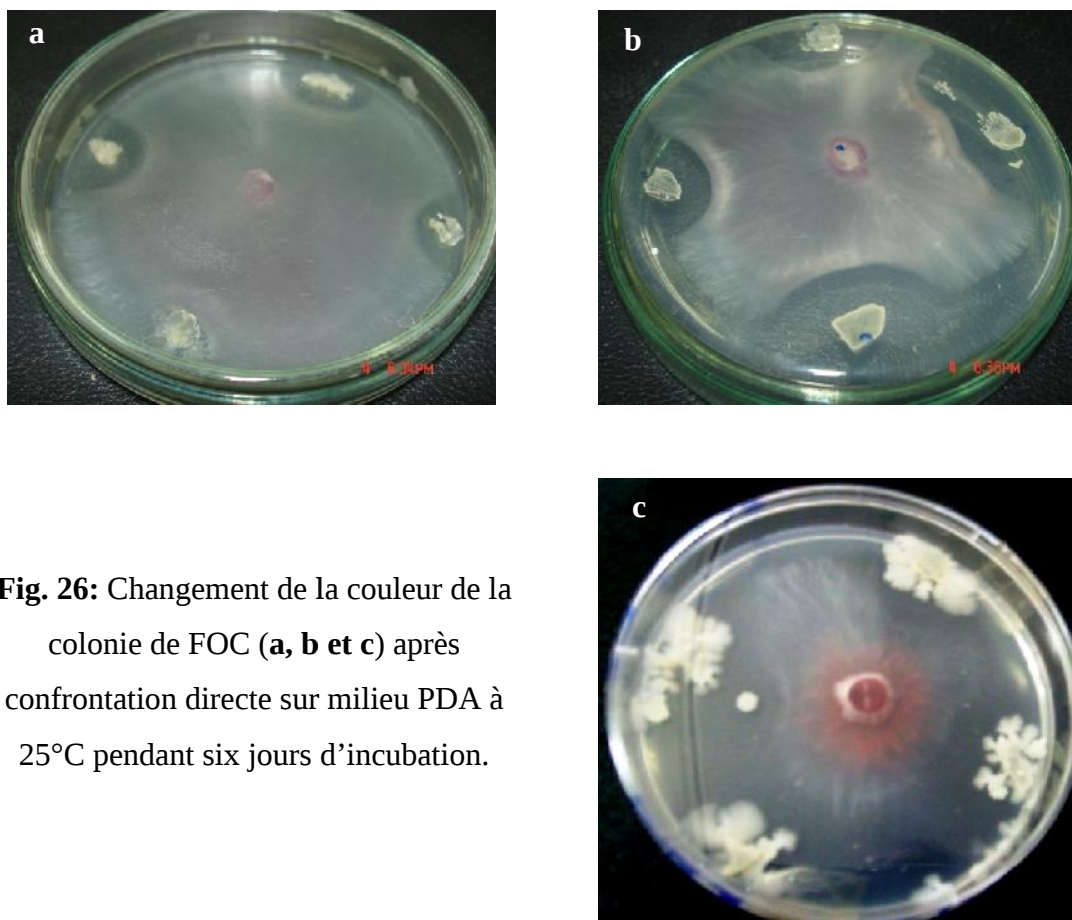


Fig. 26: Changement de la couleur de la colonie de FOC (a, b et c) après confrontation directe sur milieu PDA à 25°C pendant six jours d'incubation.

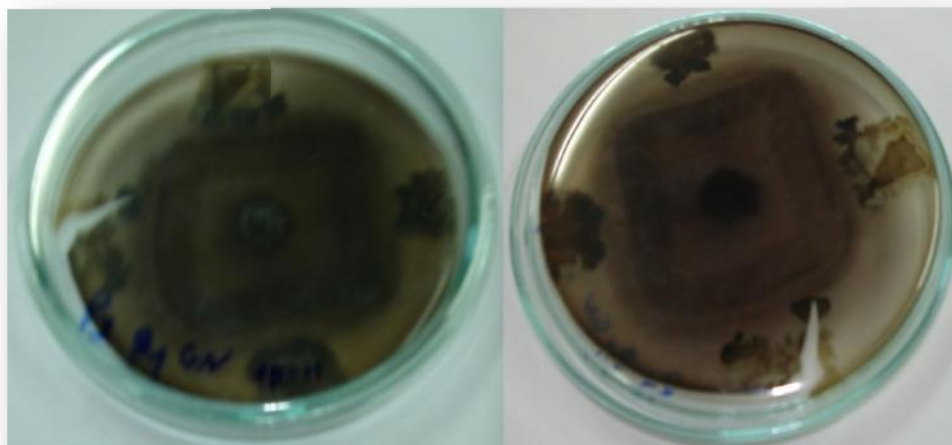


Fig. 27: La production de substances antifongiques diffusibles dans le milieu de culture PDA après confrontation directe (FOC-Rhizobactérie).

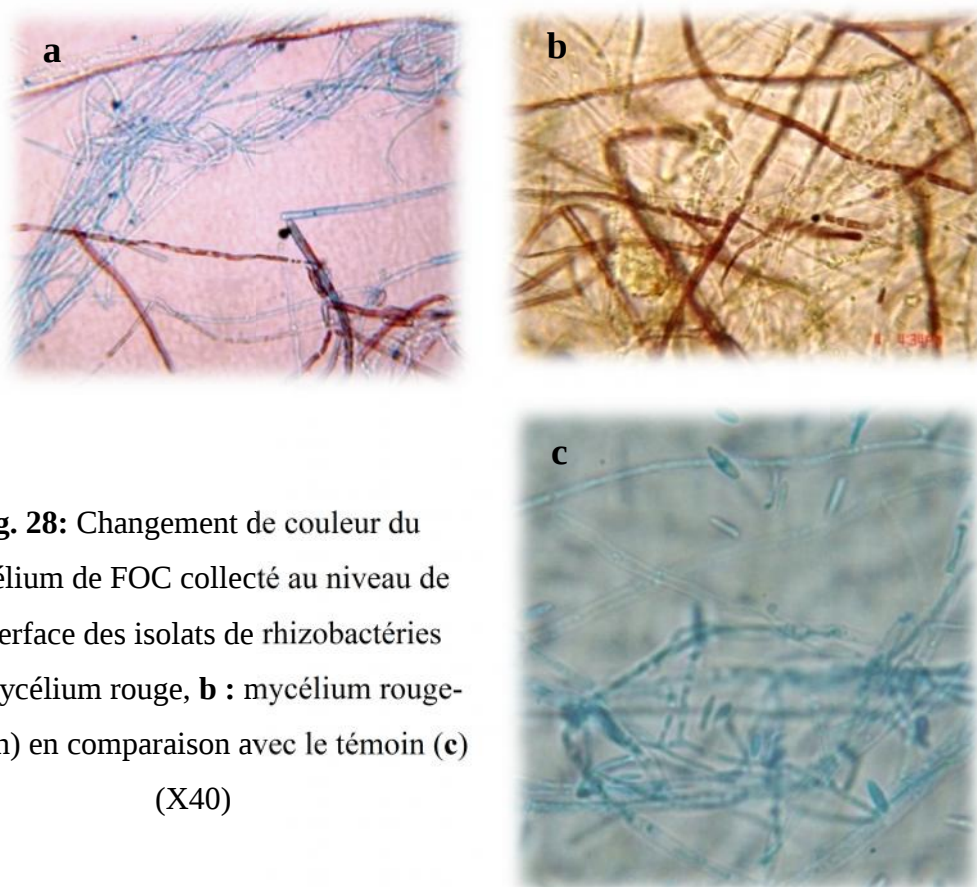


Fig. 28: Changement de couleur du mycélium de FOC collecté au niveau de l'interface des isolats de rhizobactéries (**a** : mycélium rouge, **b** : mycélium rouge-marron) en comparaison avec le témoin (**c**) (X40)

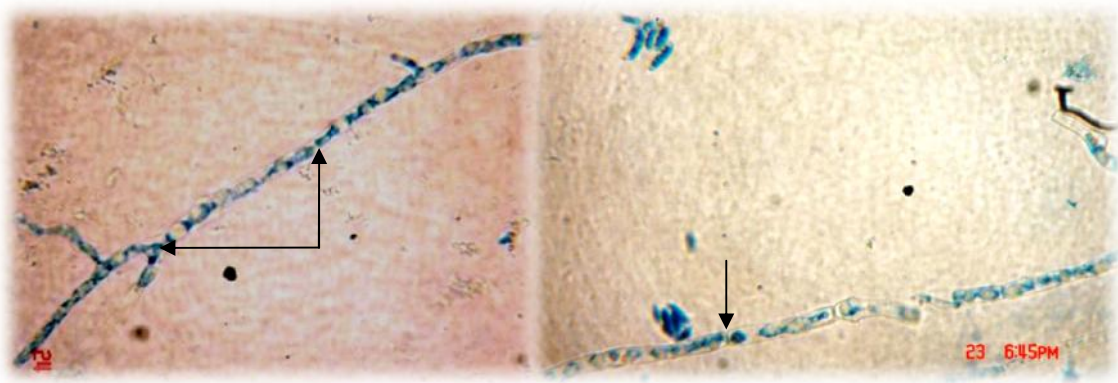


Fig. 29: Apparition de grandes vacuoles dans le mycélium de FOC (voir flèches) collecté au niveau de d'interface des isolats de rhizobactéries (X40)

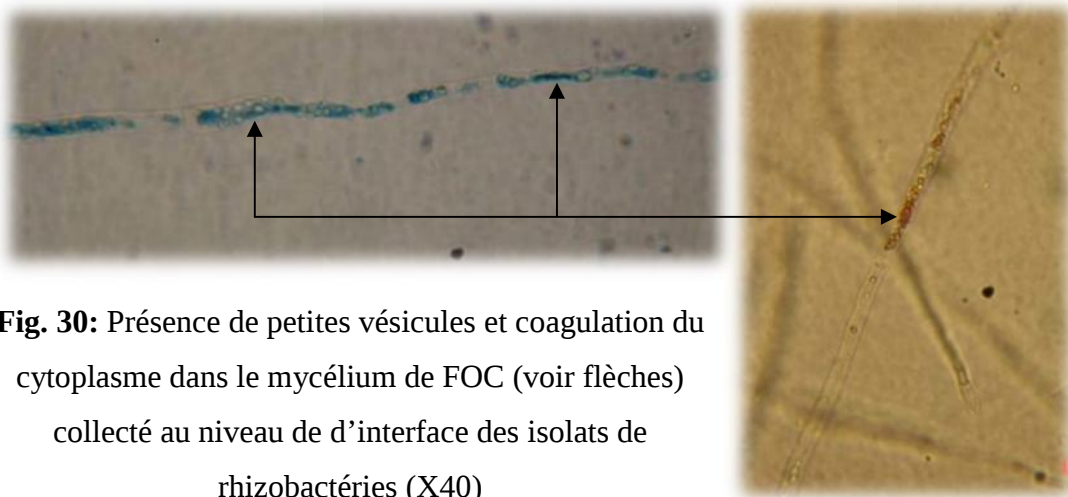


Fig. 30: Présence de petites vésicules et coagulation du cytoplasme dans le mycélium de FOC (voir flèches) collecté au niveau de d'interface des isolats de rhizobactéries (X40)

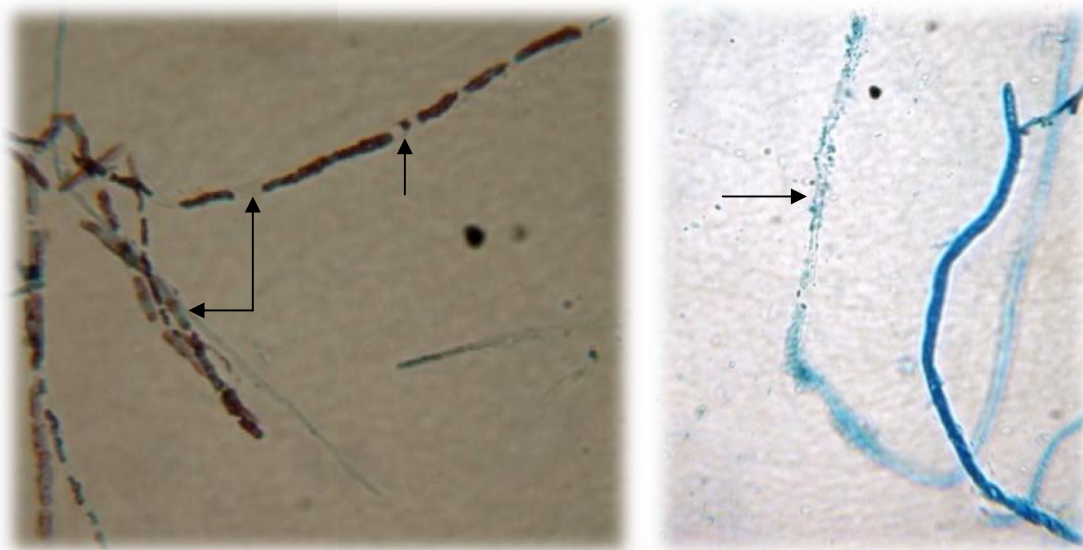


Fig. 31: Lyse et changement de couleur du mycélium de FOC (voir flèches) collecté au niveau de d'interface des isolats de rhizobactéries (X40)

2.3.2-Confrontation à distance sur milieu de culture entre les deux isolats de FOC et les rhizobactéries isolées

Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur à distance (substances antifongiques volatiles) de 29 rhizobactéries antagonistes exercées sur les isolats de FOC (FOC1 et FOC2) ; cet effet est évalué par la mesure des diamètres (mm) des colonies de ces deux derniers cultivés en présence ou en absence de l'antagoniste.

Après 6 jours de confrontation, les résultats obtenus montrent l'existence d'une nette réduction du diamètre des colonies par rapport au témoin (Figure 32).

Les cinq isolats Rb29, Rb6, Rb12, Rb4, et Rb15 sont les plus efficaces contre FOC1 et FOC2 avec un pourcentage d'inhibition varié de 33,33 à 44,68% et 37,20 à 45,74%, respectivement (Tableau 13, Figure 33 et Figure 34).

Cependant, les 20 isolats (Rb2, Rb3, Rb5, Rb7, Rb8, Rb9, Rb10, Rb13, Rb14, Rb16, Rb17, Rb18, Rb19, Rb20, Rb22, Rb23, Rb24, Rb25, Rb26 et Rb28) sont des rhizobactéries modérément efficaces avec un taux d'inhibition variable de 19,56 à 30,5%.

Tandis que les autres isolats (Rb27, Rb1, Rb11et Rb21) sont très peu actifs avec un très faible pourcentage d'inhibition de 14,11 à 18,33% pour FOC1 et de 14,28 à 19,04% pour FOC2.

Un changement de couleur du mycélium de FOC confronté à distance avec les rhizobactéries est aussi observé par rapport au témoin, ce qui correspond à la sécrétion des substances volatiles par ces dernières en présence du pathogène (Figure 32).

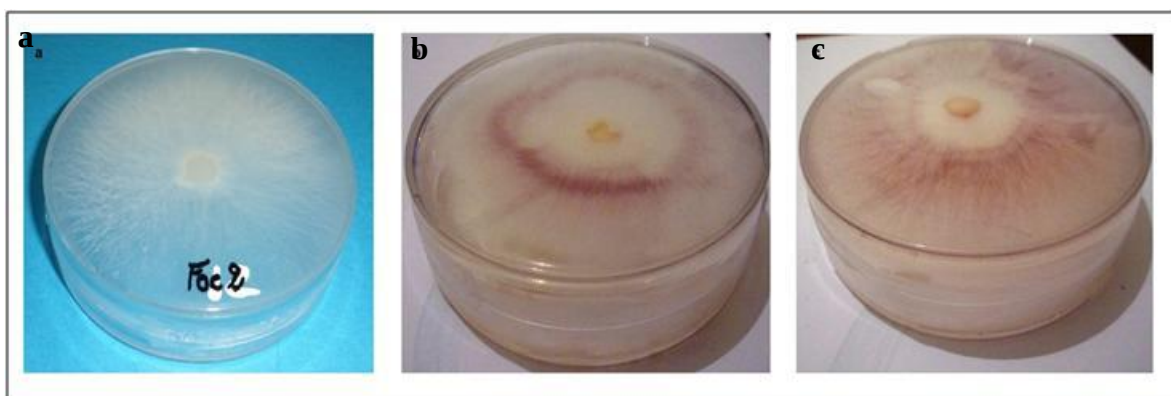


Fig. 32: Changement de l'aspect de la colonie de FOC2 (b et c) après confrontation à distance par rapport au témoin (a) sur milieu PDA à 25°C pendant six jours d'incubation.

Tableau 13: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* « FOC » par confrontation à distance avec les 29 rhizobactéries sélectionnées.

isolats de rhizob- actéries	Inhibition de la croissance mycélienne de FOC (%) *			Classe ^c
	confrontation à distance			
	FOC1 ^a	FOC2 ^a	Moyenne±ET	
Rb1	15,66	15,24	15,45 x ±0,21	1
Rb2	25,41	25,57	25,49 n±0,08	1
Rb3	28,56	28,67	28,62 h ±0,06	2
Rb4	33,33	37,20	35,27 e ±1,94	2
Rb5	21,66	22,84	22,25 r ±0,59	1
Rb6	44,68	45,74	45,21 a ±0,53	2
Rb7	19,99	20,33	20,16 t ±0,17	1
Rb8	26,66	26,74	26,70 k ±0,04	2
Rb9	28,89	29,60	29,24 g ±0,36	2
Rb10	26,66	26,87	26,77 j ±0,11	2
Rb11	16,67	17,10	16,88 w ±0,22	1
Rb12	40,00	42,90	41,45 c ±1,45	2
Rb13	20,34	20,66	20,50 s ±0,16	1
Rb14	28,61	28,60	28,60 h ±0,00	2
Rb15	43,00	43,33	43,17 b ±0,16	2
Rb16	19,56	20,23	19,89 u ±0,33	1
Rb17	21,66	22,85	22,26 r ±0,59	1
Rb18	22,33	22,84	22,59 r ±0,26	1
Rb19	21,88	22,85	22,37 r ±0,48	1
Rb20	25,88	26,65	26,27 l ±0,39	2
Rb21	18,33	19,04	18,69 v ±0,36	1
Rb22	30,48	30,50	30,49 f ±0,01	2
Rb23	22,44	23,82	23,13 q ±0,69	1
Rb24	24,94	25,71	25,32 o ±0,38	1
Rb25	23,33	23,90	23,61 p ±0,28	1
Rb26	24,67	26,59	25,63 m ±0,96	1
Rb27	14,11	14,28	14,19 y ±0,08	1
Rb28	26,66	27,50	27,08 i ±0,42	2
Rb29	36,66	40,00	38,33 d ±1,67	2

* Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* après 6 jours d'incubation.

^a les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

^b au niveau de chaque colonne les moyennes des valeurs suivies par différentes lettres sont significativement différentes au seuil ($P \leq 0,05$) (Annexe 4).

^c Inhibition de la croissance mycélienne a été évaluée selon une échelle de 0 à 3: 0 (pas d'inhibition), 1 (1-25%), 2 (26-50%) et 3 (51-75%).

ES : Erreur standard

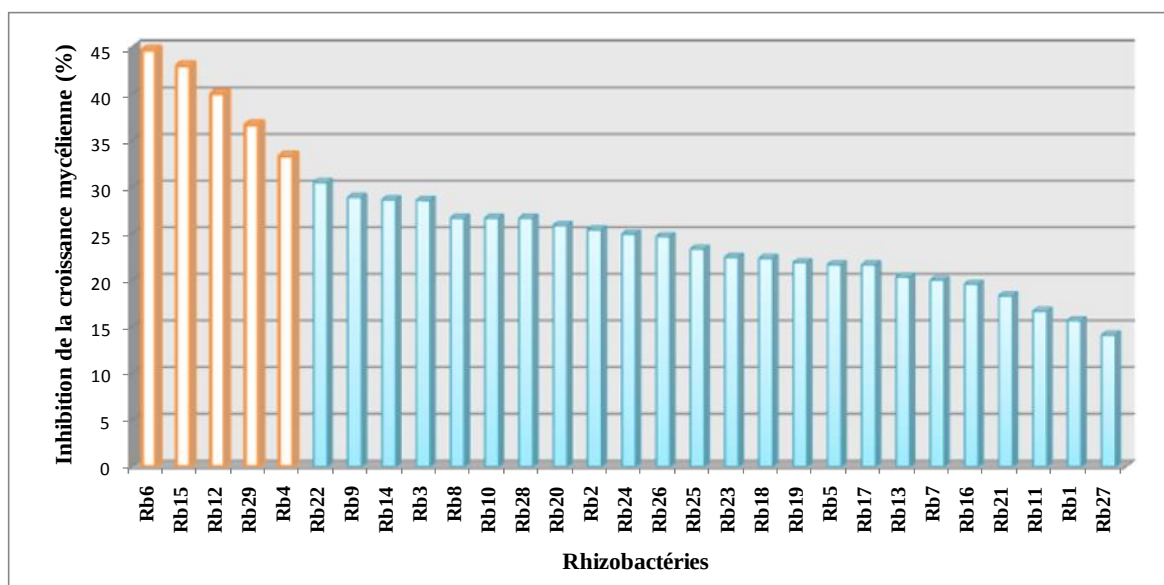


Fig. 33: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOC2 exercé à distance par les 29 rhizobactéries après six jours d'incubation à 25 °C

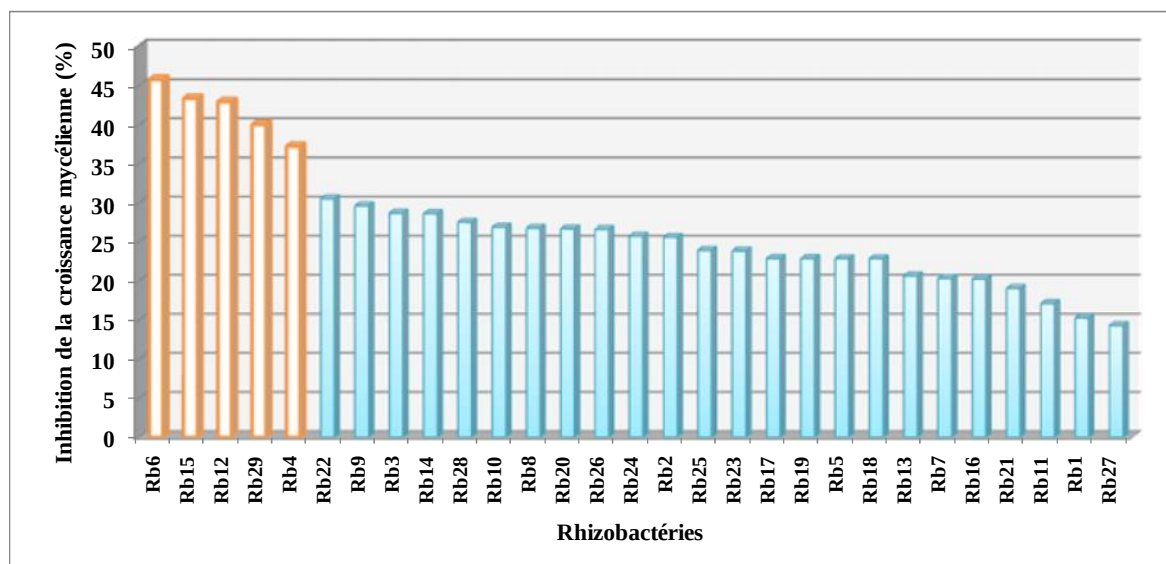


Fig. 34: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de FOC1 exercé à distance par les 29 rhizobactéries après six jours d'incubation à 25 °C.

2.4-Discussion

La rhizosphère des plantes est connue pour être une niche écologique privilégiée pour les différents types de micro-organismes du sol en raison de la disponibilité des nutriments riches. Les rhizo-dépôts stimulent et sélectionnent la communauté microbienne associée à la rhizosphère des plantes, où la communauté bactérienne est la plus influencée (Lynch, 1990). Naturellement, les plantes exercent une pression sélective sur les bactéries, leur fournissant une niche compatible, riche en source d'énergie et où les bactéries sélectionnées sont épargnées de toutes compétitions et protégées des stress environnementaux (Kleoppper et Beauchamp, 1992).

Cette étude consiste à isoler des rhizobactéries à partir des échantillons de sol rhizosphérique prélevé de différentes régions du nord-ouest et nord-est Algérien. L'isolement d'un plus grand nombre de bactéries à Mascara, Sidi Bel-Abbès, Mostaganem et Tlemcen par rapport aux autres régions d'isolement, laisse suggérer qu'il existerait un certain niveau de compatibilité ou sélection entre les bactéries autochtones présentes dans le sol rhizosphérique et les plantes de pois chiche. Ceci pourrait aussi être dû à la différence entre les exsudats racinaires que produit chaque plante, et qui déterminent la charge bactérienne présente dans la rhizosphère. En effet, la population de la rhizosphère est affectée par le génotype de la plante, car celui-ci influence sur la composition des exsudats racinaires.

La confrontation a eu lieu sur le milieu PDA. Ce dernier est performant pour l'étude de l'activité antagoniste «*in vitro*» (Swain et Ray, 2007) où les bactéries sont capables de croître sur ce milieu, également pour les espèces phytopathogènes, rendant ainsi la confrontation égale. Nos résultats sont intéressants par le fait qu'ils rendent compte du potentiel antifongique des rhizobactéries antagonistes très important.

Une collection de 29 rhizobactéries antagonistes, parmi les 131 isolées, a été obtenue suite à un criblage vis-à-vis FOC1 et FOC2. Karimi *et al.* (2012) ont signalé que parmi 232 bactéries isolées de la rhizosphère et de la racine de pois chiches, 12 isolats seulement, identifiés comme *Pseudomonas* et *Bacillus*, ont montré un effet antagoniste contre *F. oxysporum* f.sp. *ciceris in vitro*. et ont été sélectionnés pour des essais *in vivo*.

Plusieurs études révèlent que les *Bacillus* sont abondants dans la rhizosphère de pois chiche et idéales pour une utilisation en lutte biologique (Wani *et al.*, 2007; Moradi *et al.*, 2012 ; Karimi *et al.*, 2012; Patil *et al.*, 2015). Cependant, *Bacillus* spp. peut avoir des

caractéristiques de tolérance thermique élevée par la formation des endospores (Shoda, 2000).

De nombreuses espèces de *Bacillus* y compris *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* sont connues pour leur pouvoir antagoniste et inhibiteur de la croissance mycélienne de plusieurs champignons phytopathogènes tels que *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Pythium* et *Phytophthora* (Fiddman et Rossall, 1994).

Nos 29 isolats ont démontré une activité antagoniste contre FOC1 et FOC2 en réduisant la croissance mycélienne de 25,63% à 71,11% par confrontation directe et de 14,11% à 45,74% à distance. Cette activité peut être argumentée par la production de métabolites secondaires. Il a été rapporté que *Bacillus* spp. peut contenir diverses caractéristiques de lutte biologique, y compris la production des métabolites secondaires antifongiques (Schmidt *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2001).

Plusieurs travaux ont également démontré le rôle de rhizobactéries dans l'inhibition de FOC et les mécanismes avec lesquels ils provoquent l'effet bénéfique (Landa *et al.*, 1997; Dileep Kumar, 1999 ; Landa *et al.*, 2004 ; Karimi *et al.*, 2012). Plusieurs espèces de *Bacillus* sont connues pour produire des métabolites antifongiques qui sont inhibiteurs de la croissance des champignons phytopathogènes (Gardener, 2004).

Une modification de couleur du mycélium et de l'aspect microscopique du FOC confronté aux isolats antagonistes testés a été observée. Nos résultats sont en accord avec des observations antérieures, de plusieurs sections des hyphes, qui présentaient différents niveaux de désorganisation cellulaire et d'une désintégration de cytoplasme, à la suite du traitement avec l'agent de lutte biologique (Masih *et al.*, 2000). Des résultats similaires ont été rapportés par El hassni *et al.* (2007), Idris *et al.* (2007) et Dihazi (2012) qui fait état d'une modification de l'aspect du mycélium fongique due à la production de métabolites secondaires antifongiques.

Ceci suggère que le mycélium fongique pourrait être inhibé non seulement par antibiose mais aussi par d'autres métabolites antifongiques comme les sidérophores, ions d'hydrogène et des produits gazeux, y compris l'éthylène, le cyanure d'hydrogène et d'ammoniac (Williams et Asher, 1996). En outre, l'efficacité d'un agent de contrôle biologique donne des résultats pour la plupart, non seulement d'un mécanisme unique, mais d'une combinaison de différents modes d'actions (Alabouvette *et al.*, 1993).

Les substances volatiles produites par les antagonistes pourraient diffuser facilement et inhiber la croissance de l'agent pathogène *in vitro* et même dans le sol, elles diffusent facilement à travers les pores du sol et inhibent les pathogènes (Wheatley, 2002).

Bacillus subtilis G₈ isolée à partir du sol en Chine, produit des composés volatiles antifongiques. Ces composés volatiles détectées comprennent des alkyles, les alcools, les esters, les cétones, les acides, les amines, les phénols et des composés hétérocycliques (Liu *et al.*, 2008).

2.5- Conclusion

Cette étude a consisté à isoler des rhizobactéries à partir des échantillons des sols rhizosphériques prélevés de différentes régions du nord ouest et nord est Algérien. Cette étude a conduit également à la sélection de 29 rhizobactéries antagonistes contre FOC agent causal du flétrissement vasculaire de pois chiche. Les notations effectuées, après une confrontation directe et à distance, montrent que l'ensemble des isolats testés ont exercé un effet inhibiteur significatif sur les deux isolats phytopathogènes : FOC1 et FOC2. Ces 29 isolats peuvent constituer de ce fait une collection de microorganismes antagonistes qui pourraient être des concurrents rhizosphériques.

Ces résultats sont intéressants par le fait qu'ils rendent compte du potentiel antifongique très important des 29 rhizobactéries de pois chiche. Une caractérisation approfondie *in vitro* de ces isolats a été menée dans le but de mesurer leurs activités favorisant la croissance des plantes.

Partie III : Résultat et discussion

Chapitre 3 : **Caractérisation des rhizobactéries antagonistes**

Chapitre 3 : Caractérisation des rhizobactéries antagonistes

3.1- Introduction

Les bactéries issues de la rhizosphère qualifiées de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) sont capables de favoriser et stimuler la croissance de certaines plantes et de les protéger vis-à-vis de nombreux organismes pathogènes. Cette protection et stimulation de la croissance des plantes impliquerait des mécanismes d'action directs et indirects.

Des PGPR appartenant au genre *Bacillus* peuvent exercer un effet direct sur la croissance des plantes par la production de phytohormones telles que les auxines (AIA) et la solubilisation des phosphates inorganiques (Richardson, 2001).

La promotion indirecte de la croissance des plantes se produit lorsque les PGPR limitent ou diminuent les effets dommageables d'un ou plusieurs organismes phytopathogènes. Cette action est appelée antibiose et peut être soit en raison de l'épuisement d'une ressource nutritive, requis par l'agent pathogène, ou par la production et la libération d'un composé qui empêche la croissance de l'agent phytopathogène (Smitha *et al.*, 2015). Les mécanismes indirects utilisés par les PGPR peuvent être la synthèse de l'acide cyanhydrique (HCN) qui inhibe la croissance de champignons phytopathogènes (Dowling et O'Gara, 1994) et la synthèse des enzymes capables d'hydrolyser les parois cellulaires fongiques (Aktuganov *et al.*, 2007).

Le but principal de ce chapitre est de déterminer la réponse des bactéries isolées aux différents tests mettant en évidence la capacité de production de métabolites qui auraient un impact bénéfique sur la croissance des plantes et néfaste sur la croissance (développement) du pathogène. Différentes activités PGP sont testées qui ayant un rôle de biofertilisation (la solubilisation des phosphates) et considérées comme biostimulatrices (la production des phytohormones, principalement l'AIA) ainsi que celles ayant des activités de biocontrôle protégeant les plantes des phytopathogènes (la production de composés volatiles comme l'HCN et la synthèse de substances antifongiques inhibant la croissance des pathogènes telles les chitinases). Cette caractérisation permettra par la suite la sélection et le choix des isolats les plus performants et qui sont à la fois des agents antagonistes contre FOC, biostimulateurs de pois chiche et biofertilisateurs, ainsi que de rechercher des associations possibles entre tous les paramètres étudiés.

3.2- Solubilisation de phosphate

3.2.1- Solubilisation de phosphate en milieu solide et liquide

Les 29 rhizobactéries sélectionnées ont été testées pour leur capacité de solubiliser le phosphate (P) inorganique sur un milieu solide Pikovasky (PVK) additionné de bleu de bromophénol et contenant le phosphate tricalcique $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$ comme seule source de P. Après 7 jours d'incubation à 28°C, vingt-deux (22) isolats ont produit une zone claire autour de la colonie (Figure 35). Ce test a montré que 75% des rhizobactéries du pois chiche étaient capables de solubiliser le P inorganique sous forme tricalcique.

Le calcul de l'indice de solubilisation (IS) permet d'évaluer le pouvoir solubilisateur d'une rhizobactérie et d'établir une comparaison entre les isolats testés (Tableau14). Un effet très significatif ($P < 0.01$) de solubilisation sur milieu PVK solide existe (Annexe 5). Les six isolats Rb (4, 7, 10, 12, 16 et 29) sont révélés très efficaces par rapport aux autres avec IS variant de 2 à 3,43 (Tableau14). Les 16 isolats Rb (1, 2, 3, 5, 6, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 26, 27 et 28) solubilisent modérément le P et leurs IS varient de 1,20 à 1,92. Par contre, sept isolats Rb (8, 9, 11, 21, 23, 24 et 25) n'ont aucune activité, le halo est absent.

Sur le milieu PVK liquide additionné de $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$, 23 isolats ont solubilisé le P (Figure 36). La quantité de P soluble déterminée après 7 jours d'incubation à 30°C varie de 25,5 à 52,44 $\mu\text{g/ml}$. Un effet très significatif ($P < 0.01$) de solubilisation des P sur milieu PVK liquide est existant (Annexe 5). La concentration maximale de P soluble est observée chez la Rb26 (52,44 $\mu\text{g/ml}$), la Rb4 (48,85 $\mu\text{g/ml}$) et la RB7 (45,97 $\mu\text{g/ml}$). Une concentration minimale de 25,50 $\mu\text{g/ml}$ a été enregistrée chez les deux isolats Rb11 et Rb22.

Les résultats obtenus ont révélé une acidification de milieu de culture PVK liquide sachant que le pH du milieu au départ a été ajusté à 7. Une diminution du pH après 7 jours d'incubation a été observée chez l'ensemble des isolats (Figure 37). Les valeurs de pH varient de 4,54 à 5,76. La plus faible valeur est déterminée chez l'isolat Rb15 (4,54). Le pH le plus élevé est observé chez Rb11 (5,76).

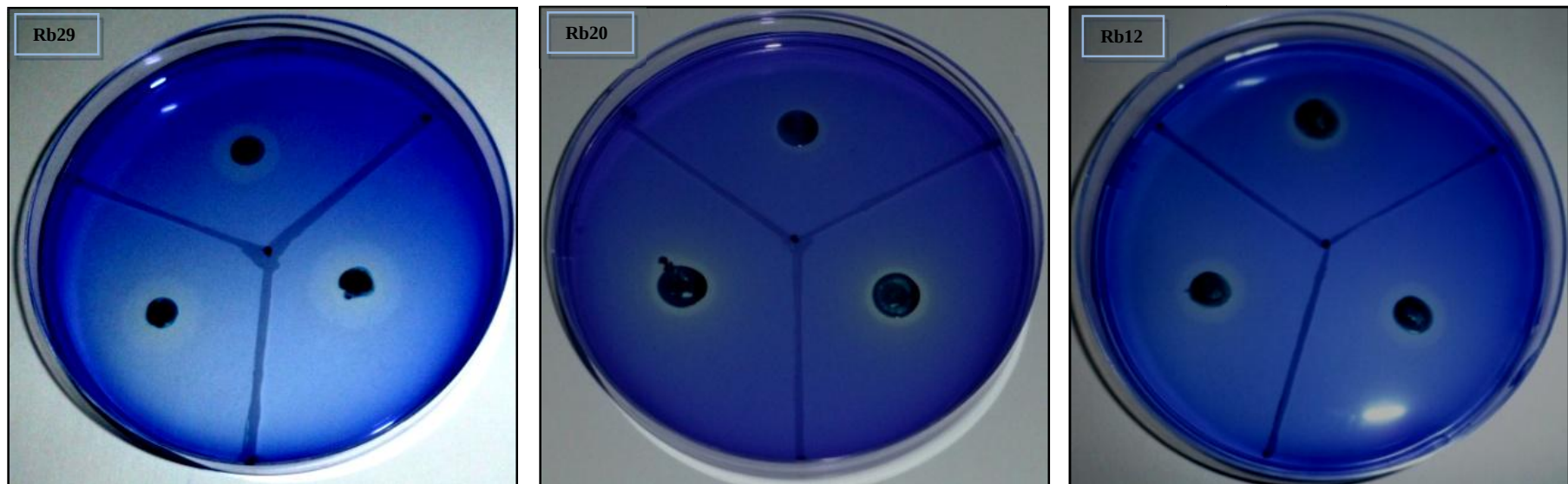


Fig. 35: Halo de transparence autour des colonies bactériennes de Rb29, Rb20 et Rb12 caractéristique de la solubilisation de P sur milieu PVK additionné de bleu de bromophénol après 7 jours d'incubation à 28°C

Tableau 14: Indice de solubilisation de P par les rhizobactéries antagonistes

Isolats	Solubilisation de P en milieu Solide		
	Ø halo + colonie (cm)	Ø colonie (cm)	IS solubilisation de P (Ø halo+colonie/ Ø colonie)
Rb1	1,63	1,26	1,29
Rb2	1,65	0,86	1,92
Rb3	1,03	0,7	1,47
Rb4	1,68	0,66	2,54
Rb5	1,1	0,7	1,59
Rb6	1,1	0,6	1,83
Rb7	0,73	0,36	2
Rb8	-	0,65	0
Rb9	-	0,55	0
Rb10	1,23	0,6	2,04
Rb11	-	0,8	0
Rb12	1,4	0,66	2,12
Rb13	0,96	0,56	1,71
Rb14	1,76	1,46	1,20
Rb15	1,18	0,76	1,58
Rb16	1,2	0,35	3,43
Rb17	1,43	0,83	1,73
Rb18	0,9	0,6	1,5
Rb19	1,33	0,86	1,54
Rb20	1,3	0,81	1,59
Rb21	-	-	0
Rb22	1,1	0,9	1,22
Rb23	-	-	0
Rb24	-	-	0
Rb25	-	-	0
Rb26	0,95	0,63	1,51
Rb27	0,96	0,66	1,45
Rb28	1,3	0,93	1,40
Rb29	1,66	0,6	2,77

3.2.2- Corrélation entre la concentration de P soluble et le pH, entre la solubilisation de P dans le milieu PVK solide et liquide.

L'analyse des résultats effectués entre la quantité de P solubilisé et le pH du milieu PVK liquide révèle une corrélation positive ($r=0,890$). L'analyse de la corrélation montre que la solubilisation des P est associée à une baisse du pH du milieu (Annexe 5).

L'analyse de la corrélation entre la solubilisation de P sur PVK solide et liquide n'est pas significative pour l'ensemble des isolats.

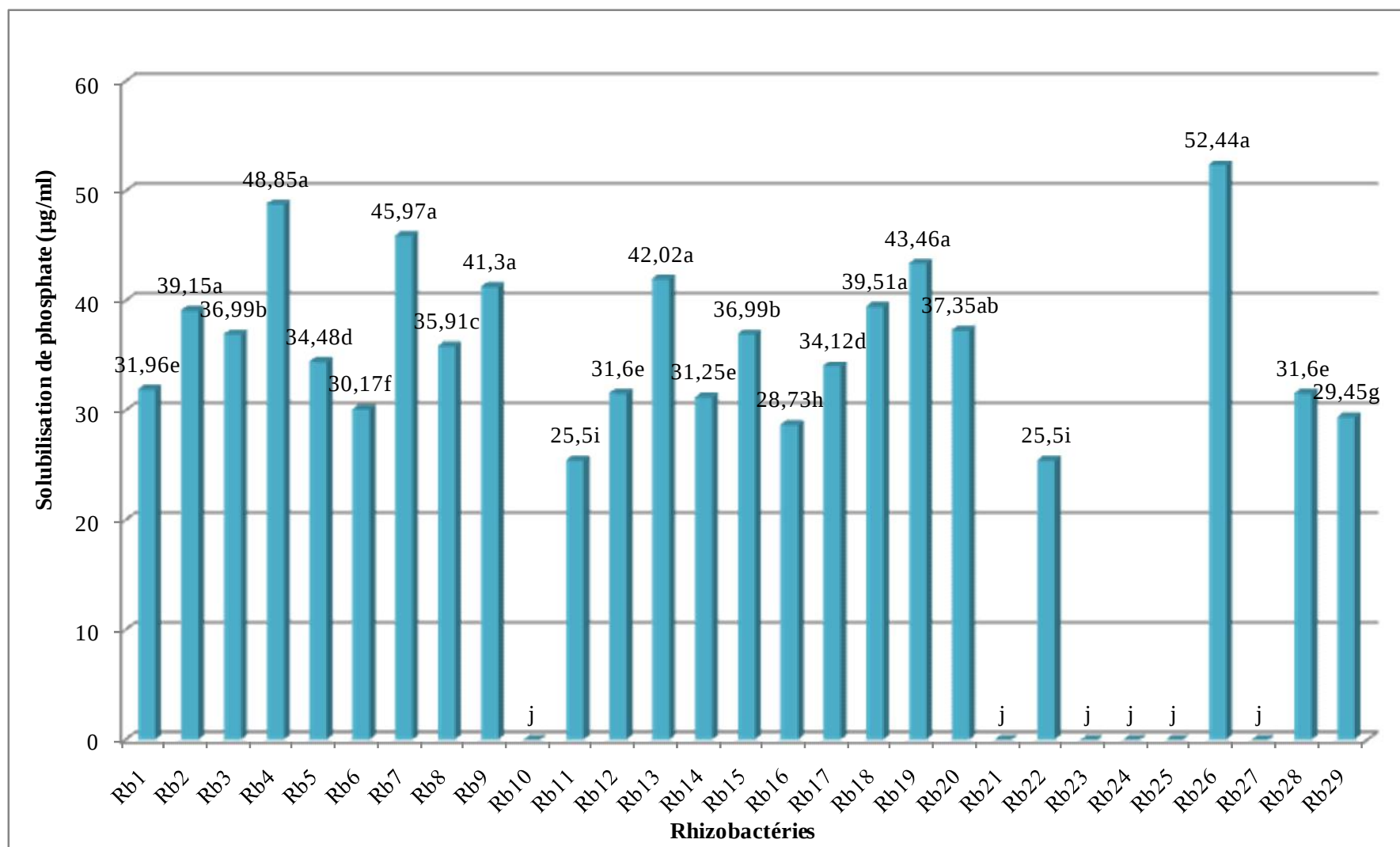


Fig. 36 : Solubilisation de P (µg/ml) sur milieu PVK liquide par les rhizobactéries antagonistes

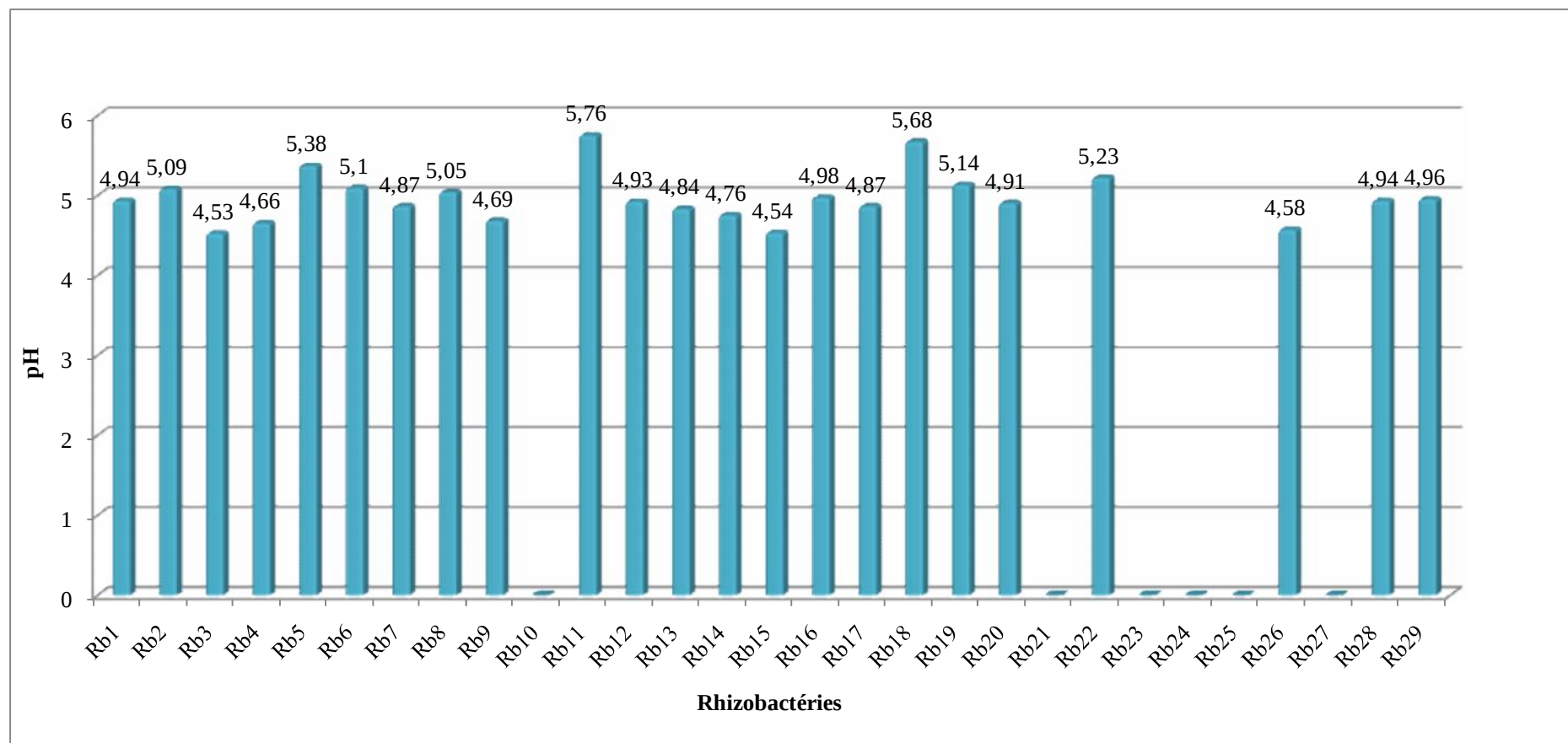


Fig. 37 : Valeurs de pH en milieu PVK liquide

3.3- Production d'acide cyanhydrique (HCN)

Parmi les isolats testés, dix rhizobactéries antagonistes vis-à-vis de FOC soit (34,48%) sont productrices d'acide cyanhydrique (Tableau15). Cette production est variable selon les isolats testés. Après 48h d'incubation, un léger virage du papier filtre imprégné d'acide picrique a été observé chez ces isolats pour ensuite devenir net entre 72 à 96 h. Ce résultat témoigne que la production s'intensifie après 72h d'incubation suite au virage du papier filtre, qui pour certains isolats devient presque marron rougeâtre par rapport au témoin (Figure 38).

Il est à noter que la production d'HCN est faible chez l'isolat Rb26, alors que cette production est modérée chez Rb (14 et 28), avec un virement de couleur du papier filtre vers le marron foncé (Tableau15, Figure 38). En revanche, chez Rb (4, 6, 9, 12, 15, 22 et 29), la production est plus importante (Tableau15, Figure 38). Ce résultat laisse supposer que ces rhizobactéries antagonistes semblent être les plus performantes en production d'HCN.

3.4- Production d'Acide-Indole-acétique (AIA)

3.4.1- Production qualitative d'AIA en Luria-Bertani solide additionné de tryptophane

La production d'AIA et/ou de ses composés apparentés a été observée chez l'ensemble des isolats testés (Tableau16). Les isolats producteurs de ces métabolites ont développé une coloration rose/rouge à la suite de l'addition du réactif révélateur (Salkowski) après 20mn d'incubation (Figure 39). Par contre, aucune coloration n'a été développée par Rb7, Rb8, Rb10, Rb21, Rb23, Rb24, Rb25 et Rb27 et par conséquent, ce résultat laisse supposer que ces rhizobactéries antagonistes n'ont pas la capacité de produire l'AIA en Luria-Bertani solide additionné de tryptophane.

Tableau 15: Production d'HCN par les rhizobactéries antagonistes.

Isolats	Classe	Production* d'HCN
Rb1	HCN ⁻	-
Rb2	HCN ⁻	-
Rb3	HCN ⁻	-
Rb4	HCN ⁺	+++
Rb5	HCN ⁻	-
Rb6	HCN ⁺	+++
Rb7	HCN ⁻	-
Rb8	HCN ⁻	-
Rb9	HCN ⁺	+++
Rb10	HCN ⁻	-
Rb11	HCN ⁻	-
Rb12	HCN ⁺	+++
Rb13	HCN ⁻	-
Rb14	HCN ⁺	++
Rb15	HCN ⁺	+++
Rb16	HCN ⁻	-
Rb17	HCN ⁻	-
Rb18	HCN ⁻	-
Rb19	HCN ⁻	-
Rb20	HCN ⁻	-
Rb21	HCN ⁻	-
Rb22	HCN ⁺	+++
Rb23	HCN ⁻	-
Rb24	HCN ⁻	-
Rb25	HCN ⁻	-
Rb26	HCN ⁺	+
Rb27	HCN ⁻	-
Rb28	HCN ⁺	++
Rb29	HCN ⁺	+++

*(-: pas de production, +: faible, ++ : modérée, +++ : forte)

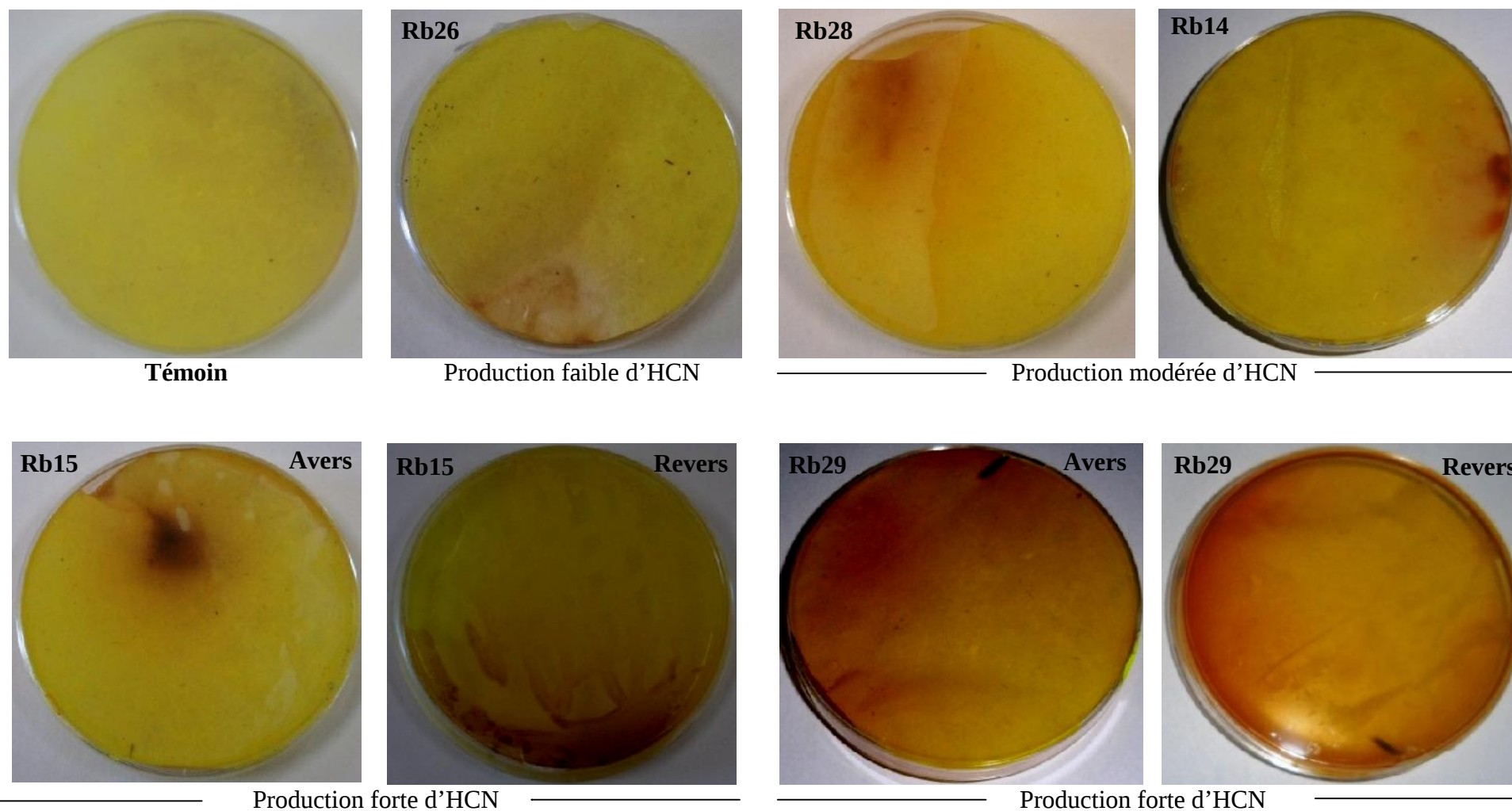


Fig. 38 : Production d'HCN par les rhizobactéries antagonistes en comparaison avec le témoin après 05 jours d'incubation à 28°C.

Tableau 16: Production d'AIA en présence de tryptophane.

Isolats	Classe	Production* d'AIA
Rb1	AIA ⁺	+
Rb2	AIA ⁺	+
Rb3	AIA ⁺	++
Rb4	AIA ⁺	++++
Rb5	AIA ⁺	++++
Rb6	AIA ⁺	++
Rb7	AIA ⁻	-
Rb8	AIA ⁻	-
Rb9	AIA ⁺	++++
Rb10	AIA ⁻	-
Rb11	AIA ⁺	+
Rb12	AIA ⁺	+
Rb13	AIA ⁺	+
Rb14	AIA ⁺	+
Rb15	AIA ⁺	+++
Rb16	AIA ⁺	+++
Rb17	AIA ⁺	++
Rb18	AIA ⁺	+++
Rb19	AIA ⁺	+
Rb20	AIA ⁺	++++
Rb21	AIA ⁻	-
Rb22	AIA ⁺	++
Rb23	AIA ⁻	-
Rb24	AIA ⁻	-
Rb25	AIA ⁻	-
Rb26	AIA ⁺	+
Rb27	AIA ⁻	-
Rb28	AIA ⁺	+++
Rb29	AIA ⁺	++

* (- : absence de coloration rose, + : légèrement rose, ++ : rose, +++ : rose virant vers le rouge, ++++ : rouge)

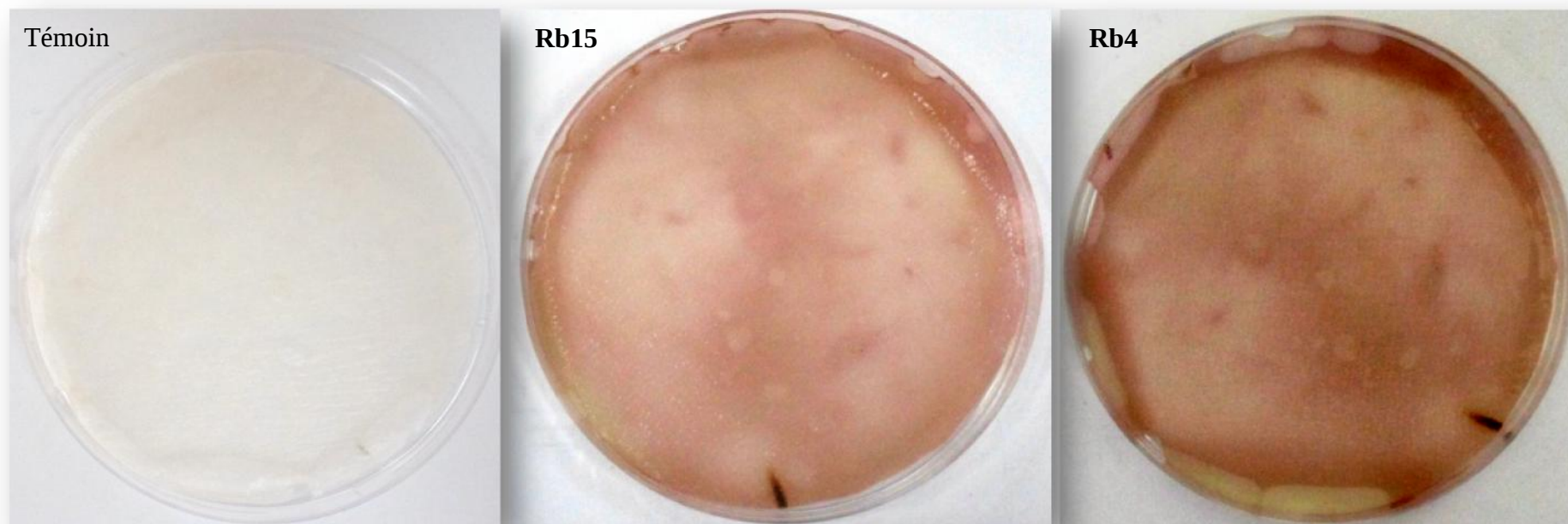


Fig. 39 : Production d'AIA sur le milieu solide Luria-Bertani additionné de tryptophane
Après 3 jours d'incubation à 30°C

3.4.2- Production quantitative d'AIA en Luria-Bertani liquide additionné de tryptophane

La capacité de production de l'AIA est testée sur le milieu liquide de Luria-Bertani additionné de tryptophane (5 g/l) après incubation pendant 96 h à 30°C. L'intensité de la couleur rose-rouge est proportionnelle à la concentration de l'AIA (Figure 40). Les isolats de rhizobactéries ont des taux de production très variables (Figure 41). Ces variations s'étendent de 4 µg/ml à 326,8 µg/ml. Les quatre isolats ayant un maximum de production sont dans l'ordre : Rb9 (326,8 µg/ml), Rb5 (257,6 µg/ml), Rb20 (172 µg/ml) et Rb4 (126,4 µg/ml), les quatre isolats en produisent des quantités supérieures de 50 µg/ml d'AIA sont dans l'ordre : Rb16 (50,2 µg/ml), Rb28 (53,2 µg/ml), Rb15 (64,8 µg/ml) et Rb18 (71,8 µg/ml), le reste d'isolats en produisent des quantités inférieures de 50 µg/ml d'AIA sont dans l'ordre : Rb (1,13, 19, 2, 12, 11, 14, 26, 3, 29, 22, 17 et 6) affichent des valeurs allant de 4 µg/ml à 46 µg/ml; par contre, les mêmes huit isolats Rb (7, 8, 10, 21, 23, 24, 25 et 27) n'ont pas aussi la capacité de produire l'AIA en milieu Luria-Bertani liquide additionné de tryptophane. L'analyse de la variance révèle un effet significatif à $P < 0.01$ (Annexe 5) de la production de l'AIA en milieu liquide.

3.4.3- Corrélation entre la production d'AIA en milieu Luria-Bertani solide et liquide additionné de tryptophane

L'analyse de la corrélation entre la production d'AIA en milieu Luria-Bertani solide et liquide additionné de tryptophane est significative pour l'ensemble des isolats à 5% (Annexe 5). Cette analyse montre que, les huit isolats Rb (7, 8, 10, 21, 23, 24, 25 et 27) n'ont pas la capacité de produire l'AIA en milieu Luria-Bertani solide et liquide additionné de tryptophane.

3.5- Production d'enzymes

Concernant les enzymes étudiées, on a noté une absence totale de production de cellulases, cependant, les enzymes dégradant les parois cellulaires fongiques telles les chitinases (Figure 42) sont produites par huit isolats : Rb2, Rb3, Rb4, Rb6, Rb15, Rb16, Rb22 et Rb28. La formation d'halos clairs autour des colonies de rhizobactéries indique une chitinase positive (Figure 42).

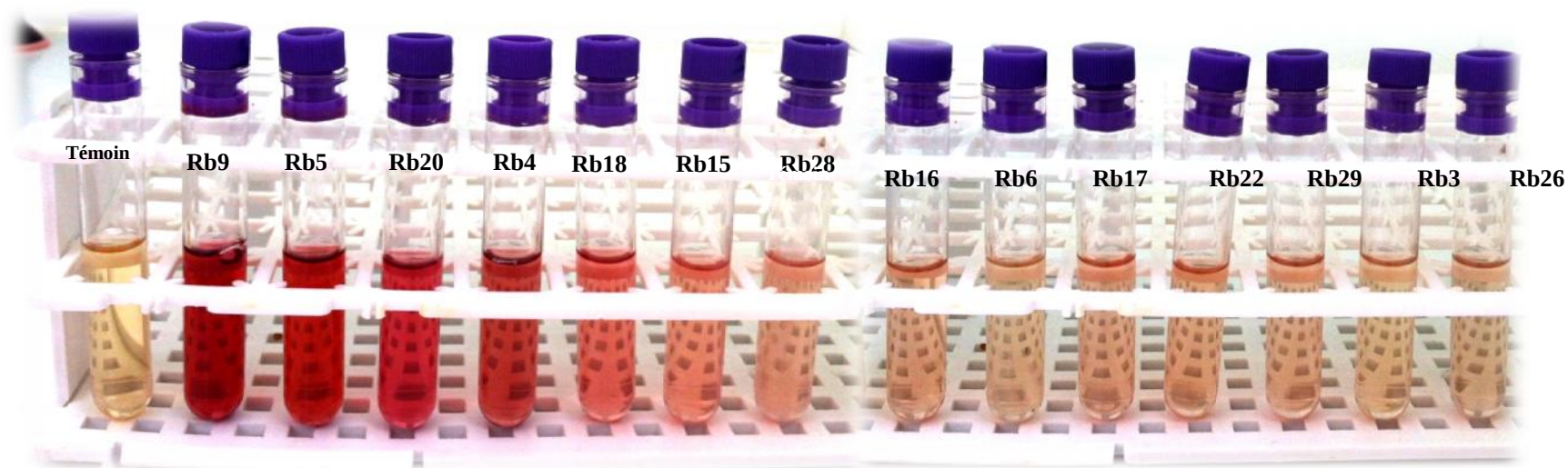


Fig. 40: Production d'AIA sur le milieu liquide Luria-Bertani additionné de tryptophane.

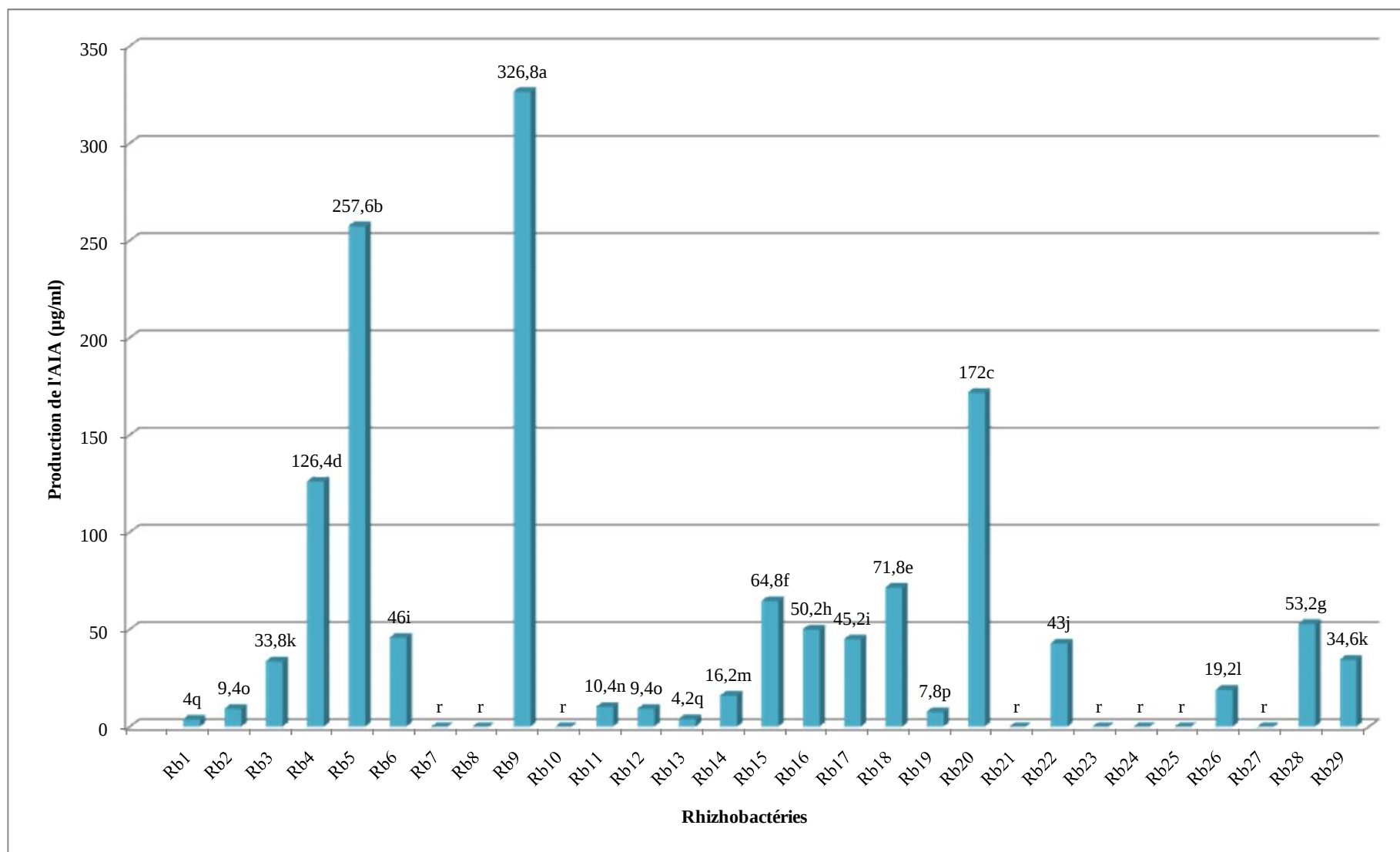


Fig. 41: Production de l'AIA (µg/ml) sur le milieu liquide de Luria-Bertani additionné de tryptophane

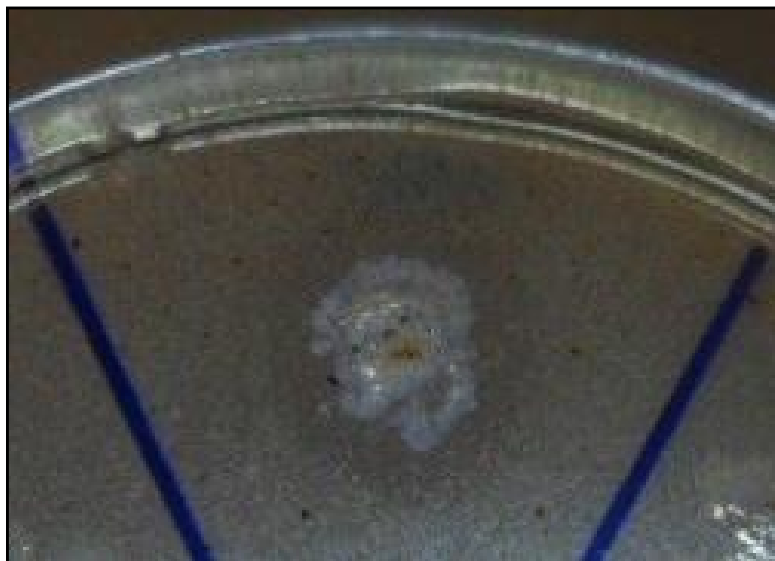


Fig. 42: La formation d'halos clairs autour des colonies par l'isolat Rb4 sur le milieu M9 supplémentée de la chitine après 5 jours d'incubation à 30° C.

3.6- Interaction entre les différentes activités étudiées

Le Tableau17, présente une matrice de corrélation entre l'ensemble des activités étudiées (activité antagoniste par confrontation directe et à distance, la solubilisation de P sur milieu solide et liquide, la production d' HCN, la production d'AIA sur milieu solide et liquide et la production de l'enzyme chitinase).

L'analyse de la corrélation de ces paramètres étudiés fait ressortir 4 corrélations positives hautement significatives (Tableau17) :

- Une 1^{ière} corrélation est observée entre la confrontation directe et celle à distance ($r=0,66$). Les deux techniques de confrontations ont mis en évidence l'activité antagoniste des isolats étudiés.
- La 2^{ième} et la 3^{ième} corrélation sont relevées entre la production d'HCN et l'activité antagoniste par confrontation directe ($r=0,64$) et à distance ($r=0,82$). Compte tenu de ces résultats, l'HCN peut être utilisé comme un indice de caractérisation des isolats antagonistes contre le FOC par les deux méthodes de confrontations.
- La 4^{ième} corrélation positive existe entre la production d'AIA en milieu liquide et solide ($r=0,80$).

Cependant, aucune corrélation n'existe entre les autres activités.

Tableau17: Matrice de corrélation calculée sur 8 paramètres étudiés.

	CD	C à D	S.P ML	S.P MS	HCN	AIA MS	AIA ML	Chitinases
CD	1							
C à D	0,667	1						
S.P ML	0,409	0,236	1					
S.P MS	0,320	0,276	0,427	1				
HCN	0,641	0,824	0,269	0,224	1			
AIA MS	0,294	0,329	0,541	0,375	0,420	1		
AIA ML	0,067	0,159	0,341	0,010	0,291	0,808	1	
Chitinases	0,115	0,438	0,231	0,389	0,406	0,409	0,038	1

CD : confrontation directe, C à D : confrontation à distance, S.P ML : solubilisation du phosphate en milieu liquide, S.P MS : solubilisation du phosphate en milieu solide, HCN : acide cyanidrique, AIA MS : acide indole acétique en milieu solide, AIA ML : acide indole acétique en milieu liquide.

La synthèse de données numériques sur le Tableau17 a été effectuée par une analyse des composantes principales (ACP) qui a mis en évidence la corrélation entre les différents paramètres, projetée sur la figure 43. Les axes 2 et 3 du graphe, présentent 18,72 et 13,85% d'information respectivement. L'axe 1 a été ignoré vue qu'il isole tous les variables sur le côté négatif (Annexe 5). Il ne permet pas de discriminer significativement les variables.

La représentation graphique des données a confirmé les corrélations soulevées sur le Tableau17.

L'ACP basée sur la matrice obtenue est utilisée pour comparer les activités PGP exprimées par les différentes rhizobactéries antagonistes (Figure 43).

L'analyse des données permet de mettre en évidence une corrélation positive entre confrontation directe et confrontation à distance (axes presque confondus) et entre la production d'HCN et la confrontation à distance. Cette analyse nous a permis aussi de mettre en évidence une corrélation positive entre la production d'AIA en milieu liquide et solide. Cependant, aucune corrélation n'existe entre les autres activités (axes formant des angles droits).

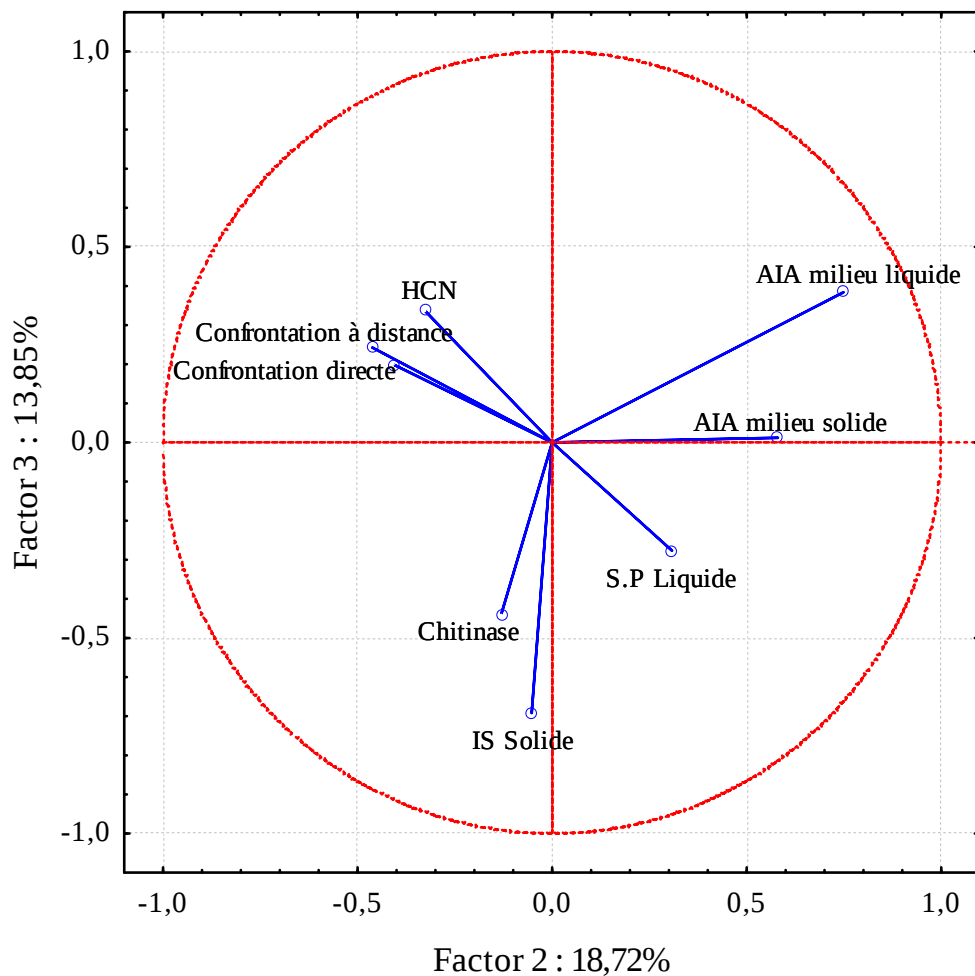


Fig. 43: Cercle de corrélation de l'ACP des différentes activités étudiées exprimées par les rhizobactéries de pois chiche.

3.7- Classification et répartition des rhizobactéries suivant les activités étudiées

3.7.1- Classification hiérarchique

Nous avons utilisé une répartition en classes des rhizobactéries (dendrogramme), aussi appelée : classification hiérarchique basée sur l'algorithme de Ward (Jongman *et al.*, 1995, Saporata, 1990-2000), qui calcule les distances mathématiques (distances euclidiennes) entre les points des rhizobactéries à partir de leurs coordonnées dans les n dimensions de l'espace factoriel virtuel. La classification des rhizobactéries a été réalisée suivant les 8 paramètres étudiés (Activité antagoniste : directe et à distance, production d'HCN, solubilisation du P en milieu solide et liquide, production de l'AIA en milieu solide et liquide, production du chitinase).

D'après la figure 44, trois (03) groupes sont à distinguer. Les groupes 1 et 2 sont distingués à une distance euclidienne de 29 sur le dendrogramme.

- Le groupe 1 (isolats actifs) est constitué de 19 isolats qui ont prouvé une activité, qualifiée de bonne à moyenne, dans tous les paramètres étudiés.
- Le groupe 2 (isolats non actifs) est constitué de 6 isolats (Rb10, Rb23, Rb24, Rb21, Rb25 et Rb27). Ces rhizobactéries n'ont démontré aucune activité sinon minime dans tous les paramètres étudiés.
- Le groupe 3 est constitué de 4 isolats (Rb4, Rb20, Rb5 et Rb9). Ces 4 isolats sont les plus productrices d'AIA.

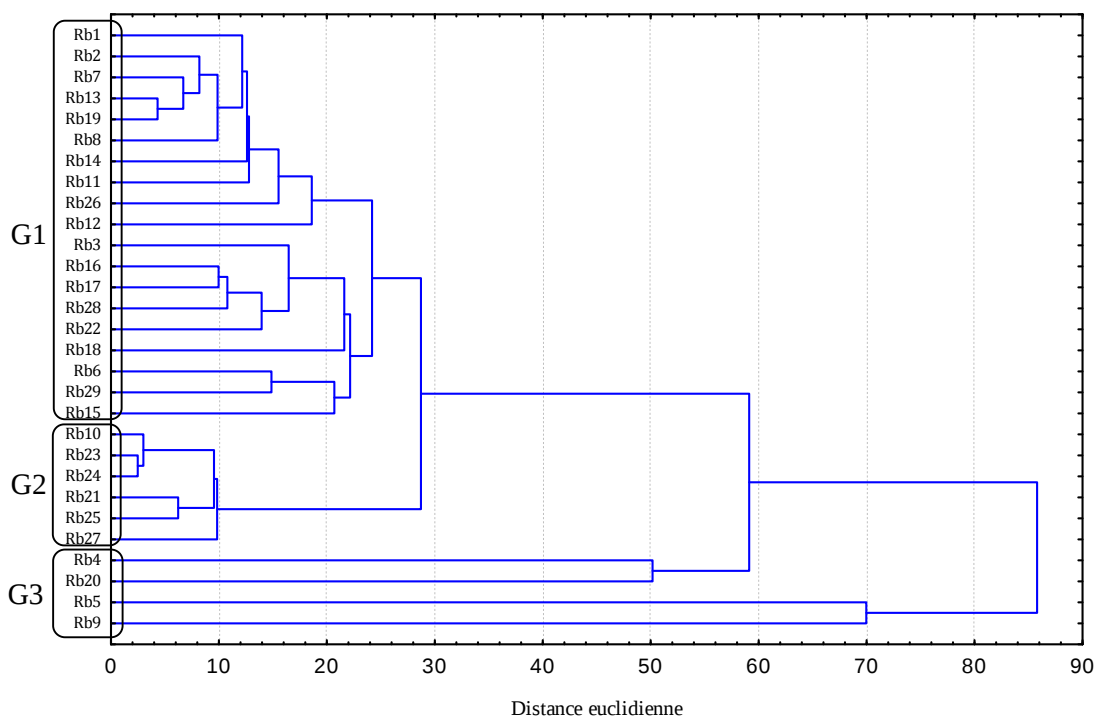


Figure 44 : Dendrogramme de la classification hiérarchique ascendante des 29 rhizobactéries suivant les 8 paramètres étudiés

3.7.1- Répartition des rhizobactéries par l'ACP

Dans le but d'étudier la répartition des 29 rhizobactéries suivant les paramètres étudiés, une ACP a été réalisée. La même matrice de l'ACP des interactions entre les activités étudiées a été utilisée avec une permutation entre les variables (paramètres) et les observations (rhizobactéries).

L'axe 1 et l'axe 2 du graphe sur la figure 45 présentent 44,71 et 18,72% d'information respectivement.

Sur l'axe 1, les deux rhizobactéries Rb4 et Rb27 occupent respectivement les extrémités (-) et (+) et elles présentent les valeurs de contribution les plus élevées (-2,075) et (1,534) (Annexe 5).

Le côté négatif de l'axe 1 se caractérise par la présence de 6 rhizobactéries dont la répartition par rapport à l'axe 1 se fait selon un ordre croissant de leur activité antagoniste et la production de l'HCN respectivement : Rb 4 (-2,075), Rb15 (-1,701), Rb6 (-1,641), Rb29 (-1,373), Rb9 (-1,037) et Rb12 (-0,937). Le côté positif de l'axe 1 se caractérise par la présence de quatre rhizobactéries dont la répartition par rapport à l'axe 1 se fait selon un ordre décroissant de leur activité antagoniste et la production de l'HCN respectivement : Rb27 (1,534), Rb23 (1,449), Rb24 (1,364) et Rb25 (1,176).

En fait, le premier axe factoriel oppose les meilleures rhizobactéries aux plus faibles au niveau des deux paramètres de l'activité antagoniste et la production de l'HCN.

Sur l'axe 2, les rhizobactéries Rb12 et Rb5 occupent respectivement les extrémités (-) et (+) et elles présentent les valeurs de contribution les plus élevées (-1,647) et (2,517) (Annexe 5). Le côté négatif de l'axe 2 se caractérise par la présence des rhizobactéries dont la production de l'HCN est la caractéristique la plus forte et qui suit un ordre décroissant vis-à-vis la confrontation direct notamment ; Rb12 (-1,647), Rb6 (-1,630), Rb29 (-1,476), et Rb15 (-0,917). Le côté positif de l'axe 2 se caractérise par la présence des rhizobactéries dont la production de l'AIA, en milieu liquide et solide, est très importante ; le cas de Rb5 (2,517), Rb9 (2,329) et Rb20 (1,765).

En fait, le second axe factoriel oppose la production l'HCN vis-à-vis l'AIA.

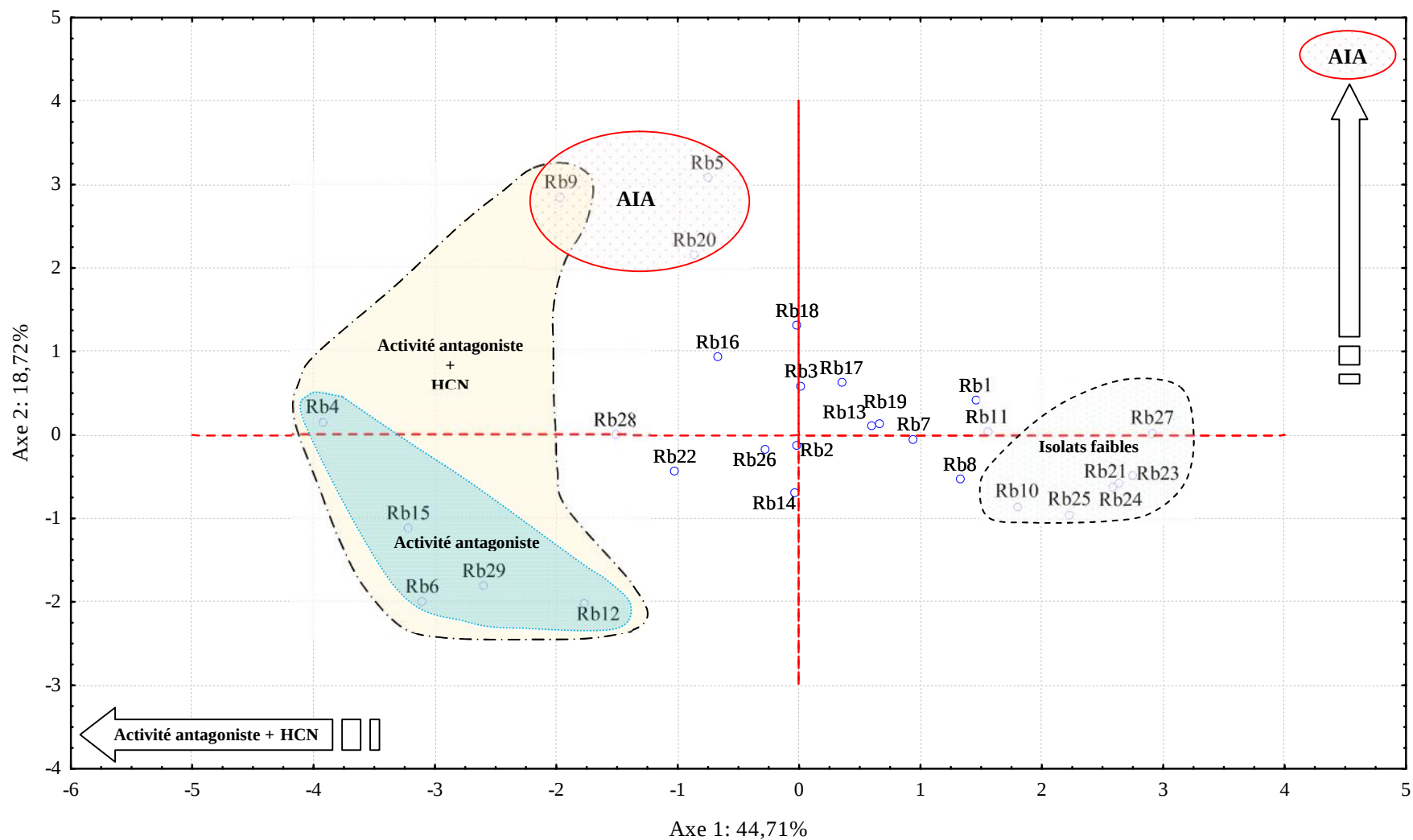


Fig. 45: Répartition des 29 rhizobactéries suivant les paramètres étudiés par une ACP.

3.8- Discussion

Dans la rhizosphère, des bactéries exercent un effet bénéfique sur la croissance des plantes et sont impliquées dans la solubilisation du phosphate ainsi que la production de phytohormones et des métabolites antimicrobiennes (Sharma et Johri, 2003 ; Beneduzi, 2012 ; Ahemad et Kibret, 2013). Leur utilisation comme des biofertilisants et agents de contrôle pour l'amélioration des cultures a été l'objet de recherches.

La détection visuelle et l'évaluation même semi quantitative de la capacité de solubilisation de phosphate par les microorganismes est possible par le screening *in vitro* dans le milieu de culture contenant des phosphates minéraux insolubles tel que le phosphate de tricalcium $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphore.

Gupta *et al.* (1994) ont développé une technique améliorée en utilisant un milieu contenant du bleu de bromophénol. Dans ce milieu, des halos sont formés autour des colonies bactériennes en réponse à la baisse du pH suite à une production d'acides organiques. Ces dernières sont responsables de la solubilisation du phosphate. Cette technique a permis à certains auteurs de rapporter des résultats reproductibles et corrélés par rapport à la méthode de halo simple.

Dans cette étude, la solubilisation est révélée par la présence d'un halo autour de la colonie bactérienne, la variation du diamètre de ce halo montre qu'il y a une variabilité entre les isolats testés avec un IS allant de 1,20 à 3,43.

D'après Alikhani *et al.* (2006), une activité solubilisatrice chez différents rhizobia des sols a été examinée. Ces chercheurs ont constaté que leur IS est compris entre 2,48 pour *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* et 1,41 pour *Mesorhizobium ciceri*, *M. mediterraneum* et *Sinorhizobium meliloti*. Par ailleurs, Piyush *et al.*, (2005) ont isolé une souche bactérienne du genre *Burkholderia* sp. à partir des nodules racinaires de *Mimosa pudica* qui a un IS de 2,15. Konate (2007) a constaté que les endophytes du caroubier ont un IS qui varie de 1,17 à 2,13.

La quantité de P soluble déterminée après 7 jours d'incubation à 30°C sur le milieu Pikovskaya liquide additionné de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ par les rhizobactéries antagonistes varie de 25,5 à 52,44 µg/ml. Selon Silini (2012), cette quantité varie de 23,59 à 171,07 µg/ml pour les dix isolats de *Azotobacter*.

L'absence de corrélation entre le PVK liquide et solide révèle une différence dans la capacité de solubiliser le P. Les deux isolats Rb10 et Rb27 ont la capacité de solubiliser le P sur le milieu PVK solide et aucune concentration de phosphate solubilisé n'a été détectée sur milieu PVK liquide. Nos résultats sont en accord avec les résultats rapportés par Baig *et al.* (2010).

Les milieux liquides offrent la meilleure détection de la solubilisation de P que les milieux solides. Comme l'attestent les performances de la plupart des rhizobactéries, la diffusion des acides produits en milieu liquide est facile contrairement au milieu solide où la libération et la circulation des molécules est difficile (Nautiyal, 1999). La conséquence de ce phénomène se manifeste par la non apparition du halo de transparence autour des colonies des souches solubilisant efficacement les phosphates en PVK liquide. Ainsi, les isolats sur milieux solides peuvent ne pas utiliser la même voie métabolique que celle utilisée en milieux liquides. Ce qui explique, l'absence de cette capacité sur les milieux solides par les isolats Rb8, Rb9 et Rb11, malgré que ces derniers solubilisent efficacement le phosphate avec une concentration de 35,91 µg/ml, 41,3 µg/ml et 25,5 µg/ml respectivement en milieu PVK liquide.

En revanche, une absence de libération de P sur le milieu PVK solide et liquide par les isolats Rb21, Rb23, Rb24 et Rb25 serait probablement la conséquence d'une déficience enzymatique. En effet, la disponibilité des formes libres de P dans le milieu favorise leur liaison avec les acides organiques libérés formant des complexes organophosphatés difficiles à dégrader par les bactéries (Ilmer et Schinner, 1995). La dissolution des composés organiques complexes en une forme utilisable de P est possible par la production des enzymes en particulier les phosphatases (Yadav et Tarafdar 2003; Aseri *et al.*, 2009 ; Figueiredo *et al.*, 2010) et les phytases (Maougal *et al.*, 2014).

Une baisse de pH associé à la solubilisation des P a été enregistrée dans le milieu PVK. L'acidification du milieu est probablement due à la production des acides organiques. Il en est ressorti une présence de corrélation significative entre le pH du milieu et la solubilisation de P ($r=0,8902$). Nos résultats sont en concordance avec ceux rapportés par Hinsinger (2001), Rodriguez *et al.* (2004), Silini (2012) et Mardad *et al.* (2013).

Selon Narsian et Patel (2000) la quantité et le type d'acide produits par l'oxydation microbiologique et la baisse de pH varient en fonction du genre et de l'espèce microbienne considérée. Il est établi que les souches de *Bacillus megaterium* libèrent l'acide

propionique (Chen *et al.*, 2006). D'autres souches de *Bacillus atrophaeus*, *amyloliquefaciens* et *licheniformis* libèrent des acides organiques volatiles (acétate, isobutyrate, isovalérate et valérate) et non volatiles (lactate, fumarate et succinate) (Vazquez *et al.*, 2000).

La production des antibiotiques volatiles comme l'HCN a été mise en évidence chez nos isolats antagonistes. L'HCN se forme à partir d'un acide aminé en l'occurrence la glycine par l'HCN synthétase (Castric, 1994). La HCN synthase est une flavoprotéine membranaire qui catalyse la formation de cyanure d'hydrogène et de CO₂ à partir de la glycine (Ramette *et al.*, 2003).

Les bactéries productrices d'HCN sont insensibles à ces antibiotiques volatiles d'où elles possèdent une cytochrome oxydase alternative résistante à l'HCN (Bashan et de-Basan, 2005).

Plusieur rhizobactéries y compris *Bacillus* spp. ont produits HCN (Kumar *et al.*, 2012). Murugan *et al.* (2012) ont démontré que l'isolat *Bacillus subtilis* KM05 a la capacité de produire l'HCN sur le milieu gélose nutritive additionné de la glycine qui a été observé par un changement de couleur de papier filtre du jaune au marron.

Les résultats obtenus ont montrés que certaines rhizobactéries antagonistes n'ont pas la capacité de produire l'HCN. L'absence de cette production serait probablement due à l'absence ou à la perte des gènes (*hcn*) responsables de la biosynthèse.

Toutefois, nos résultats semblent indiquer l'existence d'une corrélation entre l'HCN et l'activité antagoniste ($r=0,641$; $r=0,824$). L'HCN détectés peut être impliqué dans l'inhibition de la croissance mycélienne de FOC1 et FOC2 détectés dans les essais précédents par confrontation à distance avec les rhizobactéries antagonistes. Les travaux *in vitro* de Blumer et Haas (2000) confirment notre hypothèse où la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes a été inhibée suite à la production de HCN via la phase gazeuse.

L'analyse des résultats de l'AIA révèle une production remarquable de cette hormone synthétisée. La production de ce composé est variable d'un isolat à l'autre allant de 4 µg/ml à 326,8 µg/ml. Les travaux de Cherif (2014) ont démontré la capacité de production de l'AIA en présence de tryptophane par les souches de *Bacillus* à des taux très variés qui s'étendent de 1,58µg/ml à 25,41µg/ml.

Le L- tryptophane est considéré comme le précurseur de l'AIA, son addition au milieu favorise et augmente la synthèse de cette hormone (Ali *et al.*, 2009). Cependant, les

exsudats racinaires sont une source naturelle de L- tryptophane pour la microflore rhizosphérique (Kamilova *et al.*, 2006 ; Dastager *et al.*, 2010).

D'autres mécanismes ont été proposés pour expliquer le phénomène par lequel *Bacillus* spp. a stimulé la croissance des plantes telle que la production des cytokinines (Brown, 1974). Les gibbérellines ont été détectés dans plusieurs cultures de *B. subtilis*, mais ne sont pas détectés en présence d'auxine (Broadbent *et al.*, 1971). Araujo *et al.* (2005) ont détecté la production d'AIA par deux souches antagonistes de *B. subtilis*. Cette phytohormone a stimulé la croissance du soja.

Selon Barazani et Friedman (1999), les bactéries capables de sécréter un taux supérieur à 13,5 µg/ml de composés indoliques sont considérés comme étant des PGPR. les taux obtenus dans la présente étude sont donc suffisants pour stimuler la croissance végétale.

Le mycoparasitisme des rhizobactéries est facilité par la production des enzymes hydrolytiques. La chitinase et la cellulase sont d'importantes enzymes spécialement dans le contrôle fongique, par leurs activités de dégradation des composés des parois cellulaires tels que : la chitine et les ponts glucosidiques (Lorito *et al.*, 1996).

Dans la présente étude, tous les isolats testés sont incapables de produire la cellulase. Des résultats contradictoires ont été obtenus par Ait Kaki (2013), où elle a détecté une activité cellulasique chez toutes les espèces de *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis*, *B. subtilis* subsp. *Spizezenii* et *B. velezensis*) exceptant *B. atrophaeus* qui est la seule espèce à la capacité de produire la chitinase.

En outre, quelques rhizobactéries antagonistes Rb (2, 3, 4, 6, 15, 16, 22 et 28) ont la capacité de dégrader la chitine en milieu de culture par la sécrétion de chitinase. Les microorganismes excréant la chitinase ont été rapportés comme des agents de biocontrôle efficaces (Inbar et Chet, 1991 ; Chernin et Chet, 2002). Cependant, les autres rhizobactéries antagonistes et non chitinolytiques se sont avérées inhibitrices du FOC1 et FOC2, ce qui suggère l'intervention d'autres mécanismes antagonistes.

Plusieurs rhizobactéries, y compris le genre *Bacillus*, sont connues par la production cette enzyme (Huang *et al.*, 2004; Bogas *et al.*, 2007; Aktuganov *et al.*, 2007). Singh *et al.* (2013) ont rapporté que la souche *Lysinibacillus fusiformis* B-CM18, isolée à partir de la rhizosphère de pois chiche et prouvant plusieurs activités, dont la production de la chitinase, a une activité antifongique importante *in vitro* contre une large gamme de champignons phytopathogènes, parmi eux, le *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*. Dans le même

contexte, Patil *et al.* (2015) ont rapporté qu'une dégradation de la paroi cellulaire de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* par les deux rhizobactéries isolées à partir de pois chiche, *Paenibacillus polymyxa* (CTS-B19) et *Bacillus Subtilis* (CTS-G24) est due à la production des chitinases. Des chitinases purifiées de *Bacillus subtilis* (AF1) sont hautement antifongiques (Manjula *et al.*, 2004).

Les chitinases détectées dans cette étude peuvent être impliquées dans l'inhibition de la croissance mycélienne de FOC1 et FOC2 démontrée dans les essais précédents par confrontation directe avec les rhizobactéries antagonistes par hydrolyse de la chitine des parois cellulaires. Ces activités ont également été signalées par Matsuda *et al.* (2001) et Hoster *et al.* (2005). D'après Melentev *et al.* (2001) cette enzyme provoque la formation de vacuoles au niveau du mycélium fongique et ceci est parfois accompagné de la dégradation des parois cellulaires des hyphes et la libération des composants intracellulaires dans le milieu.

La capacité des isolats de *Bacillus* spp. de croître activement sur des milieux contenant de la chitine ou de mycélium fongique indiqua le potentiel mycolytique de ces isolats, qui détermine leur activité antagoniste contre les champignons phytopathogènes.

3.9- Conclusion

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de recherche permettent de confirmer la présence de rhizobactéries (*Bacillus* spp.) de pois chiche producteurs de l'AIA et capable de solubiliser le phosphate. Ils montrent aussi que les activités PGP de ces rhizobactéries sont hétérogènes; certaines souches possèdent des capacités remarquables aussi bien phytostimulatrices que biofertilisantes. En outre, ces rhizobactéries présentent des caractéristiques bénéfiques aux plantes à effet indirect qui sont reliées à leur utilisation comme moyen de lutte biologique via la production de certains métabolites comme le HCN et les enzymes lytiques (les chitinases) capables d'inhiber la croissance des champignons phytopathogènes.

Cependant, il est important de réaliser que, malgré l'utilité des tests *in vitro* pour déterminer le potentiel inhibiteur d'une rhizobactérie, cela ne reflète en rien la réalité de la rhizosphère. Par conséquent, la prochaine étape dans le développement des rhizobactéries comme des agents de biocontrôle doit absolument passer par des tests en pot et des tests au champ.

Cinq isolats ont été sélectionnés pour approfondir l'étude de leur taxonomie et de leurs efficacités contre FOC *in vivo*. Il s'agit des isolats Rb29, Rb6, Rb4, Rb12 et Rb15.

Partie III : Résultat et discussion

Chapitre 4 : **Identification des rhizobactéries antagonistes**

Chapitre 4 : Identification des rhizobactéries antagonistes

4.1- Introduction

L'isolement à partir des échantillons du sol nous a permis d'obtenir une collection de 131 isolats bactériens. Ces rhizobactéries ont été testées pour évaluer leur pouvoir antagoniste contre deux isolats de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* : agent du flétrissement vasculaire du pois chiche. Vingt neuf (29) isolats antagonistes seulement ont montré une bonne action inhibitrice envers ces deux derniers pathogènes. Les cinq meilleures rhizobactéries antagonistes ont été retenues pour une identification approfondie. Il s'agit de Rb29, Rb6, Rb4, Rb12 et Rb15. Ces isolats sont morphologiquement différents entre eux et pourraient représenter des taxons originaux.

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. Les caractères phénotypiques offrent des opportunités pour sélectionner des souches efficaces et compétentes. Ainsi, ces approches d'ordre fondamental et pratique permettent la détermination d'une inoculation efficace et bénéfique pour les plantes hôtes.

4.2- Caractérisation phénotypique et biochimique

L'identification de cinq rhizobactéries (Rb29, Rb6, Rb4, Rb12 et Rb15) a été faite sur la base de leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. L'isolat Rb29 a fait l'objet d'une identification génotypique.

Les cinq isolats bactériens ont été identifiés comme étant des bactéries à Gram positif appartenant au genre *Bacillus*. La confirmation de ce genre est apportée par la mise en évidence de sporulation de ces bacilles. Ils sont catalase positif et oxydase variable (Tableau 18).

Nos isolats donnent, sur GN des colonies sont le plus souvent de grandes tailles muqueuses ou rugueuses, irrégulières, opaques, blanches à crèmes (Figure 46).

L'examen microscopique par l'objectif à immersion a montré que les cinq isolats sont des bacilles rectilignes, à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable entre 2 et 3µm de long et 0,9 à 1,2µm de large, sporulés, à Gram positif (Figure 47), généralement mobiles sauf pour les isolats identifiés comme étant *Bacillus mycoïdes*.

Lorsque les conditions deviennent défavorables, les *Bacillus* spp. sporulent et donnent des spores (une seule endospore par cellule végétative).

Les endospores ont été examinés à l'aide des microscopes optique et électronique (Figure 48, Figure 49 et Figure 50). Les endospores étant imperméables au bleu de méthylène où elles apparaissent comme des zones incolores dans les cellules végétatives. Par contre, après une coloration au vert de malachite, elles apparaissent vertes dans des cellules rouges. La forme des endospores pour toutes les espèces identifiées est ovoïde et la position est centrale et non déformante.

Le tableau 18 présente les résultats des caractères morphologiques de cinq espèces identifiées.

Le profil biochimique obtenu après la lecture finale des galeries Api 50 CHB et 20E a été identifié à partir de la base de données (V4.0), à l'aide du logiciel d'identification apiwebTM en référence aux tableaux d'identification de la notice du fabricant pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques (Annexe 6).

Le tableau 19 présente les résultats des caractères biochimiques des cinq isolats obtenus par les galeries Api 50CHB. Cinq espèces ont été identifiées : *B. subtilis* (Rb29), *B. amyloliquefaciens* (Rb4), *B. megaterium* (Rb6), *B. lentus* (Rb12), *B. mycoïdes* (Rb15) (Tableau 18).

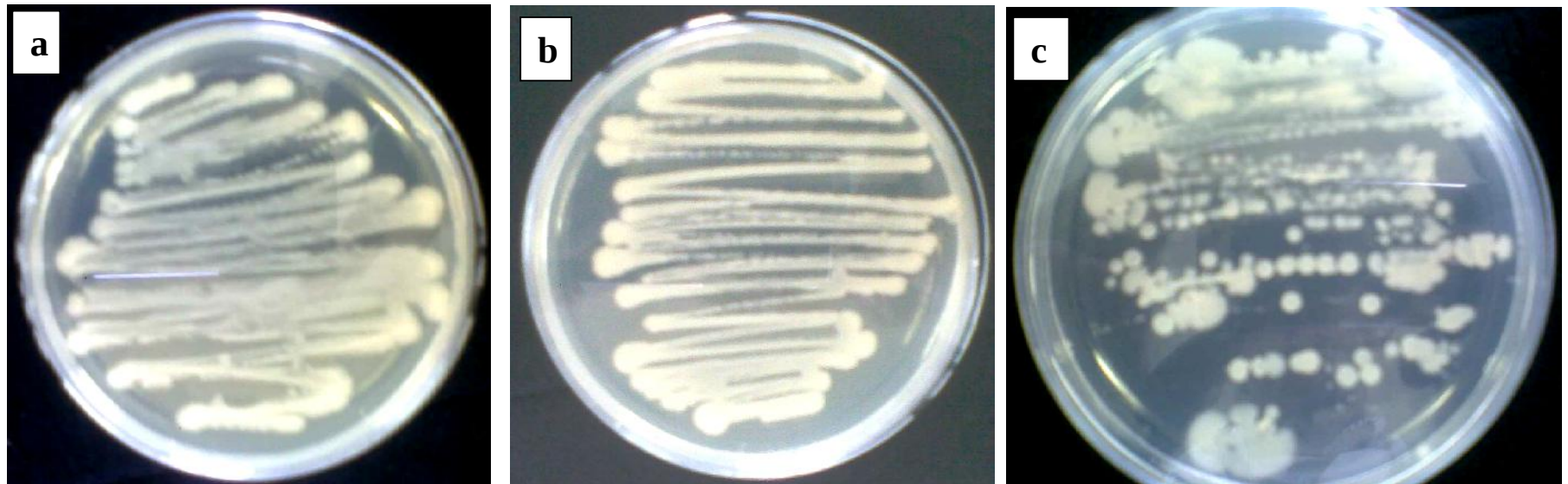


Fig. 46: Aspects cultureux de trois espèces de *Bacillus* sur milieu GN

a : *B. subtilis* (Rb29) ; **b :** *B. lentus* (Rb12) ; **c :** *B. mycoïdes* (Rb15)

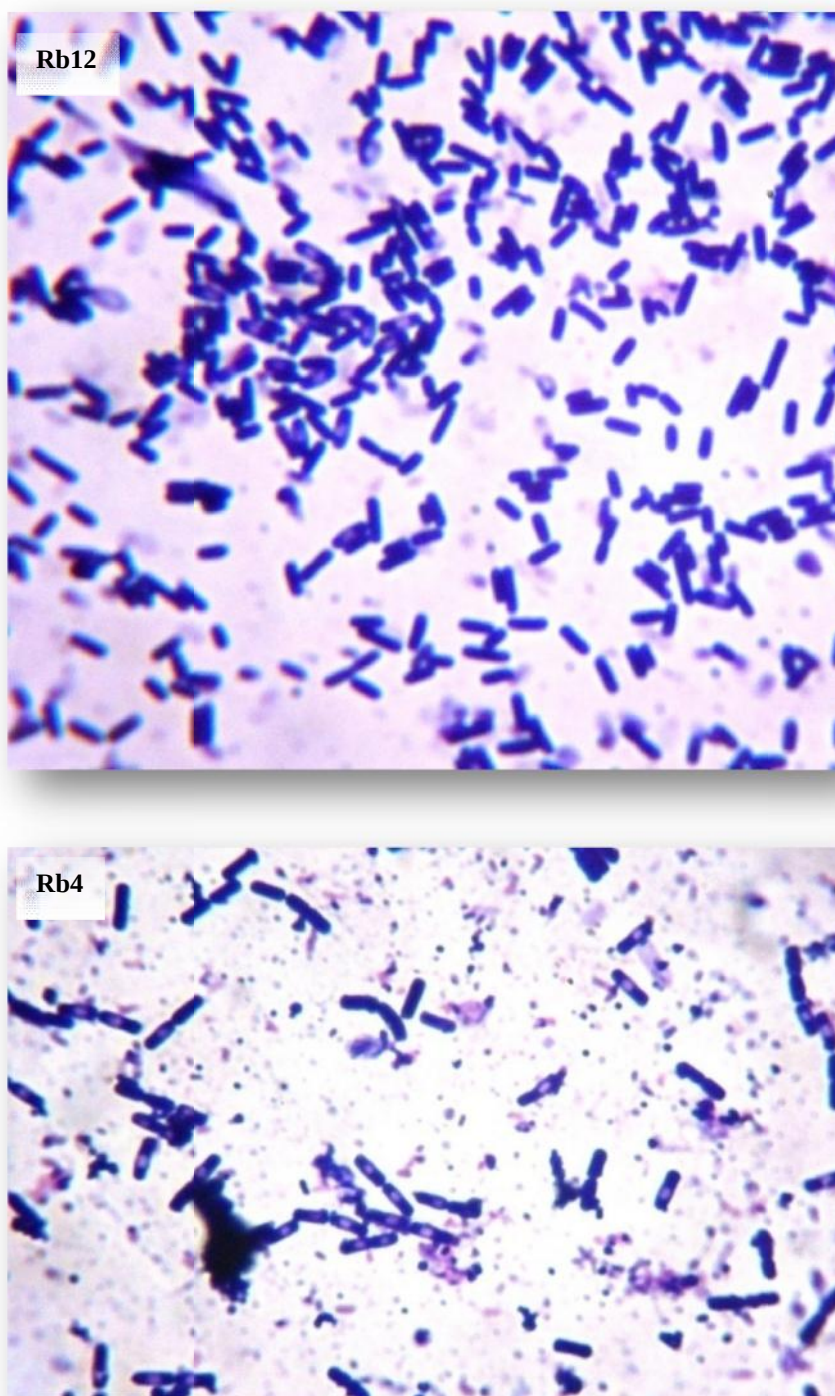


Fig. 47: Aspect microscopique de *B. lentus* Rb12 et *B. amyloliquefaciens* (Rb4) après une coloration de Gram (x 100)

Tableau 18 : Principales caractéristiques morphologiques et physiologiques de cinq espèces de *Bacillus*

Isolats	Espèce	G	Cat	Oxy	Endospore	Position de spore	Morphologie	Taille (µm)		Mob
								Lon	La	
Rb29	<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	centrale	grand bâtonnet rectiligne	2	1,2	+
Rb4	<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	+	+	+	centrale	grand bâtonnet en chaine	3	1	+
Rb6	<i>B. megaterium</i>	+	+	-	+	centrale	grand bâtonnet en longue chaine	3	1,1	+
Rb12	<i>B. lentus</i>	+	+	-	+	centrale	bâtonnet court, isolé	2	0,9	+
Rb15	<i>B. mycoïdes</i>	+	+	-	+	centrale	grand bâtonnet en chaine	3	1,2	-

G : Gram (+ positif, - négatif) ; **Cat** : Catalase (+ positif, - négatif) ; **Oxy** : Oxydase (+ positif, - négatif) ; **Endospore** (+ présence, - absence) ; **Lon** : Longueur ; **La** : Largeur ; **Mob** : Mobilité (+mobile, - immobile).

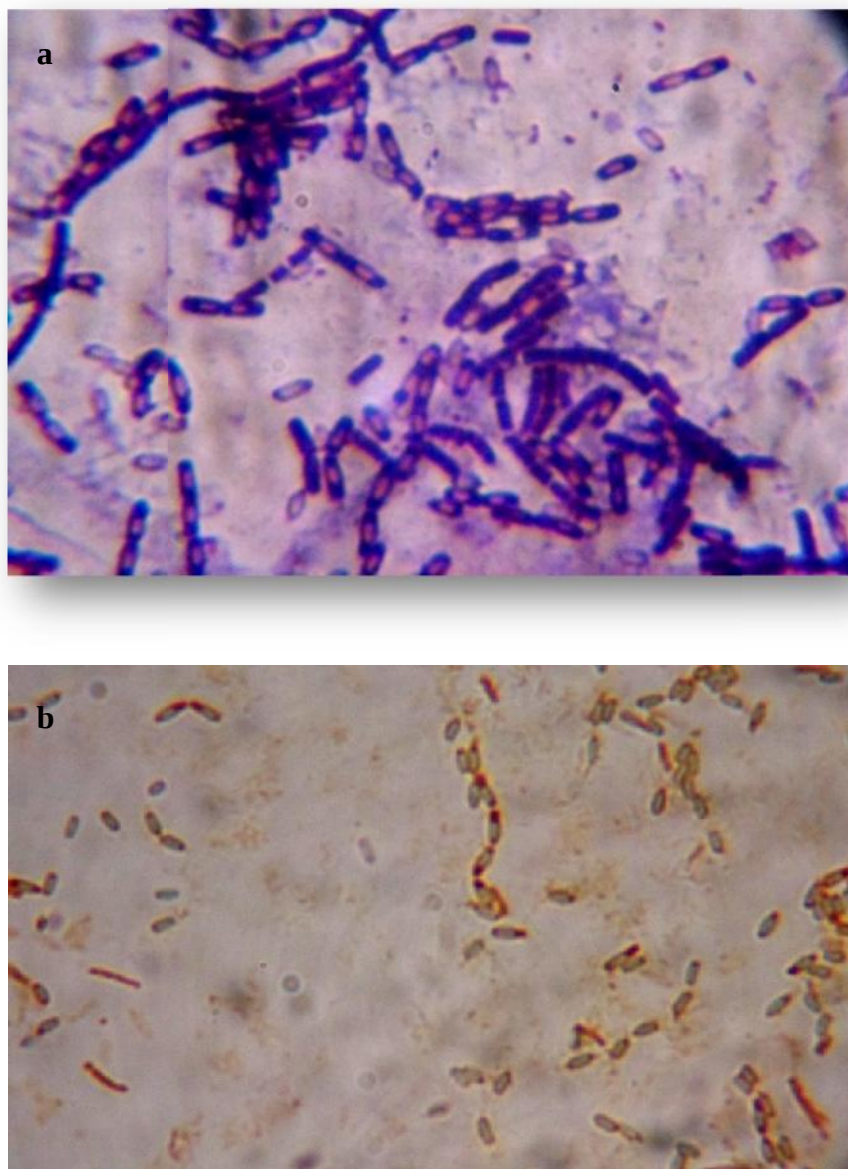


Fig. 48: Aspect microscopique d'endospores centrales et cellules végétatives de *B. megaterium* Rb6 (x 100)

a : après coloration au bleu de méthylène, **b** : après coloration au vert de malachite

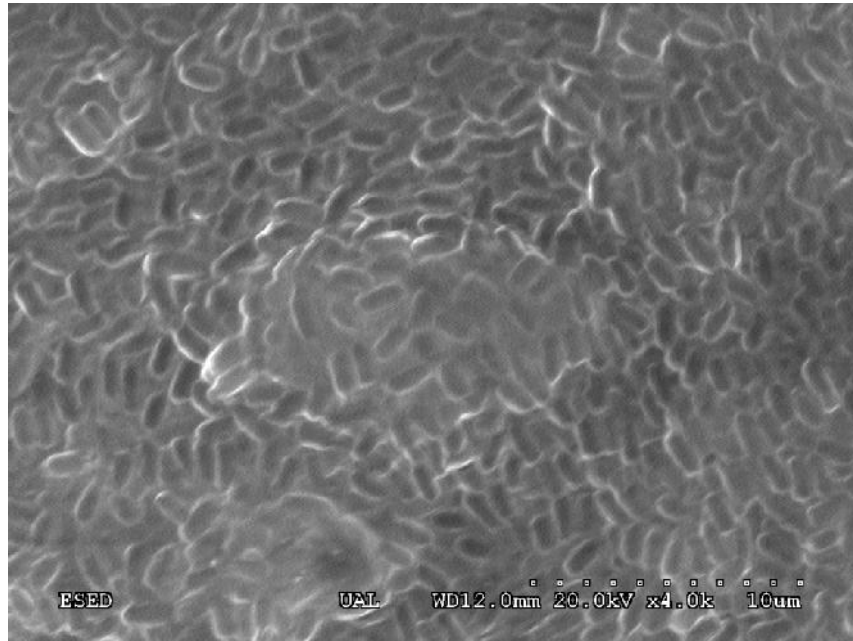


Fig. 49: Caractéristiques morphologiques de spores de *B. subtilis* (Rb 29) observés en microscopie électronique à balayage au grossissement x 4.0k et une échelle de 10µm.



Fig. 50: Caractéristiques morphologiques de spores de *B. lentus* (Rb12) observés en microscopie électronique à balayage au grossissement x 5.0k et une échelle de 10µm.

Tableau 19: Pourcentages de réactions positives obtenus par les galeries Api 50CHB

Les composés carbonés Api 50 CHB V4.0		Rb6	Rb12	Rb29	Rb15	Rb4
1	GLY	++	++	++	+	++
2	ERY					
3	DARA					
4	LARA	++	++	++		++
5	RIB	++	++	+++	+++	+++
6	DXYL	++		++		++
7	LXYL					
8	ADO					
9	MDX					
10	GAL	++	++		+	
11	GLU	+++	+++	+++	+++	+++
12	FRU	+++	+++	+++	+++	+++
13	MNE	+	+++	++		++
14	SBE					
15	RHA		+			
16	DUL					
17	INO	++		++		++
18	MAN	+++	++	+++		+++
19	SOR	+		++		++
20	MDM					
21	MDG	+	+	++		++
22	NAG	++	++	+	+++	+
23	AMY	++	++	++	+	++
24	ARB	++	++	++	++	++
25	ESC	+++	+++	+++	+++	+++
26	SAL	++	++	++	++	++
27	CEL	++	++	+++	+	+++
28	MAL	+++	+++	+++	+++	+++
29	LAC	++	++	+	+	+
30	MEL	+++	++	++		++
31	SAC	+++	++	+++	++	+++
32	TRE	+++	++	++	+++	++
33	INU	++	+	++		++
34	MLZ	+	+			
35	RAF	++	++	++		++
36	AMD	+++	++	++	+++	++
37	GLYG	+++	++	++	+++	++
38	XLT					
39	GEN	++	++	++		++
40	TUR	++	+	++		++
41	LYX					
42	TAG					
43	DFUC					
44	LFUC					
45	DARL					
46	LARL					
47	GNT					
48	2KG					
49	5KG					
Identification		<i>B. megaterium</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
ID %		88,7	99,9	99,8	99,2	99,7

glycérol (GLY) ; érythrol (ERY); Darabinose (DARA); L-arabinose (LARA); ribose (RIB); D-xylose (DXYL); L-xylose (LXYL); adonitol (ADO) ; D-xyloside (MDX); galactose (GAL); glucose (GLU); fructose (FRU); mannose (MNE) ; L-sorbose (SBE); rhamnose (RHA); dulcitol (DUL); inositol (INO); sorbitol (SOR); mannitol (MAN) ; sorbitol (SOR); α-méthyl-Dvmannoside (MBM); α-méthyl-Dvglucoside (MDG); Nacetyl glucosamine (NAG); amygdaline (AMY); arbutine (ARB); esculine (ESC); salicine (SAL); cellobiose (CEL); maltose (MAL); lactose (LAC); mélbiose (MEL); saccharose (SAC); tréhalose (TRE); inuline (INU); amidon (AMD); raffinose (RAF); mélézitose (MLZ); glycogène (GLYG); xylitol (XLT); gentiobiose (GEN) ; D-turanose (TUR); D-Lyxose (LYX); D-tagatose (TAG); D-fucose (DFUC); L-fucose (LFUC); D-arabitol (DARL); L-arabitol (LARL); gluconate (GNT); 2 k éto-gluconate (2 KG) ; 5 k éto-gluconate (5 KG).

Le test, appliqué à cinq isolats, a permis de définir pour les espèces de *Bacillus* un profil biochimique concernant l'acidification des 49 substrats (hydrates de carbone et leurs dérivés) (Annexe 6). Le profil biochimique obtenu au moyen du système API 50CHB est suffisamment caractéristique pour différencier entre les espèces du même genre *Bacillus*. De même, toutes les espèces identifiées ont présenté un niveau de similitude supérieure (Tableau 19).

La caractérisation phénotypique a été utilisée pour identifier et classer les isolats selon certains critères morphologiques, la réaction avec certains colorants et les réactions biochimiques. Cependant ces propriétés biochimiques n'ont pas permis de réaliser une identification taxonomique totale et précise.

L'identité de l'isolat Rb29 a été confirmée par une identification moléculaire par le séquençage du gène *rrs* (ARNr 16S). Il a été identifié comme étant une espèce du groupe *B. subtilis/amyloliquefaciens*. Cette identification a été effectuée par le pôle d'identification bactérienne de l'institut Pasteur de Paris.

4.3- Discussion

Les cinq isolats ont été identifiés comme des espèces qui appartiennent au genre *Bacillus* : *B. subtilis* (Rb29), *B. amyloliquefaciens* (Rb4), *B. megaterium* (Rb6), *B. lentus* (Rb12), *B. mycoïdes* (Rb15). Elles ont été identifiées avec un pourcentage élevé de similitude. Une identification au niveau de l'espèce est considérée comme acceptable avec un pourcentage de similitude supérieur à 75% (Gacitúa *et al.*, 2009).

Leurs tailles sont variables entre 2 et 3µm de long et 0,9 à 1,2µm de large. Selon Logan et De Vos (2009) les cellules de *Bacillus* spp. sont en forme de bâtonnet avec des extrémités rondes ou carrées dont la taille varie de 2,5 × 10µm à 0,5 × 1,2µm. Elles peuvent se présenter individuellement ou en chaîne.

Les endospores formés par les espèces identifiées sont ovoïdes, centrales et non déformantes. D'après Murray *et al.* (1995) les espèces du genre *Bacillus* peuvent former des spores qui peuvent être cylindriques, ovales ou rondes, placées en position centrale, terminale ou subterminale.

Toutes les espèces identifiées sont mobiles à l'exception de *B. mycoïdes* (Rb15). Généralement, les espèces de *Bacillus* utilisées dans le biocontrôle sont mobiles, avec des flagelles peritriches. Certaines espèces à intérêt dans la lutte biologique (*B. mycoïdes*) ont été caractérisées comme étant stationnaires (Kloepper *et al.*, 2004 ; Athukorala *et al.*, 2009).

La présente étude, ne peut à elle seule suffire pour identifier nos isolats et a plutôt un intérêt dans la caractérisation phénotypique des cinq isolats sélectionnés. Ainsi, les tests de la galerie ont été utilisés afin de dresser un profil phénotypique de chaque isolat. En effet, les taxonomistes préconisent l'utilisation d'un ensemble des caractères phénotypiques additionnés à l'analyse génotypique dans le cadre d'une taxonomie polyphasique (Palleroni, 2005 ; Palleroni, 2010).

Le genre *Bacillus* apparaît extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique que phénotypique notamment au niveau respiratoire, métabolique, ainsi que dans sa distribution dans l'environnement (Cheikh Rouhou, 2006). Au sein de la famille des *Bacillaceae*, on retrouve, entre autres, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mycoides* (Kloepper *et al.*, 2004).

Du point de vue génétique, *B. subtilis* est facilement manipulable, c'est également un excellent modèle pour l'étude de la croissance végétative et de la sporulation. Elle est notamment capable de former des spores, lui permettant de survivre longtemps dans des conditions extrêmes telles que la dessiccation ou la chaleur (Marchadier, 2009).

Les trois espèces *B. amyloliquefaciens* (Rb4), *B. megaterium* (Rb6), *B. lentus* (Rb12) appartiennent aussi au même groupe que *B. subtilis* (Rb29).

Par contre *B. mycoides* (Rb15) appartient au groupe de *B. cereus*. L'aspect rhizoïde des colonies différencie *B. cereus* et *B. mycoides* (Soufiane, 2013). Les espèces du groupe *B. cereus* peuvent être impliquées dans la minéralisation du phosphate (Fitriatin *et al.*, 2011) et la production d'antibiotiques (Athukorala *et al.*, 2009).

4.4- Conclusion

Des caractérisations phénotypiques et physiologiques plus une analyse biochimique nous ont permis d'identifier les cinq espèces comme suit : *B. subtilis* (Rb29), *B. amyloliquefaciens* (Rb4), *B. megaterium* (Rb6), *B. lentus* (Rb12), *B. mycoïdes* (Rb15).

Les tests biochimiques utilisés pour l'identification des isolats de *Bacillus*, peuvent être considérés comme indicateurs de l'aspect métabolique de ces bactéries, qui semble être un avantage pour leur adaptation au sol et à la rhizosphère.

Une identification moléculaire réalisée par le pôle d'identification bactérienne de l'institut Pasteur de Paris a confirmé que l'isolat Rb29 est une espèce du groupe *B. subtilis/amyloliquefaciens*.

Dans cette partie nous avons pu déterminer s'il existe dans le sol des bactéries sporulées qui soient capables d'être utilisées comme agents de lutte biologique.

Partie III : Résultat et discussion

Chapitre 5 :

**Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Bacillus* spp. sur
FOC en pots et en plein champ**

Chapitre 5 :

Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Bacillus* spp. sur FOC en pots et en plein champ

5.1- Introduction

L'amélioration de la croissance et la protection des plantes par la bactérisation des semences est de plus en plus étudiée. En effet, les semences peuvent être colonisées, dès le semis et avant qu'elles ne germent, par de nombreux microorganismes qui exercent sur elles une pression par épuisement de nutriments accompagnée d'effets néfastes (Digat, 1992, Lemanceau, 1992). Il serait donc bénéfique d'introduire sur la semence une population de bactéries connues pour ses effets bénéfiques sur la plante. L'installation précoce de ces agents biologiques favorisera la colonisation de la spermosphère et de la rhizosphère et pourra empêcher l'agression de la semence par certains champignons pathogènes (Digat, 1989, Mahaffee et Backman, 1993).

La recherche de souches antagonistes efficaces est la base de toute lutte biologique. Boudyach (2004) pensent qu'une bactérie protège mieux la plante de laquelle elle a été isolée. Partant de cette hypothèse, un isolement de bactéries appartenant au genre de *Bacillus* a été effectué à partir de la rhizosphère du pois chiche sain et qui a permis d'isoler, de sélectionner et de caractériser 29 isolats antagonistes. Aucun des tests de caractérisation réalisés *in vitro* ne permet de prévoir l'efficacité d'une souche dans les tests de protection *in vivo*.

Sur la base des critères de sélection *in vitro*, cinq espèces de *Bacillus* ont été choisies comme étant les plus performantes et qui ont été testées *in vivo* en pots et en plein champ. Il s'agit de *B. subtilis* (Rb29), *B. amyloliquefaciens* (Rb4), *B. megaterium* (Rb6), *B. lentus* (Rb12), *B. mycoïdes* (Rb15).

5.2- Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Bacillus* spp. sur l'incidence de la maladie

Au cours de cette expérience, l'effet protecteur de *Bacillus* spp. à l'égard de FOC responsable de flétrissement vasculaire de pois chiche a été testé sur le cultivar sensible ILC 482. L'efficacité « *in vivo* » des cinq isolats (Rb29, Rb6, Rb12, Rb4 et Rb15) sur l'incidence de la maladie a été évaluée au bout de 40 jours.

Les résultats obtenus montrent que l'apparition des 1^{iers} symptômes sur les plantes inoculées seulement par FOC1 s'est faite au 18^{ième} jour de semis en pots et au 25^{ième} jour en

plein champs. Les observations régulières, enregistrées durant 6 semaines, ont montré que la maladie s'est installée rapidement sur les plantes non traitées.

Le suivi de l'incidence de la maladie en fonction du temps pour les plantes inoculées uniquement par FOC1 a montré que les symptômes typiques du flétrissement vasculaire se manifestent sous forme d'un jaunissement débutant par les feuilles basales et montant progressivement vers celles du haut, ces symptômes sont représentatifs d'un niveau d'infection important.

Dans ces essais, nous avons noté une variation de la maladie évaluée sous forme de pourcentage des plantes ayant atteintes un indice symptomatologique de 3,8 et de 3,7 en pots et en plein champ, respectivement, correspondant au flétrissement généralisé ou à la mort de la plante (Figure 52 et 53). En effet, dans le cas des plantes inoculées par FOC1, l'incidence de la maladie est de 100% et allant même jusqu'à la non germination de quelques semences et/ou une croissance ralentie. La pathogénicité de FOC s'est manifestée aussi bien au stade semence qu'au stade plantule, principalement par des manques à la levée, des mortalités élevées des plantules et une inhibition importante de la croissance racinaire.

Concernant les plantules issues des semences inoculées par FOC1 et bactérisées séparément par les 5 isolats de *Bacillus*, les symptômes n'apparaissent qu'après 29 à 37 jours et de 33 à 39 jours en pots et en plein champs respectivement, selon l'isolat testé (Tableau 20). La bactérisation des graines par les 5 rhizobactéries a un effet bénéfique dès la germination en favorisant le développement des graines en présence de pathogène et en retardant l'apparition des symptômes (Figure 51). Une bioprotection des plantes *in vivo*, révélatrice d'un pouvoir antagoniste des isolats de *Bacillus* spp. vis-à-vis de FOC1, a été induite. Au bout de 40 jours, un empêchement considérable de la maladie a été constatée chez les plantes traitées avec les deux isolats Rb29 et Rb6 ; pour les quels les taux d'infection restaient très faibles de 1 et 10% et de 2 et 19% en pots et en plein champ respectivement avec des symptômes atténués principalement un jaunissement foliaires (Figure 54 et Figure 55). Cependant, l'incidence de la maladie enregistrée pour les isolats Rb12, Rb4 et Rb15 est faible allant de 30 à 40% en pots et de 32 à 42,8% en plein champ (Tableau 20, Figure 52).

Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité des cinq espèces *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. lentus*, *B. mycoïdes*. En effet, leur

application a réduit IM à 99%, 90%, 70%, 68% et 60% respectivement en pots et à 98%, 81%, 68%, 64% et 57,20% respectivement en plein champ (Tableau 20).

Tableau 20: La durée d'apparition des 1^{iers} symptômes, l'incidence et la gravité de la maladie en pots et en plein champs selon les traitements.

Traitements	La durée d'apparition des 1 ^{iers} symptômes		Incidence de la maladie (IM %)*		La gravité de la maladie (0 à 4)		Réduction d'incidence de la maladie (RM%)	
	En pots	En plein champs	En pots	En plein champs	En pots	En plein champs	En pots	En plein champs
FOC1	18	25	100 ^d	97,93 ^d	3,8	3,7	-	-
FOC1+ Rb29	37	39	1 ^a	2 ^a	0,03	0,06	99	98
FOC1 +Rb6	35	38	10 ^b	19 ^b	0,38	0,72	90	81
FOC1 +Rb12	32	36	30 ^c	32 ^c	1,17	1,18	70	68
FOC1+Rb4	31	36	32 ^c	36 ^c	1,21	1,33	68	64
FOC1 +Rb15	29	33	40 ^c	42,8 ^c	1,56	1,62	60	57,20

* Significative au seuil de 0,05

L'analyse de la réduction de l'incidence de la maladie (RM) lors de ce test montre que toutes les espèces testées réduisent significativement l'incidence de la maladie (IM) par rapport au témoin (Annexe 7).



Fig. 51: Effet de la bactérisation des semences d'ILC 482 par *B. subtilis* (Rb29) sur la germination, en comparaison avec les semences inoculées uniquement par FOC après 10 jours d'inoculation.

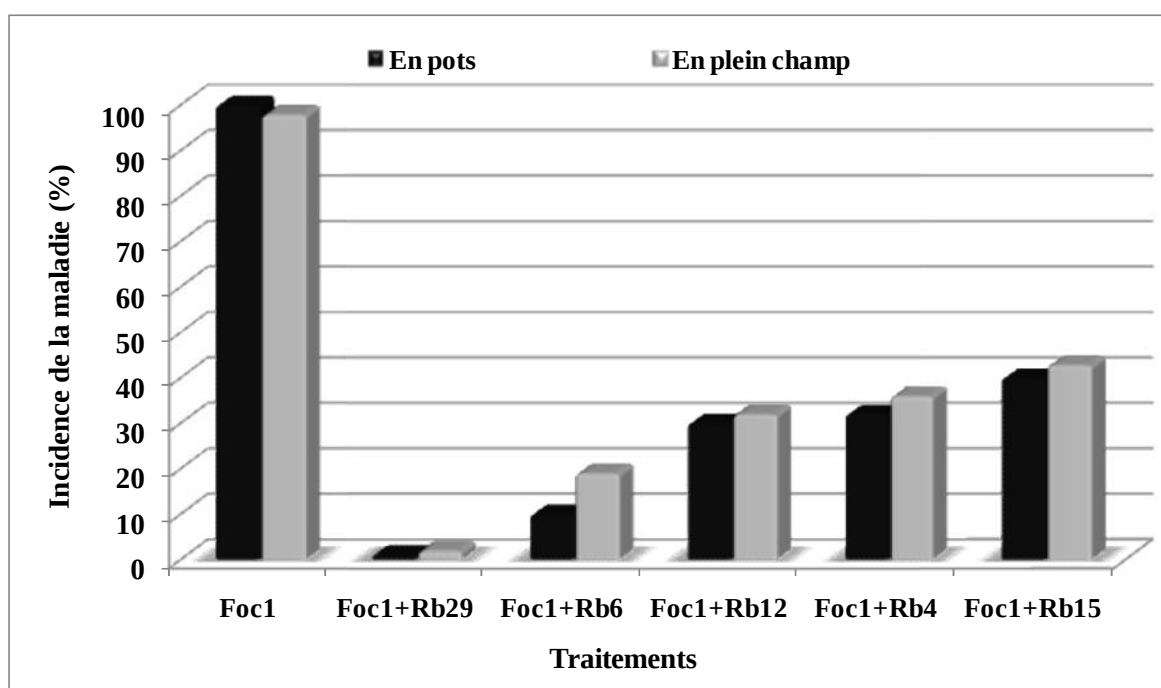


Fig. 52 : Réduction de l'incidence de la maladie de pois chiche traitée par les cinq espèces de *Bacillus* et inoculée par FOC1 en comparaison avec les plantes inoculées uniquement par FOC1.



Fig. 53: Plantes inoculées avec FOC1 montrées les symptômes caractéristiques de flétrissement vasculaire:
a) jaunissement et flétrissement et (b) nécrose du collet.



Fig. 54: Essai de lutte biologique en pots : (1) témoin sain, (2) plantes traitées seulement par *B. subtilis* (Rb29), (3) plantes traitées par *B. subtilis* (Rb29) et inoculées par FOC1, (4) plantes inoculées seulement par FOC1.



Fig. 55: Essai de lutte biologique en plein champ : **(a)** plantes inoculées seulement par FOC1 ; **(b)** plantes traitées par *B. subtilis* (Rb29) et inoculées par FOC1.

5.3- Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Bacillus* spp. sur la croissance et le rendement de pois chiche

En plus de leurs activités dans le contrôle biologique de la maladie, en réduisant la gravité et en diminuant l'incidence, les espèces de *Bacillus* ont démontré qu'elles sont capables d'améliorer la croissance des plantes.

Il est à noter que les paramètres de croissance ont été mesurés à la fin de la période végétative en plein champ.

Les plantes traitées par les cinq espèces antagonistes présentent un développement végétatif plus important comparativement à ceux du témoin sain et de plantes inoculées par le pathogène et traitées par l'antagoniste (Figure 56 et Figure 57). L'effet des isolats de *Bacillus* spp. sur la hauteur de la tige est représenté dans le tableau 21.

Les hauteurs des plantes bactérisées sont variées de 54 à 63,3cm selon la rhizobactérie testée par rapport au témoin. Ainsi que, les plantes inoculées par FOC1 et traitées par *Bacillus* spp. ont enregistré des hauteurs plus élevées allant de 52 à 59,1 cm en comparaison avec les plantes inoculées uniquement par FOC1 et qui ont présenté la plus courte hauteur (Tableau 21).

Comparativement au témoin, tous les traitements ont donné des valeurs de mesure supérieure et qui sont significativement différentes (Annexe 7).

Un effet significatif de l'amélioration de la hauteur de la tige a été observé en présence des trois isolats Rb29, Rb6 et Rb4, alors qu'une légère amélioration est constatée en utilisant les bactéries Rb12 et Rb15.

B. subtilis (Rb29) qui a conféré l'indice de la maladie le plus faible a également donné le taux d'augmentation de la hauteur de la tige le plus élevé.

L'effet de bactérisation des semences de pois chiche par les espèces de *Bacillus* sur les paramètres de rendement est présenté dans le tableau 21.

Chez les plantes bactérisées, le nombre de gousses par plante varie de 14,79 à 21,12 avec une moyenne de 16,92 gousses. Le nombre de graines par plante varie de 15,08 à 22,12 avec une moyenne de 17,48 Gr/pl. Le nombre de graines par gousse varie de 1,01 à 1,04 avec une moyenne de 1,02. Le poids de 100 graines varie de 42 à 44 g avec une moyenne de 43g.

Chez les plantes inoculées par FOC1 et traitées par *Bacillus* spp., le nombre de gousses par plante varie de 11,58 à 14,20 avec une moyenne de 12,89 gousses. Le nombre de graines par plante varie de 11,95 à 14,58 avec une moyenne de 13,19 Gr/pl. Le nombre de graines par gousse varie de 1,01 à 1,03 avec une moyenne de 1,02. Le poids de 100 graines varie de 37 à 39 g avec une moyenne de 38,4 g.

Tableau 21: Effet de bactérisation par *Bacillus* spp. sur les paramètres agronomiques de pois chiche

Traitements	H (cm)	Nt Go	Go/ Pl	Nt Gr	Gr/Pl	Gr/Go	Pt Gr (g)	P 100 (g)
Témoin	51,1 ^f	360 ^d	15 ^d	364,8 ^d	15,2 ^{c,d}	1,01 ^b	129,3 ^c	43 ^a
Rb29	63,3 ^a	507 ^a	21,12 ^a	531 ^a	22,12 ^a	1,04 ^a	188,8 ^a	44 ^a
Rb6	61 ^b	391 ^c	16,29 ^c	402 ^c	16,75 ^{b,c}	1,02 ^{a,b}	143 ^b	43 ^a
Rb12	55 ^e	355 ^d	14,79 ^d	362 ^d	15,08 ^{c,d}	1,01 ^b	128,7 ^c	42 ^a
Rb4	59 ^c	422 ^b	17,58 ^b	440 ^b	18,33 ^b	1,04 ^a	156,6 ^b	44 ^a
Rb15	54 ^e	356 ^d	14,83 ^d	363 ^d	15,12 ^{c,d}	1,01	129,1 ^c	42 ^a
FOC1	38,7 ^g	99 ^f	4,12 ^f	102 ^f	4,25 ^e	1,03 ^{a,b}	36 ^e	35,4 ^e
FOC1+Rb29	59,1 ^c	341 ^d	14,20 ^d	350 ^d	14,58 ^{c,d}	1,03 ^{a,b}	124,4 ^c	39 ^{b,c}
FOC1+Rb6	57 ^d	338 ^d	14,08 ^d	342 ^d	14,25 ^{c,d}	1,01 ^b	121,6 ^c	37 ^d
FOC1+Rb12	53,7 ^e	301 ^e	12,54 ^e	307 ^e	12,79 ^d	1,01 ^b	109,1 ^d	39 ^b
FOC1+Rb4	55 ^e	290 ^e	12,08 ^e	298 ^e	12,41 ^d	1,02 ^{a,b}	106 ^d	39 ^{b,c}
FOC1+Rb15	52 ^f	278 ^e	11,58 ^e	287 ^e	11,95 ^d	1,03 ^{a,b}	102 ^d	38 ^c

H : la hauteur des plantes ; **Nt Go** : le nombre total de gousses ; **Go/ Pl** : le nombre de gousses par plante ; **Nt Gr** : le nombre total de graines ; **Gr/Pl** : le nombre de graines par plante ; **Gr/Go** : le nombre de graines par gousse ; **Pt Gr (g)** : le poids total graines ; **P 100 (g)** : le poids de 100 graines.

L'analyse de la variance a montré un effet très hautement significatif pour la hauteur des plantes, le nombre total de gousses, le nombre de gousses par plante, le nombre total de graines, le nombre de graines par plante, le nombre de graines par gousse, le poids total graine et le poids de 100 graines (Annexe 7).

Il est à noter l'existence d'une corrélation positive entre la capacité phytoprotectrice des isolats de *Bacillus* spp. et la stimulation de la croissance végétale (Tableau 22). Cette corrélation apparaît dans le classement des isolats par ordre d'efficacité qui est le même pour la protection des plants et l'augmentation de la hauteur de la tige.

Une caractérisation *in vitro* plus poussée de cinq espèces testées *in vivo* a alors été entreprise: solubilisation de phosphate, production de phytohormone AIA, de HCN, de chitinase (Tableau 23).

Tableau 22 : Corrélation entre l'incidence de la maladie et les paramètres agronomiques étudiés

	H (cm)	Nt Go	Go/ Pl	Nt Gr	Gr/Pl	Pt Gr(g)	P 100(g)	IM pots	IM champs
H (cm)	1								
Nt Go	0,990	1							
Go/ Pl	0,990	0,999	1						
Nt Gr	0,991	0,999	0,999	1					
Gr/Pl	0,991	0,999	0,999	0,999	1				
Pt Gr (g)	0,991	0,999	0,999	0,999	0,999	1			
P 100 (g)	0,787	0,764	0,764	0,774	0,774	0,774	1		
IM pots	-0,991	-0,987	-0,987	-0,986	-0,986	-0,986	-0,729	1	
IM champs	-0,987	-0,977	-0,977	-0,978	-0,978	-0,978	-0,757	0,996	1

H : la hauteur des plantes ; **Nt Go** : le nombre total de gousses ; **Go/ Pl** : le nombre de gousses par plante ; **Nt Gr** : le nombre total de graines ; **Gr/Pl** : le nombre de graines par plante ; **Pt Gr (g)** : le poids total graines ; **P 100 (g)** : le poids de 100 graines.

Tableau 23 : Les caractéristiques *in vitro* de *Bacillus* spp. testées *in vivo*

Isolats de rhizobactéries	Moyenne ICM FOC1 et FOC2 (%)		Solubilisation de phosphate P ₂ O ₅ (µg/ml)	Production de HCN	Production de l'AIA AIA (µg/ml)	Production d'enzymes Chitinases	Protection (%) en pot	Protection (%) en plein champ
	CD	C à D						
Rb4	56,60	35,27	48,85	+++	126,4	+	68	64
Rb6	59,44	45,21	30,17	+++	46	+	90	81
Rb12	54,54	41,45	31,60	+++	9,4	-	70	68
Rb15	54,64	43,17	36,99	+++	64,8	+	60	57,20
Rb29	65,88	38,33	29,45	+++	34,6	-	99	98

Il est à rappeler que les cinq espèces testées avaient démontré *in vitro* une meilleure activité antagoniste contre le FOC, une capacité à produire l'hormone de croissance AIA et d'HCN et une bonne solubilisation de phosphate. L'utilisation de ces bactéries peut entraîner une meilleure utilisation du phosphore disponible au niveau du sol par les plantes.

Des observations du système racinaire ont démontré que les cinq bactéries testées sur le cultivar de pois chiche ILC 482 n'ont pas affecté la formation des nodules (Figure 58). Il semble qu'elles n'ont aucun effet négatif sur le processus de nodulation conduisant ainsi à la fixation azotée.

La bactérisation a induit une bonne croissance de la partie racinaire. La longueur racinaire et les racines secondaires ont été nettement meilleures chez les plantes bactérisées, la même observation a été constatée chez les plantes inoculées par FOC1 et traitées par *Bacillus* spp. (Figure 56) comparativement aux plantes inoculées seulement par FOC1.

La bactérisation a induit à une phytostimulation de la partie aérienne. Les analyses de la variance ont montré des effets significatifs notables (Annexe 7). La hauteur de la tige a été nettement meilleure chez les plants bactérisés. En effet, les hauteurs chez le témoin est de 51,1 cm, alors qu'en bactérisation, les valeurs dépassent les 53 cm. L'analyse de la variance (Annexe 7) a montré que *B. subtilis* (Rb29) a induit une meilleure réponse stimulatrice des paramètres de croissance des plants de pois chiche par rapport aux autres isolats. En effet, les plantes traitées par cette espèce ont montré une meilleure croissance axiale (Tableau 21, Figure 56 et 57). De même, les paramètres de rendement et surtout le nombre de graines et son poids total graines ont surpassé ceux des autres traitements (Tableau 21). Aussi, l'interaction des isolats testés avec FOC1 a engendré des effets stimulateurs de croissance et de rendement supérieurs aux témoins (Tableau 21).



Fig. 56: Essai de lutte biologique en pots : (1) témoin sain, (2) plantes traitées seulement par *B. subtilis* (Rb29), (3) plantes traitées par *B. subtilis* (Rb29) et inoculées par FOC1, (4) plantes inoculées seulement par FOC.



Fig. 57: Effet de *Bacillus* sur la croissance végétative de pois chiche: (1) témoin sain, (2) plantes traitées par *B. subtilis* (Rb29) et inoculées par FOC1, (3) plantes traitées seulement par *B. subtilis* (Rb29), (4) plantes inoculées seulement par FOC1.



Figure 58: (a) Présence de nodules sur une plante de pois chiche (ILC482) traitée avec *B. subtilis* (Rb29) et (b) un agrandissement sur les racines.



5.4- Discussion

Notre étude s'appuie sur la sélection des rhizobactéries capables de protéger les plantes de pois chiche vis-à-vis FOC1. L'utilisation des bactéries indigènes en lutte biologique peut contribuer à préserver non seulement l'équilibre de l'agrosystème, mais aussi le caractère du rendement.

La bactérisation des graines de pois chiche avec ces rhizobactéries est très efficace et par conséquent a empêché l'expression du FOC1 de 60 à 99% et de 57,20 à 98% en pots et en plein champ respectivement. En effet, une nette réduction de la maladie a été observée. *B. subtilis* (Rb29) est la bactérie qui avait une plus forte capacité à contrôler FOC1 par rapport à la bonne capacité protectrice démontrée par les autres espèces *B. megaterium* (Rb6), *B. amyloliquefaciens* (Rb4), *B. lentus* (Rb12), *B. mycoïdes* (Rb15).

La bactérisation des graines a conduit à une protection du cultivar sensible ILC482 contre le pathogène. Cette protection a favorisé la germination des graines. La germination est considéré comme une étape critique dans l'établissement des semis et ainsi la détermination d'une production agricole réussie (Benidire *et al.*, 2015). Une augmentation de taux de germination des semences a été exhibée par une bactérisation avec des PGPR (de Freitas et Germida, 1990).

Akhtar et Siddiqui (2008) ont mentionné que *Bacillus pumilus* a diminué l'incidence de la maladie de pois chiches causée par *Macrophomina phaseolina*. Pleban *et al.* (1995) ont démontré que l'inoculation de plants de coton avec *B. cereus* réduit l'incidence de la maladie causée par *R. solani* de 51%, et les résultats de Amal-Asran (2001) qui indique que *B. coagulans* et *B. cereus* ont montré des augmentations significatives de la survie et réduit de pré-émergence fonte des semis.

Les résultats de la présente étude ont été confirmés par les résultats de Bressan et Fontes Figueiredo (2010), qu'ils ont trouvé que six isolats de *Bacillus* spp. (BM1, BM2, BM3, BM4, BM5 et BM6) montrant un effet antagoniste contre *Fusarium moniliforme* *in vitro*, sont aussi les mêmes isolats protecteur de la culture de maïs (cv. BR 201) *in vivo*. Aussi, plusieurs auteurs ont noté que les microorganismes présentant une activité antagoniste élevée *in vitro* la conservent *in vivo* (Bardin *et al.*, 2003)

Les isolats testés ont stimulé la croissance du système racinaire, permettant ainsi une plus grande exploration du sol et par conséquent, une augmentation de la surface d'échange et donc une nutrition améliorée, ce qui s'est traduit aussi par un meilleur développement de la partie aérienne. Il a été démontré que les systèmes racinaires les plus longs sont les plus adaptés à l'exploration du sol (Berta *et al.*, 2002). La stimulation de la

croissance du système racinaire des plants inoculés par *Bacillus* spp. pourrait être expliquée par le fait que ces deux souches bactériennes peuvent agir par l'intermédiaire d'hormones. En effet, Glick (1995) a démontré que la synthèse des auxines par les rhizobactéries est impliquée dans l'élongation racinaire.

Les résultats obtenus montrent que toutes les rhizobactéries testées sont parvenues à promouvoir la croissance des plants de pois chiche à des valeurs de mesure variables. Cette stimulation s'est traduite essentiellement par une meilleure croissance axiale et une biomasse plus importante. Ce qui corrobore avec les résultats de plusieurs auteurs (Wani *et al.*, 2007 ; Satrani *et al.*, 2009, Wani et Khan, 2010). Nos notations confirment une influence positivement significative des cinq espèces rhizobactériennes *B. subtilis* (Rb29), *B. amyloliquefaciens* (Rb4), *B. megaterium* (Rb6), *B. lentus* (Rb12), *B. mycoïdes* (Rb15) sur tous les paramètres de croissance en comparaison avec le témoin.

La promotion de la croissance d'une plante peut être la conséquence des mécanismes d'actions bactériens intervenant indirectement dans l'environnement rhizosphérique ou directement sur la plante. Satrani *et al.* (2009) ont suggéré que la stimulation de la croissance des plantes traitées par des PGPR est directement liée à la sécrétion des phytohormones synthétisées par ces rhizobactéries. Ces phytohormones agiraient par renforcement ou accélération du développement à la fois du système racinaire et de la partie aérienne des plantes. Par conséquent, la surface des racines est amplifiée ; ce qui intensifie l'absorption des éléments nutritifs, de l'eau et des minéraux par les plantes.

Il est très probable que la stimulation de la croissance des plantes par les rhizobactéries est le résultat de l'action combinée de plusieurs mécanismes, mais la production de phytohormones (surtout IAA) est considérée comme un mécanisme direct utilisé par les bactéries pour augmenter la croissance et le rendement des plantes (Arkhipova *et al.*, 2005; Idris *et al.*, 2007). Les rhizobactéries produisant l'AIA sont connues pour leurs capacités à augmenter la croissance et la longueur des racines. Cet effet résulte en une surface racinaire plus grande, et une accessibilité pour plus de nutriments pour la plante.

Les effets bénéfiques de l'inoculation des cultures avec des microorganismes solubilisant le phosphate, ont été décrits par plusieurs auteurs (Rodriguez et Fraga, 1999; Sarawgi *et al.*, 1999). Kloepper *et al.* (1989) a rapporté que plusieurs souches de *Bacillus* (Ba5, Ba7, D6, D13, B14 et B18) isolées sur milieu PVK additionné de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilisent les phosphates à des taux appréciables. Elles peuvent être considérées comme

des biofertilisants car ces bactéries sont capables de libérer une quantité de P supérieure à celle nécessaire à leur métabolisme, ce qui permet aux plantes d'absorber le surplus.

La production d'HCN peut être avantageuse pour acquérir des nutriments. L'HCN provoque une augmentation d'exsudat racinaire (Ellis *et al.*, 2000). Les plantes hôtes ne sont généralement pas affectées par le cyanure bactérien (Zeller *et al.*, 2007). La production de HCN est une activité très commune chez *Bacillus* (50%) dans le sol rhizosphérique (Charest *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2008). Plusieurs études montrent que l'HCN améliore la croissance des plantes (Wani *et al.*, 2007). Selon Banerjee *et al.* (2010), le HCN est un métabolite secondaire impliqué dans la protection des végétaux. Ainsi, la capacité de produire HCN est une qualité souhaitée pour les rhizobactéries stimulatrices de la croissance des plantes.

La bactérisation de pois chiche avec *Bacillus* spp. s'accompagne en effet d'une augmentation significative des paramètres de rendement de la culture. Ben Mbarek (2011) suggère que, la hauteur du pois chiche du type Kabuli varie, de 30 à 90 cm, le nombre de gousses par plante varie de 10 à 42 gousses, le nombre de graines par gousse varie de 0,69 à 1,04 et le poids de 100 graines varie de 23 à 45 g.

Brown (1974) a rapporté que l'utilisation de *Bacillus megaterium* augmente le rendement du blé cultivé au champ. Les résultats obtenus par Wani *et al.* (2007) suggèrent que l'application de *Bacillus* comme une semence bio-inoculant à travers leurs activités de PGP promu sur toute la croissance des plantes légumineuses.

Dans des essais en condition contrôlée et en plein champ, la bactérisation de pois chiche par l'espèce *B. subtilis* (OSU-142) fixatrice d'azote seule ou en combinaison avec l'espèce *B. megaterium* (M-3) solubilisatrice de phosphate a augmenté de manière significative tous les paramètres étudiés chez le pois chiche (la hauteur de la plante, les racines, nombre de gousses et le rendement en graines) en comparaison avec le témoin non traité (Elkoca *et al.*, 2008).

L'origine rhizosphérique des isolats testés pourrait être aussi l'un des facteurs contribuant dans l'activité positive observée chez les plants de pois chiche. Les mêmes résultats ont été rapportés par Wani et Khan (2010) pour la souche solubilisatrice de phosphate *Bacillus* sp. PSB10, isolée à partir de la rhizosphère de pois chiche. En effet, la bactérisation par la rhizobactérie *Bacillus* sp. PSB10 a amélioré significativement la croissance, la nodulation et le rendement de graines par rapport aux plantes non bactérisées.

Les observations régulières au niveau du champ ont montré la présence de nodulation de pois chiche issue des semences bactérisées inoculées ou non par FOC1. Plusieurs auteurs ont démontré l'effet bénéfique de la bactérisation avec les espèces de *Bacillus* sur la nodulation (Elkoca *et al.*, 2008 ; Wani et Khan, 2010). Hamaoui *et al.* (2001) ont également rapporté que la bactérisation avec des PGPR a amélioré considérablement la nodulation par les *Rhizobium* natifs de pois chiche.

Couillerot (2009) a signalé que l'interaction entre les PGPR et *Rhizobium* est densité-dépendante. Ainsi, à des concentrations relativement faibles de *Rhizobium*, le nombre de site d'infection n'est pas limitant et la co-inoculation avec une PGPR n'amènera donc vraisemblablement pas d'augmentation de rendement. Cependant, à de fortes concentrations en *Rhizobium*, le nombre de sites d'infections devient limitant et la co-inoculation avec une PGPR va créer de nouveaux sites d'infection pour *Rhizobium*, amenant ainsi une augmentation du rendement.

5.5- Conclusion

Les différentes espèces de *Bacillus* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique et biofertilisants.

Dans le cadre de cette étude, les travaux ont été concentrés principalement sur l'efficacité des espèces de *Bacillus* contre FOC1 et sur l'effet bénéfique à promouvoir les paramètres de croissance et de rendement de pois chiche.

Cette étude a montré que l'action des rhizobactéries testée ne se limite pas seulement à la protection de la plante mais aussi à la stimulation de la croissance des plantes. Ces isolats ont été sélectionnés pour leur meilleur effet antagoniste *in vitro* vis-à-vis de FOC1 et FOC2. De plus, les résultats obtenus par une caractérisation de ces souches y compris la production des substances favorisant la croissance des plantes (AIA, HCN...) et la solubilisation de phosphate, suggèrent que ces isolats peuvent être des PGPR présentant des compétences rhizosphériques en stimulant la croissance végétative. En effet, une meilleure utilisation de ces rhizobactéries nécessite une meilleure compréhension des mécanismes qui interviennent pour stimuler la croissance et/ou protéger la plante.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion Générale Et Perspectives

Les maladies fongiques, en Algérie, constituent pour les légumes secs un problème phytosanitaire majeur et constituent également un facteur limitant aussi bien pour la production de semences que pour la production destinée à la consommation. En effet, l'Algérie accorde une priorité importante à ces cultures. Cependant, avec l'extension des superficies cultivées et l'introduction de nouvelles variétés, les risques d'apparition de nouvelles maladies augmentent sans cesse au même titre que l'apparition de nouvelles races physiologiques.

A l'image de toutes les cultures intensives, celle de pois chiche paie un lourd tribut au parasitisme. En traitant le problème du flétrissement vasculaire de cette culture, nous avons mis en évidence, dans un premier temps, la présence de l'agent causal de la maladie, dans toutes les régions prospectées. L'étude de l'incidence et de la gravité de la maladie sur un plus grand nombre d'aires de culture s'impose.

Une analyse a porté sur des critères morphologiques, biométriques et pathologiques du FOC. Elle a permis de distinguer trois morphotypes et a révélé une variabilité dans l'aspect, la pigmentation du mycélium fongique, ainsi que les mensurations des macros et microconidies. Cette variabilité n'est pas spécifique à FOC mais elle se manifeste chez toutes les formes spéciales de *F. oxysporum*.

Le FOC a été isolé de la tige et des semences à partir des plantes infestées et récoltées dans les champs prospectés. L'inoculation des isolats de FOC au cultivar ILC 482 reconnu pour sa sensibilité vis-à-vis FOC, a permis de confirmer leur pouvoir pathogène. Les isolats inoculés ont montré une variabilité de la virulence dont deux isolats FOC1 et FOC2 ont été les plus virulents. Cette situation de l'agent pathogène rend très difficile le développement de variétés résistantes ainsi que la protection agrochimique n'est pas satisfaisante à cause de son efficacité limitée par l'apparition de phénomène de résistance des races phytopathogènes. Nous avons, donc chercher d'autres alternatives de lutte contre ce champignon phytopathogène.

Les travaux présentés dans cette thèse visaient l'élaboration d'une stratégie de lutte envers FOC, par une approche exploitant l'effet bénéfique de rhizobactéries originaires de la culture de pois chiche. Dans ce contexte, la lutte biologique contre le flétrissement

vasculaire de pois chiche à l'aide de rhizobactéries antagonistes semble être une alternative prometteuse à l'emploi des fongicides.

Certaines rhizobactéries associées à cette culture, particulièrement les espèces de *Bacillus* ont fait l'objet d'explorations suppressives de la maladie causée par FOC *in vitro* et *in vivo*.

Parmi 131 isolats, 29 rhizobactéries ont montré un pouvoir antagoniste $\geq 20\%$ vis-à-vis FOC1 et FOC2 *in vitro*. Les 29 isolats testés ont réduit la croissance mycélienne de ces deux agents pathogènes de 25,63% à 71,11% par confrontation directe et de 14,11% à 45,74% à distance. Nos résultats ont révélé aussi un changement de couleur et une modification de l'aspect du mycélium fongique.

La caractérisation *in vitro* des 29 rhizobactéries antagoniste a démontré que l'ensemble de ces dernières ont la capacité de produire des métabolites secondaires volatiles (HCN), des phytohormones (AIA) et une enzyme qui dégrade la paroi cellulaire du pathogène (Chitinase), même qu'elles ont l'aptitude de solubiliser le phosphate. Toutes ces caractéristiques rendent ces isolats des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR).

Cinq isolats Rb29, Rb4, Rb6, Rb12 et Rb15 ont été choisis comme des rhizobactéries antagonistes les plus performantes et identifiés comme des espèces appartenant au genre *Bacillus* ; il s'agit de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. lentus*, *B. mycoïdes* respectivement. Une identification moléculaire a affirmé que l'isolat Rb29 est une espèce du groupe *B. subtilis/amyloliquefaciens*.

Les essais *in vivo*, ont montré que les cinq espèces de *Bacillus* sélectionnés protégeaient, de manière évidente et à des degrés variables, les plantes de pois chiche bactérisées contre le flétrissement vasculaire, en réduisant l'incidence de cette maladie (IM) de 60% à 99% en pots et de 57,20% à 98% en plein champ. En effet, l'effet répressif de *Bacillus* spp. a résulté en une augmentation de la croissance végétative et reproductive des plantes de pois chiche.

En conclusion, si nous nous reportons au point de départ de cette étude, soit la détection et l'isolement de souches pour le développement d'agents de biocontrôle adaptés aux cultures de pois chiche, nous pouvons affirmer avoir atteint ces objectifs. En effet, nous avons isolé un bon nombre de rhizobactéries et certains de ces isolats ont montré une

forte capacité à inhiber la croissance du pathogène, lors de tests de confrontation *in vitro*, et à empêcher l'expression du FOC par une forte réduction de la maladie *in vivo*.

L'originalité de ce travail de thèse a été, d'une part, de confirmer l'intérêt des rhizobactéries dans le contrôle des maladies des plantes et d'autre part, la mise en évidence de nouveaux candidats appartenant au genre *Bacillus* prometteurs en lutte biologique. Ces derniers pourraient trouver leurs places dans les applications biotechnologiques visant une amélioration des rendements et la préservation de l'environnement pour un développement durable. De nombreux travaux ont pu mettre en évidence des souches modèles, toutefois il faut garantir la stabilité et la reproductibilité des effets bénéfiques de ces rhizobactéries à l'échelle de pratiques agronomiques. Et bien que des biopesticides à base de *Bacillus* spp. sont déjà commercialisés en Europe et aux États-Unis.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives parmi lesquelles :

- Il faut premièrement optimiser pour chaque antagoniste les paramètres mis en évidence par ce travail, à savoir les milieux de culture pour la production des inoculants, l'amendement du sol avec des substances favorisant l'action des antagonistes.
- Il faut également rechercher les mélanges de microorganismes les plus performants ainsi que leur mode d'adjonction optimal.
- De plus, une lutte biologique ne sera couronnée de succès que si l'utilisation des microorganismes antagonistes est intégrée dans un concept global de production, avec une stratégie claire de lutte phytosanitaire. Il est donc nécessaire d'étudier également la compatibilité des antagonistes avec les techniques culturales usuelles.
- L'influence de la variété de la plante-hôte sur la capacité antagoniste des microorganismes doit également être testée; il est en effet possible que les antagonistes protègent mieux certaines variétés, comme par exemple des variétés possédant une résistance partielle aux maladies.
- Purifier les métabolites secondaires produits par les espèces de *Bacillus* et déterminer leur structure.
- Etudier le mécanisme d'action d'éventuelle PGPR : induction du système de la résistance de la plante.

Les résultats obtenus sont encourageants. Certes, divers travaux restent à faire pour finir de développer un produit biologique efficace et employé à grande échelle. Près de

cinquante années de recherches n'ont elles pas été nécessaires entre l'isolement de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) et le premier produit commercial à base de cette bactérie (Grisson, 1971).

Il reste clair que les méthodes utilisées pour le contrôle du *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, ne permettent pas de résoudre définitivement le problème de cette maladie. Il est donc impératif de poursuivre la recherche en vue d'établir la meilleure combinaison des traitements susceptible de conférer une protection maximale de pois chiche contre le flétrissement vasculaire.

L'effet PGPR offre donc des possibilités intéressantes pour une agronomie respectueuse de l'environnement. En effet, une meilleure connaissance et utilisation de ces populations bactériennes pourrait permettre une diminution des fongicides polluants dans les sols agricoles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AAC, 2004.** Pois chiche: Situation et perspectives. Le Bulletin bimensuel. 17 : 15- 4 p.
- AAC, 2006.** Pois chiche: Situation et perspectives. Le Bulletin bimensuel ; 19 : 13- 4 p.
- Abbas A., 1995.** Variation in some cultural and physiological characters and host pathogen interaction of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, and inheritance of resistance to lentil wilt in Syria. Ph.D. Thesis, Faculty Agric. Univ. Aleppo, Syria.
- Abdelguerfi L. M., Bouzidi L., Zine F., Hamdi N., Bouzidi H. et Zidouni F., 2001.** Evaluation de quelques cultivars locaux de pois chiche dans la région de Bejaia. Institutue nationale de larecherche agronomique d'Algérie, 9 : 31-42.
- Abdelguerfi L. M., Zine F., Bouzidi L., Laib M. et Kadri A., 2000.** Caractérisation préliminaire de quelques cultivars locaux de *Cicer areitinum* collectés dans la région de Tizi-Ouzou. Recherche agronomique, 7 : 51-65.
- Adam A., 2008.** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de l'avoie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse PhD. Universitie de Liège.
- Agrios G.N., 2005.** Plant Pathology, 5th Edition, Elsevier Acad. Press, pp: 163-164.
- Ahemad M. and M. Kibret., 2013.** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. Journal of King Saud University-Science. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S., 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol. Res. 163: 173-181.
- Aimé S., Cordier C., Alabouvette C., Olivain C., 2008.** Comparative analysis of PR
- Ait Kaki A., 2013.** Recherche de nouvelles potentialités de bactéries du genre *Bacillus* pour l'agriculture et l'agroalimentaire. Thèse de doctorat Doctorat troisième cycle, Université Constantine 1, 113p.
- Akhtar M. S., Siddiqui Z. A., 2008.** Biocontrol of a root-rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices*, *Rhizobium* sp., and *Pseudomonas straita*. Crop Prot. 27 (3–5): 410–417.
- Aktuganov G. E., Galimzyanova N. F., Melent'ev A. I., Kuz'mina L. Yu., 2007.** Extracellular Hydrolases of Strain *Bacillus* sp. 739 and Their Involvement in the Lysis of Micromycete Cell Walls Mikrobiologiya, Vol. 76, 4: 471–479.
- Alabouvette C., Couteaudier Y., and Louvet J., 1984.** Recherches sur la résistance des sols aux maladies. X-Comparaison de la mycoflore colonisant les racines de melons cultivés dans un sol rééistant ou dans un sol sensible aux fusarioses vasculaires, Agronomie, 4: 735.
- Alabouvette C., Lemanceau P., Steinberg C., 1993.** Recent advances in biological control of fusarium wilts. Pesticide Sciences 37: 365–373.
- Alabouvette C., Olivain C., Steinberg C., 2006.** Biological control of plant diseases: the European situation. European Journal of Plant Pathology, Vol. 114, No. pp. 329–341.
- Alabouvette, C., 1986.** Fusarium wilt suppressive soils from the Chateaufrenard region. review of a 10 year study. Agronomie 6, 273–284.
- Ali S. k. Z, Sandhya V., Grover M., Kishore N., Rao L.V., and Venkateswarlu B., 2009.** *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. Biol. Fert. Soils. 46: 45–55

- Alikhani H. A., Saleh-Rastin N. and Antoun H., 2006.** Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant and Soil* (2006) 287:35–41.
- Allen G., Pereiral L., Races D. et Smith M., 1998.** Crop evapotranspiration guidelines for computing crop water requirement FAO Irrigation and drainage, 56 p.
- Amal-Asran A., 2001.** Studies on the cotton rhizosphere microorganisms and their role in biocontrol of root infecting fungi. Ph.D. thesis, Faculty of Agriculture Cairo Univeristy, Cairo, Egypt, 155 pp.
- Amkraz N., 2013.** Utilisation des *Pseudomonas* spp. *fluorescents* et des plantes aromatiques et médicinales contre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agent du chancre bactérien de la tomate. Thèse de doctorat, université Ibn Azohr-Agadir, 230p.
- Amstrong G., et Amstong J.K., 1974.** Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, causal agents of wilt of pea. *Phytopathology*, 64: 849-857.
- Ann M. H., Dietz B. W., David B. M., Julie C., Brett T. and John I. Y., 2003.** Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecological Society of America* 84 (4), pp. 858- 868.
- Anonyme1.** <http://informationsdocuments.com/environnement/coppermine15x/displayimage.php?pid=6904>.
- Ansar Ahmad M., 2010.** Variability in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for Chickpea Wilt Resistance in Pakistan. Thèse de Doctorat, 162p.
- Aouar L., 2012.** Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine, 201p.
- Appel O. et Wollenweber H. W., 1910.** "Grundlagen einer Monographie der Gattung *Fusarium* (Link)" (Foundations for a monograph of the genus *Fusarium* Link) in *Arbeiten aus der Kaiserlichen anstalt für Land- und Forstwirtschaft* (Works of the royal institute for land and forest management) 8p, 1 – 207.
- Aragno M. and Tarnawski S., 2002.** Microbial communities in the rhizosphere: structures and process. *Bulletin de la société Suisse de Pédologie* 26: 21-25.
- Araujo F. F., Henning A., Hungria M., 2005.** Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.21, p.1639-1645.
- Arkhipova T. N., Veselov S. U., Melentiev A. I., Martynenko E. V. et Kudoyarova G. R., 2005.** Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil*. 272: 201–209.
- Armengol G., Escobar M. C., Maldonado M. E., Orduz S., 2007.** Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. *J Appl Microbiol.*, 102(1):77-88.
- Arshad M. and Frankenberger W.T. Jr., 1998.** Plant growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Advances in Agronomy* 62: 146–151.
- Arunodhayam K., Eswara Reddy N. P. and Madhuri V., 2014.** Pathogenicity and management of *Fusarium* wilt of chickpea, *Cicer arietinum* L. – A review *Current Biotica* 7(4): 343-358.

- Aseri G.K., Jain N., Tarafdar J. C., 2009.** Hydrolysis of organic phosphate forms by phosphatases and phytase producing fungi of arid and semi-arid soils of India. *Am-Eurasian J Agric Environ Sci* 5:564–570.
- Athukorala SNP., Fernando W. G. D., Rashid K. Y., 2009.** Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry *Can J Microbiol*, 55: 1021-1032.
- Baayen R. P., Van der Boogert P. H. J., Bonants P. J. M., Poll J. T. K., Blok W. J., Waalwijk C., 2000.** *Fusarium redolens* f.sp. *asparagi*, causal agent of asparagus root rot, crown rot and spear rot. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 907–912.
- Baig K., Arshad M., Zahir Z., Cheema M., 2010** Comparative efficacy of qualitative and quantitative methods for rock phosphate solubilization with phosphate solubilizing rhizobacteria. *Soil Environ.* 29, 82-86.
- Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S., Vivanco J. M., 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 233–266 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.
- Banerjee S., Palit R., Sengupta Ch., Standing D., 2010.** Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *AJCS* 4(6):378-383.
- Barazani O. and Friedman J., 1999.** Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *J. Chem. Ecol.* 25:2397-2406.
- Bardin S.D., Huang H.C., Liu L., Yanke L. J., 2003.** Control, by microbial seed treatment, of damping-off caused by *Pythium* sp. on canola, safflower, dry pea, and sugar beet. *Can. J. Plant Pathol.* 25: 268-275.
- Barnabé S., 2000.** Utilisation des boues d'épuration comme substrat pour la production de biopesticides: induction abiotique de la sporulation chez *Bacillus thuringiensis*. Mémoire, Université du Québec INRS-Eau, 151p.
- Bashan Y. and De-Bashan L. E., 2005.** Bacteria. pp: 103-115. In: *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Hillel D.(ed.). Elsevier, Oxford, U.K.
- Basis for a disease control system, pp. 340-349.
- Beckman C.H., 1987.** *The Nature of Wilt Diseases of Plants*. (St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press).
- Beckman C.H., Roberts E.M., 1995.** On the nature genetic basis for resistance tolerance of fungal wilt diseases. *Advances in Botanical Research*, 21: 35-77.
- Belabid L., 2003.** La fusariose vasculaire de la lentille (*Lens culinaris* Med.) dans le Nord-Ouest Algérien : Morphologie et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Emend. S. & H. f. sp. *lentis* (Vasud. & Srin.) en relation avec la répartition géographique et le pouvoir pathogène. Thèse de Doctorat, Université d'Oran.
- Belabid L., Baum M., Fortes Z., Bouznad Z. and Eujayl I. , 2004.** Pathogenic and Genetic Characterization of Algerian Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. *Afr. J. Biotechnol.* 3: 25-31.
- Ben Mbarek K. (2011).** Comportement du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) du type « kabuli » vis-à-vis du stress hydrique et identification de génotypes tolérant la sécheresse. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, 280p.

- Benbrook C. M., Groth E., Halloran J. M., Hansen M. K., Marquardt S., 1996.** Pest Management at the Crossroads. Consumers Union, Yonkers p. 272
- Beneduzi A., Ambrosini A. and Passaglia L. M. P., 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 4 (suppl), 1044-1051.
- Benhamou N., Garand C., Goulet A., 2002.** Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4044–4060.
- Benidire L., Daoui K., Fatemi Z.A., Achouak W., Bouarab L., Oufdou K., 2015.** Effet du stress salin sur la germination et le développement des plantules de *Vicia faba* L. (Effect of salt stress on germination and seedling of *Vicia faba* L.). *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (3) (2015) 840-851.
- Benzohra I., Seddik Bendahmane B., Labdi M. and Youcef Benkada M., 2012.** Determination of pathotypes and physiological races in *Ascochyta rabiei*, the agent of ascochyta blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Algeria. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 7(7), pp. 1214-1219.
- Benzohra I., Seddik Bendahmane B., Labdi M. and Youcef Benkada M., 2013.** Sources of Resistance in Chickpea Germplasm to Three Pathotypes of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. In Algeria. *World Applied Sciences Journal* 21 (6): 873-878.
- Berg G., Fritze A., Roskot N., and Smalla K., 2001,** Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. *J. Appl. Microbiol.* 91: 963-971.
- Berg G., Krechel A., Ditz M., Sikora R.A., Ulrich A., Hallmann J., 2005.** Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol*, 51: 215–229.
- Berger J. D., Ali M., Basu P. S., Chaudhary B. D., Chaturvedi S. K., Deshmukh P. S., Dharmaraj P. S., Dwivedi S. K., Gangadhar G. C., Gaur P. M., 2006.** Genotype by environment studies demonstrate the critical role of phenology in adaptation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to high and low yielding environments of India. *Field Crops Research* 98: 230-244.
- Berger J., Abbo S., et Turner N.C., 2003.** Ecogeography of annual wild Cicer species: The poor state of the world collection. In: *Plant Genetic Resources*. *Crop Sci.* 43: 1076-1090.
- Bergey D. H., Breed R. S., Murray E. G. D. et Hitchens A. P., 1939.** Bergey's manual of determinative bacteriology, 5th edn. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Berliner E., 1911.** Ueber die Schlafsucht des Mehlmotteraupe. *Zeitschrift der Gesamte Getreidewesen* 3: 63-70.
- Berta G., Fusconi A., Hooker J.E., 2002.** Arbuscular mycorrhizal modifications to plant root systems. In: Gianinazzi S. & Schuepp H., eds. *Mycorrhizal technology: from genes to bioproducts achievement and hurdles in arbuscular mycorrhizal research*. Basel, Switzerland: Birkhäuser, 71-101.
- Bertrand H., Plassard C., Pinochet X., Touraine B., Normand P., et Cleyet-Marel J.C., 2000.** Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can. J. Microbiol.*, 46:229 – 236.

- Blancard D., 1988.** Maladies de la Tomate: Observer, Identifier, Lutter. INRA IPHM-Revue horticole, Paris, France. 212p.
- Bleecker A. B. et Kende H., 2000.** Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. Annual Review of Cell and Developmental Biology 16: 1-18
- Blumer, C., and D. Haas. 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Arch Microbiol 173:170-177.
- Bogas A.C., Watanabe M.A.E., Barbosa A., Vilas-Boas L.A., Bonatto A.C., Dekker R., Souza E.M., Fungaro M.H.P., 2007.** Structural characterization of the bglH gene encoding a beta-glucosidase-like enzyme in an endophytic *Bacillus pumilus* strain. Genetics and Molecular Biology 30(1):100-104.
- Bolwerk A., Lagopodi A. L., Wijfjes A. H., Lamers G. E., Chin A. W. T., Lugtenberg B. J. J., Bloemberg G. V., 2003.** Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. Molecular Plant Microbe Interactions, 16: 983-993.
- Booth C., 1971.** The genus *Fusarium*. Kew (surrey): Common Wealth Mycologica Institute, England. pp 137.
- Bottone E.J., Peluso R.W., 2003.** Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: preliminary report. J Med Microbiol., 52(1):69-74.
- Boudemagh A., 2007.** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de doctorat, Université Mentouri Constantine, 144p.
- Boudyach E. H., 2004.** Lutte biologique contre le chancre bactérien de la tomate : sélection des bactéries antagonistes à *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* et évaluation de leur efficacité dans le contrôle du chancre bactérien. Thèse D'état Es-sciences. Option phytopathologie. Faculté des sciences d'Agadir, Maroc. pp134.
- Bouslama M., 1980.** Chickpea Improvement in Tunisia, in: Proc. Int. Workshop Chickpea Improvement. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru, India, pp. 277-280.
- Bouznad Z., Maatougi M.E., Labdi M., 1996.** Importance et distribution géographique des maladies fongiques des légumineuses alimentaires en Algérie. Proceedings du Symposium Régional sur les Maladies de Céréales et Légumineuses Alimentaires, Rabat 1996: 13-19.
- Bressan W., et Fontes Figueiredo J.E., 2010.** Chitinolytic *Bacillus* spp. isolates antagonistic to *Fusarium moniliforme* in maize. Journal of Plant Pathology Vol. 92, No. 2, pp. 343-347.
- Bric J. M., Bostock R. M. et Silverstone S. E., 1991.** Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl. Env. Microbiol. , 533-538.
- Broadbent P., Baker F., Waterworth J., 1971.** Bacterial and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australia Melbourne soil. Australian Journal of Biological Science, Melbourne, 24:925-944.
- Brown ME., 1974.** Seed and root bacterization. Annu Rev Phytopathol 12, 181-197.

- Bulit J., Bouhot D., Louvet J., Toutain G., 1967.** Recherches sur les fusarioses. Travaux sur le Bayoud fusariose vasculaire du palmier dattier en Afrique du Nord. Annales des Epiphyties, 18 213-239.
- Carranza J. M. 1965.** Wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) caused by *B. cinerea* (in Spanish) Revta. Fac. Agron. Univ. Nae. La Plata, 41:135-138.
- Cassidy M. B., Lee H., Trevors J. T., 1996.** Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 16: 79-101.
- Castric P., 1994.** Influence of oxygen on the *Pseudomonas aeruginosa* hydrogen cyanide synthase. Curr. Microbiol. 29: 19-21.
- Cattelan A. J., Hartel P. G. et Fuhrmann J. J., 1999.** Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Sci. Soc. Am. J., 63: 1670-1680.
- Chanway C.P. & Holl F.B., 1993.** Ecological growth response specificity of two Douglas-fir ecotypes inoculated with coexistent beneficial rhizosphere bacteria. Can. J. Bot., 72, 582-586.
- Charest M. H., Beauchamp C. J., Antoun H., 2005.** Effects of the humic substances of deinking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. FEMS Microbiology Ecology 52, 219-227.
- Cheikh Rouhou M., 2006.** Évaluation des classifications phylogénétiques des bacillaceae basées sur les gènes de l'opéron *rrn* et de gènes de ménage. Mémoire en biologie, Université du Québec à Montréal, 114p.
- Chen Y. P., Rekha P. D., Arun A. B., Shen F. T., Lai W. A., Young C. C. 2006.** Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl. Soil Ecol. 34, 33-41.
- Cherif H., 2014.** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1, 162p.
- Chernin L., Chet I., 2002.** Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests. In, Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. Burns, R.G., Dick, R.P., eds. Marcel Dekker: New York, pp. 171-225.
- Chet I. et J. Inbar., 1994.** Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochem. Biotechnol. 48: 37-43.
- Chiarini L, Bevivino A, Dalmastri C, Nacamulli C. Tabacchioni S., 1998.** Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize root. Appl Soil Ecol.;8:11-18.
- Collier FA, Elliot SL, Ellis RJ., 2005.** Spatial variation in *Bacillus thuringiensis/cereus* populations within the phyllosphere of broad-leaved dock (*Rumex obtusifolius* and surrounding habitats. FEMS Microbiol Ecol 54: 417-425.
- Collins D.P. and Jacobsen B.J., 2003.** Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet *Cercospora* leaf spot. Biol. Control. 26(2):153-161.
- Cook R. J. et Baker K. F., 1983.** The nature and practice of biological control of plant pathogens. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul.

- Cook R. J., 1993.** Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31: 53-80.
- Couillerot O., 2013.** Compatibilité des bactéries phyto-bénéfiques *Azospirillum* et *Pseudomonas* dans la rhizosphère. Thèse de Doctorat, 254p.
- Dastager S. G., Deepa C. K. and Pandey A., 2010 .**Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J.Microbiol. Biotechnol.*, 27: 259-265.
- Davis P.H., 1969.** Materiel for a flora of Turkey, XIX -Leguminosae - Viciae, Notes Roy. Bot. Gard. Ed. 29: 312-313.
- de Freitas J. R., Germida J. J., 1999.** Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Revue canadienne de microbiologie*, 1990, 36(4): 265-272.
- Dekkers L. C., Mulders I. H. M., Phoelich C. C., Chin-A-Woeng T. F. C., Wijffjes A. H. M., Lugtenberg B. J. J., 2000).** The sss colonization gene of the tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13:1177-1183.
- Diener A. C., Ausubel F. M., 2005.** Resistance to *Fusarium oxysporum* a dominant Arabidopsis disease-resistance gene, is not race-specific. *Genetics* 171: 305-321.
- Di Pietro A., Madrid M. P., Caracuel Z., Delgado-Jarana J., Roncero M. I. G., 2003.** *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus *Molecular Plant Pathology*, 4: 315-325.
- Digat B., 1989.** La bacterisation des semences: possibilités et perspectives. *Bulletin de la Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences* 108 : 10-13.
- Digat B., 1992.** Contrôle biologique et stimulation de la germination par la bactérisation [PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), EPR (emergence promotion rhizobacteria)]. *Phytoma La Defense des Vegetaux* (441) : 35-38.
- Digat B., Caille C., Guigneault P., Trillot M., 1988.** Pommier. Fertilisation bactériologique. *Infos-CTIFL* 41, 8-12.
- Dihazi A., 2012.** Interaction Palmier dattier *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* : Induction des réactions de défense par l'acide salicylique et rôle de quelques microorganismes antagonistes de l'agent pathogène dans le contrôle de la maladie du Bayoud. Thèse de doctorat, Université Ibn Zohr, Agadir, 204p.
- Dileep Kumar B.S., 1999.** Fusarial wilt suppression and crop improvement through two rhizobacterial strains in chickpea growing in soils infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Biol. Fert. Soils* 29(1): 87-91.
- Dobbelaere S., Vanderleyden J. and Okon Y., 2003.** Plant growthpromoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *CRC Crit Rev Plant Sci* 22:107-149.
DOI 10.1007/978-3-642-21061-7_1, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Dowling D. N. and O'Gara F., 1994.** Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology*, 12 (Suppl 4): 133-141.
- Edel V., Steinberg C., Avelange I., Laguerre G and Alabouvette C., 1995.** Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85: 579-585.

- Edi-Premono M, Moawad A. M. et Vlek P. L. G., 1996.** Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indones. J. Crop Sci.* 11:13-23.
- El Aoufir A. 2001.** Étude du flétrissement vasculaire du pois Chiche (*Cicer arietinum*) causé par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Evaluation de la Fiabilité de L'analyse Isoenzymatique et de la compatibilité végétative pour la caractérisation des races physiologiques. Thèse de doctorat, Université Laval, Canada, 161 pp.
- El Hassni M., El Hadrami A., Daayf F., Chérif M., Ait Barka E., El Hadrami I. 2007.** Biological control of bayoud disease in date palm: selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. *Environ. Exp. Bot.* 59 (2): 224–234.
- Elfatih M., Ali K., Inanaga S. and Sugimoto Y., 2002.** Sources of resistance to *Fusarium* wilt of chickpea in Sudan, *Phytopathol. Mediterr.* 41, 163–169.
- Elkoca E., Kantar F., Sahin F., 2008.** Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *J. Plant Nutr.* 31:157–171.
- Ellis R. J., Timms-Wilson T. M., Bailey M. J., 2000.** Identification of conserved traits in *fluorescent pseudomonads* with antifungal activity. *Environ. Microbiol.* 2:274-284.
- El-Mohamedy R. S. R. and Abd El-Baky M. M. H., 2008.** Evaluation of different types of seed treatment on control of root rot disease, improvement, growth and yield quality of pea plant in Nabaria province. *Res.J. Aric & Boil.Sci.*, 4(6): 611-622.
- Emmert E.A.B. and Handelsman J., 1999.** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS. Microbiol. Lett.* 171, 1-9.
- Errakhi R., 2008.** Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc.
- Errington J., 2003.** Regulation of endospore formation in *B. subtilis*. *Nat Rev Microbiol* 1: 117–126.
- Essalmani H., 2004.** Contribution à l'étude de la lutte biologique contre la fusariose vasculaire (*Fusarium oxysporum* F. SP. *Lentis*) de la lentille au Maroc. Thèse de doctorat, Université Mohammed V- Agdal, Rabat.
- Fang Z.D., 1998.** *Plant Pathology Technology*. 3rd ed. Chinese Agriculture Press, 243 pp.
- Fiddaman P.J., Rossall S., 1995.** Selection of bacterial antagonists for the biological control of *Rhizocotonia solani* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Pathol.* 44(4): 695-703.
- Figueiredo M. V. B., Seldin L., de Araujo F.F. and Mariano R. L. R., 2010.** Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, D.K. Maheshwari (ed.), DOI 10.1007/978-3-642-13612-2_2.
- Fitriatin B. N., Arief D. H., Simarmata T., Santosa D. A. and Joy B., 2011.** Phosphatase-producing bacteria isolated from Sanggabuana forest and their capability to hydrolyze organic phosphate. *Journal of Soil Science and Environmental Management* Vol. 2(10), pp. 299-303.
- Fravel D., Olivain C., Alabouvette C., 2003.** *Fusarium oxysporum* its biocontrol. *New Phytologist*, 157: 493–502.
- Fravel D.R., 2005.** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 337-359.

- Frederix M. J. J., Den Brader K., 1989.** Résultats des essais de désinfection des sols contenant des échantillons de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. FAO/PNUD/RAB/88/024. Ghardaia, Algérie.
- Fritze, D., 2004.** Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, 94(11):1245-1248.
- Fuchs J. G., Moenne-Loccoz Y., Defago G., 1997.** Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato. *Plant Disease*, 81:492–496.
- Fukuda H, Takahashi M, Fujii T, Ogawa T., 1989.** Ethylene production from L-methionine by *Cryptococcus albidus*. *J Ferment Bioeng* 67:173–175
- Gardener B. B. M., 2004.** Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. *Agricultural Systems Symposium the Nature and Application of Biocontrol Microbes: Bacillus* spp. *Phytopathology* 94 (11): 1252–1258.
- Gaur P. M., Tripathi S., Gowda C.L.L., Ranga Rao G.V., Sharma H.C., Pande S. and Sharma M., 2010.** Chickpea Seed Production Manual. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 28 pp.
- gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 73: 9-15.
- Gerhardson B., 2002.** Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.* 20, 338-343.
- Glick B.R., Karaturovic D.M., Newell P.C., 1995.** A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *Pseudomonas*. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 533-536.
- Glick B.R., Todorovic B., Czarny J., Cheng Z., Duan J., McConkey B., 2007.** Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit Rev Plant Sci* 26:227–242
- Govindasamy V., Senthilkumar M., Magheshwaran V., Kumar U., Bose P., Sharma V., and Annapurna K., 2010.** *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for Sustainable Agriculture. In: D.K. Maheshwari (ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, Microbiology Monographs 18, DOI 10.1007/978-3-642-13612-2_15.
- Gray E. J, Smith D. L., 2005.** Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant bacterium signaling process. *Soil Biol Biochem* 37:395–412
- Grison P., 1971.** Co-ordination of international effort and industrialization. Dans: *Microbial control of insects and mites*, H. D. Burges «fe N. W. Hussey (eds), Académie Press, London, New York, pp. 679-686.
- Gupta O. M, Kotasthane S. R. et Khare M. M., 1987.** Factors influencing epidemiology of vascular wilt of chickpea. *Proc. Natl. Acad. Sci., India* 57: 86-91. Haware, 1988
- Gupta O. M., Kotasthane S. R. et Khare M. M., 1986.** *Fusarium* wilt of chickpea (*Cicer arietinum*). *Agricult. Rev.* 7: 87-97.
- Gupta R., Singal R., Shankar A., Kuhad R. C. and Saxena R. K., 1994.** A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40, 255–260.
- Halila I., Cobos M. J., Rubio J., Millán T., Kharrat M., Marrakchi M., Gil J., 2008.** Tagging mapping a second resistance gene for *Fusarium* wilt race 0 in chickpea. *European Journal of Plant Pathology*, 124:87-92.
- Halila M. H. and Strange R. N., 1996.** Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 67–74.

- Hamadache A. et Ait Abdallah F., 1998.** Lutte contre les adventices en culture du pois chiche d'hiver : un facteur déterminant pour la valorisation du matériel végétal et du semis précoce. Céréaliculture N°33.
- Hamaoui B., Abbadi J.M., Burdman S., Rashid A., Sarig S., Okon Y., 2001.** Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. Agronomie 21: 553-560.
- Hamill J. D., 1993.** Alterations in auxin and cytokinin metabolism of higher plants due to expression of specific genes from pathogenic bacteria: a review. Aust. J. Plant Physiol. 20, 405-423.
- Hartwig U. A., Joseph, C. M., and Phillips, D. A., 1991.** Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. Plant Physiol. 95:797-803.
- Haas D., and Keel C., 2003.** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 41:117-153.
- Haware M. P, Nene Y. L and Mathur SB., 1986.** Seed-borne diseases of chickpea. Technical Bulletin, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries.
- Haware M. P., Nene, Y. L. and Rajeshware R., 1978.** Eradication of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* transmitted in chickpea seed. Phytopathology. 68:1364-1367.
- Haware, M.P. 1990.** Fusarium wilt and other important diseases of chickpea in the Mediterranean area. Options Mediterr. Ser. Semin. 9:163-166.
- Hawkins L. K., Dane F., Kubisiak T. L., Rhodes B. B., Jarret R. L., 2001.** Linkage mapping in a watermelon population segregating for Fusarium wilt resistance. Journal of the American Society for Horticultural Science, 126:344-350.
- Hernández C. F. D. C., Reyes C. F., Morales G. G., Herrera R. R. and Aguilar C., 2013.** Biological Control of Root Pathogens by Plant- Growth Promoting Bacillus spp., Chapter 4, <http://dx.doi.org/10.5772/54229>.
- Hervas A., Landa B. B., Jimenez-Díaz R. M., 1997.** Influence of chickpea genotype and *Bacillus* sp. on protection from Fusarium wilt by seed treatment with non pathogenic *Fusarium oxysporum*. Eur. J. Plant Pathol. 103: 631-642.
- Hilbert D. W., Piggot P. J., 2004.** Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. Microbiology Molecular Biology Reviews, 68, 234-262.
- Hinsinger P., 2001.** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes: a review. Plant Soil 237:173-195
- Holl F. B. et Chanway CP., 1992.** Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. Can. J. Microbiol. 38: 303-308.
- Holt J.G., Kreig N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T., 1994.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 816 p.
- Hoster F., Schmitz J. E., Daniel R., 2005.** Enrichment of chitinolytic microorganisms isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel streptomyces strain. Appl. Microbiol. Biotechnol 66:434-442.

- Huang C. J., Wang T. K., Chung S. C., Chen C. Y., 2005.** Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus*. *J Biochem Mol Biol Sci*. 2005;38:82–88. doi: 10.5483/BMBRep.38.1.082.
- Huang C. J., Wang T. K., Chung S. C., Chen C. Y., 2004.** Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38(1):82-88.
- ICRISAT, 1990.** Chickpea in the nineties. Proc. Second Int. Workshop on Chickpea Improvement. Patancheru, Inde.
- ICRISAT, 2008.** Pois chiche. www.mapageweb.umontreal.ca/bruneaua/simon/chapitre11legumineuses2.pdf. webmaster-icrisat@cgiar.org Chickpea Consulté le 4/7/2008.
- Idris HA., Labuschagne N., Korsten L., 2007.** Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biol. Control* 40:97-106.
- Illmer P. A., Barbato A., Schinner F., 1995.** Solubilization of hardly soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol Biochem*, 27:260–270.
- Inbar J. and Chet I., 1991.** Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil borne plant pathogens by this bacterium. *Soil Biol. Biochem.* 23: 973-978.
- Iqbal S. M., Haq I. U., Bukhari A., Ghafoor A. and Haqqani A. M., 2005.** Screening of chickpea genotypes for resistance against *Fusarium* wilt. *Mycopath.* 3(1-2):1-5.
- Jackson P. J. 1., Hill K. K., Laker M. T., Ticknor L. O., Keim P., 1999.** Genetic comparison of *Bacillus anthracis* and its close relatives using amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction analysis. *J Appl Microbiol.* 1999 Aug;87(2):263-9.
- Jackson S. G., Goodbrand R. B., Ahmed R., Kasatiya S., 1995.** *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett. Appl. Microbiol.* 21 103–105
- Jaiswal R. et Singh N.P., 2001.** Plant Regeneration from NaCl Tolerant Callus/Cell Lines of Chickpea, International Chickpea and pigeonpea Newsletter; N°8; ICRISAT International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Andhra Pradesh; 73 pages.
- Jalali B. L., Chand H., 1992.** Chickpea wilt. In: Singh, U.S., Mukhopadhyay, A.N., Kumar, J., Chaube, H.S. (Eds.), *Plant Diseases of International Importance, Diseases of Cereals and Pulses*, vol. I. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA, pp. 429-444.
- Jiménez-Díaz R. M., Castillo P., Jiménez-Gasco M. d. M., Landa B., Navas-Cortés J. A., 2015.** *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management, *Crop Protection*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.023>
- Jimenez-Diaz R. M. et Trapero-Casas A., 1988.** Improvement of chickpea resistance to wilt and root rot diseases. In: *Proceeding on Present status and Future Prospects of Chickpea Crop production and Improvment in the Mediterranean Countnes*, 11-13 Jul. Spain.
- Jiménez-Díaz R. M., Castillo P., Jiménez-Gasco M. d. M., Landa B., Navas-Cortés JA., 2015.** *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management, *Crop Protection*, 1-2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.023>

- Jimenez-Fernandez D., Landa B.B, Kang S., Jimenez-Díaz R.M., Navas-Cortes J.A, 2013.** Quantitative and microscopic assessment of compatible and incompatible interactions between chickpea cultivars and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races. PLoS One 8: 61-66.
- Jiménez-Gasco M.M. et Jiménez-Díaz R. M, 2003.** Development of a Specific Polymerase Chain Reaction-Based Assay for the Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and Its Pathogenic Races 0, 1A, 5, and 6. The American Phytopathological Society 93 : 200-209.
- Jimenez-Gasco M. M., Navas-Cortes J. A. and Jimenez-Díaz R. M., 2004.** The *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* / *C. arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. Int. Microbio. 7:95–104.
- Jourdan E., Ongena M. and Thonart P., 2008.** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 12, 437-449.
- Jukanti A. K., Gaur P. M., Gowd C. L., Chibbar R. N., 2012.** Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. Br. J. Nutr. 108, S11-S26.
- Jukanti A. K., Gaur P. M., Gowda C. L. L. and Chibbar R. N., 2012.** Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. British Journal of Nutrition, vol. 108, S1, pages S11-S26.
- Kamilova F., Kravchenko L.V., Shaposhnikov A.I., Makarova N. and Lugtenberg. B. J. J., 2006.** Effects of the Tomato Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the Biocontrol Bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the Composition of Organic Acids and Sugars in Tomato Root Exudate. MPMI 19(10): 1121–1126.
- Kapoor A. S., Sugha S. K. and Gupta V. P., 1991.** Varietal resistance to *Fusarium* wilt and *Aschochyta* blight chickpea. Ind. J. Pulses. Res. 4(1): 122-123.
- Karimi K., Amini J., Harighi B., Bahramnejad B., 2012.** Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. Australian Journal of Crop Science 6(4):695
- Kaur R., Kaur J. and Singh R. S., 2010.** Nonpathogenic *Fusarium* as a Biological Control Agent. Plant Pathology Journal, 9: 79-91.
- Kausar A.G., 1960.** Gram Wilt. P: 23. In “Fifty Years of Investigation on Plant Diseases.
- Klein K. K. and Correll J. C., 2001.** Vegetative compatibility group diversity. In: Summerell BA, Leslie JF, Beckhouse D, Bryden WL, Burgess LW (eds) *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St Paul, MN, pp 83–96.
- Kleopfer J. W. and Beauchamp C. J., 1992.** A review of issues related to measuring colonization of plant root by bacteria. Can. J. Microbiol. 38:1219-1232.
- Kleopfer J. W., Lifshitz R., Zablotowicz RM., 1989.** Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol 7:39–44.
- Kleopfer JW., Ryn CM. et Zhang S., 2004.** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. Phytopathol., 94: 1259-1266.
- Konate I, 2007.** Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) et des Bactéries Endophytes qui lui sont Associées. Thèse de doctorat, Université Mohammed V, Rabat, P196.

- Korsten L., De Jager E.S., De Villiers E. E., Lourens A., Wehner F. C., 1995.** Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases. *Plant Disease* 79: 1149-1156.
- Kumar A., Kumar A., Devi S., Patil S., Payal C., Negi S., 2012.** Isolation and screening and characterization of bacteria from rhizospheric soils for different plant growth promotion activities: an in vitro study. *Recent Research in Science and Technology* 4, 1-5.
- Kumari S. G., Makkouk KH. M., Loh H. M., Negassi K., Tsegay S., Kidane R., Kibret A. and Tesfatsion Y., 2008.** Viral diseases affecting chickpea crops in Eritrea *Phytopathol. Mediterr*, 47: 42–49
- Labdi M., 1990.** Chickpea in Algeria. *CIHEAM-Options Mediterr. Sémin . 9* : 137-140.
- Ladizinsky G. et Alder A., 1975.** Seed protein electrophoresis of the annual species of *Cicer* L. *Israel. J. Res.* 25(1), 61-64.
- Ladizinsky G., 1987.** Pulse domestication before cultivation. *Econ. Bot.* 41: 60-65.
- Landa B. B., Hervas A., Bethiol W., Jimenez-Diaz R. M., 1997.** Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica* 25 (4): 305–318.
- Landa B. B., Navas-Cortés J. A., and Jiménez-Díaz R. M., 2004.** Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* 94:946-960.
- Latin R. X. and Snell S. J., 1986.** Comparison of methods for inoculation of Muskmelon with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Plant Dis.*, 70: 297-300. Mabsoute *et al.*, 1996 ;
- Laumont P. et Chevassus A., 1956.** Note sur l'amélioration du pois chiche en Algérie. *Ann. Ins. Agr. ; des services de recherches et d'expérimentation agricoles de l'Algérie. Tome X, Fax 2, Juillet 1956.* 24 p.
- Lemanceau P., 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp. *fluorescents*. *Agronomie* 12 :413-437.
- Leslie J.F., Summerell B.A., 2006.** The *Fusarium* Laboratory Manual; Blackwell Publishing; Oxford, UK.
- Lesuffleur F., Paynel F., Bataille M. P., Deunff E., and Cliquet J. B., 2007.** Root amino acid exudation: Measurement of high efflux rates of glycine and serine from six different plant species. *Plant and Soil* 294: 235–246.
- Liu W., Mu W., Zhu B., Liu F., 2008.** Antifungal activities and components of VOCs produced by *Bacillus subtilis* G8. *Curr Res Bacteriol* 1:28–34.
- Lugtenberg B., Kamilova F., 2009.** Plant-growth-promoting-rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63: 541-556.
- Llorensa A., Hinojoa M. J., Mateob R., González-Jaénc M. T., Valle-Algarab F. M., Logriecod A., Jiménez M., 2006.** Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA), *International Journal of Food Microbiology* Volume 106, Issue 3, 15, Pages 297–306.
- Logan N. A., Berge O., Bishop A. H., Busse H.-J., De Vos P., Fritze D., Heyndrickx M., Kämpfer P., Rabinovitch L., 2009.** Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2114–2121.

- Logan N. A., Hoffmaster A., Shadomy S.V. and Stauffer K., 2011.** *Bacillus* and related genera. In Manual of Clinical Microbiology ed. Versalovic, J., Carroll, K.C., Funke, G., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. and Warnock, D.W., 10th, edn, Vol. 1, pp. 381–402 Washington D. C: American Society for Microbiology.
- Logan NA., De Vos P., 2009.** Genus *J. Bacillus* Cohn 1872, 174 dans P. De Vos, G. M. Guarritty, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K-H. Schleifer, W. B. Whitman (eds) Bergey's Manual of systematic bacteriology, vol. 3. 2nd edn. NY, Springer, New York, USA, pp 21-128.
- Loper J. E et M. N. Scroth., 1986.** Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology*, 76: 386-389.
- Loqman S., 2009.** La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne-Ardenne, 216p.
- Lorito M., Farkas V., Rebuffat S., Bodo B. and Kubicek C. P., 1996.** Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 178: 6382–6385.
- Lugtenberg B. J. J., Bloemberg G. V., Bolwerk A., vanden Broek D., CazorlaLopez F., ChinAWoeng T. F. C., Eijkemans K., Kamilova F. D., Kuiper, I., Mulders I. H., van Rij E. T., deWeert S., 2004.** Biocontrol of pathogens. In: *Biology of plant microbes interactions*, (eds) Tikhonovich I., Lugtenberg, B.J.J., Provorov, N. vol 4 th International Society for Molecular PlantMicrobe Interactions, St Paul, Minnnesota. USA. pp 305-309.
- Lugtenberg B. J. J., de Weger L. A, Bennett J. W., 1991.** Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. *Current Opinion in Microbiology* 2,457–464.
- Mahaffee W. F. and et Backman P. A., 1993.** Effects of seed factors on spermosphere and rhizosphere colonization of cotton by *Bacillus* GB03. *Phtopatholog* 83: 1120-1125.
- Maheshwari D. K., 2011.** *Bacteria in Agrobiolgy: (ed.), Plant Nutrient Management*,
- Malhotra R. S., Pundir K. P. et Slinkard A. E., 1987.** Genetic ressources of chickpea. pp. 11-34 In: Saxena H.C. and K.B Singh. (reds). *The Chickpea* CAB International, Wallingford, U. K.
- Mallesh., 2008.** Plant growth promoting rhizobacteria, their characterization and mechanisms in the suppression of soil borne pathogens of coleus and ashwagandha. These PhD, University of Agricultural Sciences, 160p.
- Manjula K., Kishore G. K. and Podile A. R., 2004.** Whole cells of *Bacillus subtilis* AF 1 proved effective than cell free and chitinase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. *Can. J. Microbiol.* 50: 737-744.
- Maougal R. T., Brauman A., Plassard C., Abadie J., Djekoun A., Drevon J. J., 2014.** Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. *Eur J Soil Biol* 62:8–14.
- Marchadier E., 2009.** Etude fonctionnelle d'un centre d'interactions protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée. Thèse de doctorat, Université Paris XI, 248p.
- Marchal N. and Bourdon J.L. (1973)** Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Doin (Eds.), Paris.

- Mardad I., Serrano A. and Soukri A., 2013.** Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 7(8), pp. 626-635
- Mas P. M. et G. Risser., 1966.** Caractérisation, symptômes et virulence de diverses races de *Fusarium oxysporum* f. sp. *neelonis*. let- Congrès Union Phytopat. Médit: 503-508.
- Masih E. I., Alie I., Paul B., 2000.** Can the grey mould disease of the grape-vine be controlled by yeast? *FEMS Microbiol Lett* 189:233–237. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09236.x
- Matsuda Y., Iida Y., Shinogi T., Kakutani K., Nonomura T. and Toyoda H., 2001.** In vitro suppression of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* by extracellular chitinase of *Sphingobacterium multivorum* and cloning of the chitinase gene *csn SM1*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 67: 318–324
- McSpadden Gardener B. B. and Fravel D. R., 2002.** Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.
- Melentev A., Aktuganov G. E., Galimzyanova N. F., 2001.** The role of chitinase in the antifungal activity of *Bacillus* sp.739. *Microbiology* 70: 548-552.
- Messiaen C. M. et Cassini R., 1968.** Recherches sur les Fusarioses IV: La systématique des *Fusarium*. *Ann. Epiph.*, 19: 387-454.
- Michielse C. B., Rep M., 2009.** Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum* *Molecular Plant Pathology*, 10 (3): 311-324.
- Miller J. H., 1974.** *Experiments in Molecular Genetics*, second ed. Cold Spring Harbor, New York, p. 31-36.
- Milus E. A., Rothrock C. S., Rhoads M. L., 1991.** Rhizosphere colonisation by selected soil bacteria and effects on growth and soil borne disease of wheat .*Phytopathology* 81(10) Abst: 1215.
- Monteiro L., Mariano R. L. R., Souto-Maior A. M., 2005.** Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Braz Arch Biol Technol* 48:23–29.
- Moradi H., Bahramnejad B., Amini J., Siosemardeh A., Haji-Allahverdipour K., 2012.** Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. *POJ* 5(2):68-74.
- Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M. A. 1995.** *Bacillus*. In : *Manual of Clinical Microbiology*. ASM 8-349-356.
- Murugan K., Yashotha, Sekar K. and Al- Sohaibani S., 2012.** Detoxification of cyanides in cassava flour by linamarase of *Bacillus subtilis* KM05 isolated from cassava peel. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(28), pp. 7232-7237.
- Naik P. R. et Sakthivel, N., 2006.** Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res. Microbiol.* 157: 538–546.
- Namvar A., Sharifi, R. S., 2011.** Phenological and morphological response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to symbiotic and mineral nitrogen fertilization. *Journal Žemdirbystė (Agriculture)* 2011 Vol. 98 No. 2 pp. 121-130

- Narsian V., Patel H. H., 2000.** *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. Soil Biol. Biochem. 32: 559-565.
- Nautiyal C. S., 1999.** An effecient microbiological growt medium for screening phosphate solublizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170: 265- 270.
- Nautiyal C. S., 2000.** Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. In: Biocontrol potential and its exploration in sustainable agriculture. Upadhyay R.K., Mukherji K.G., Chamola B.P. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, USA. 9-23.
- Navas-Cortés J. A., Alcalá-Jiménez A. R., Hau B., and Jiménez-Díaz R. M., 2000.** Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris on development of *Fusarium* wilt in chickpea cultivars. Eur. J. Plant Pathol. 106:135-146.
- Nelson P. E., Toussoun T. A. and Marasas W. F. O., 1983.** *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park. 193 pp.
- Nene L., Reddy M.V., Haware M.P., Ghanekar A.M., Amin K.S., 1991.** Field diagnosis of chickpea disease and their control. Information Bulttin, 28. Patancheru Andhara Pradesh 502 324, India: International Crops Research Institute for the Semi Arid Tropics. 51p.
- Nene Y. L. and Haware M. P., 1980.** Screening chickpea for resistance to wilt. Pl. Dis. 64, 379–380.
- Nene Y. L. and Reddy M. V., 1987.** Chickpea diseases and their control. In The Chickpea (Eds Saxena and Singh). CAB International, Wallingford pp. 233-270.
- Nene Y. L., Sheila V.K. and Sharma S.B., 1996.** A World List of Chickpea and Pigeonopea Pathogens, 5th edn. ICRISAT, Patancheru, India, pp. 27.
- Nicot P. C., Blum, B., Köhl J., Ruocco M., 2011.** Conclusions and perspectives for future research and development projects on biological control of plant pests and diseases. Classical and augmentative biological control against diseases and pests: critical status analysis and review of factors. 45. pp. 68.
- Nyvall R. F., and Haglund W. A., 1972.** Sites of infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 5 on peas. Phytopathology 62:1419- 1424.
- Okon Y. and Labandera-Gonzalez C. A., 1994.** Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol Biochem 26:1591-1601.
- Olsen S.R., et Sommers L.E., 1982.** Phosphorus. pp: 403-430. In: Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbial Properties. Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), second ed. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Ongena M., Henry G., Adam A., Jourdan E., Thonart P., 2009.** Plant defense reactions stimulated following perception of *Bacillus* lipopeptides. In: Weller D, Thomashow L, Loper J, Paulitz T, Mazzola M, Mavrodi D, Landa BB, Thompson J (eds) 8th International PGPR Workshop. Portland, USA, p 43
- Ongena M., Jacques P., 2007.** *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Cell 16:115–125
- oxysporum* causing wilt diseases. In *Fusarium*: diseases, biology, and taxonomy. (Eds. Nelson, P.E., TAT, Cook, R.J.), Pensylvania State University Press, 391–399.
- Pacucci G., Troccoli C., et Leoni B., 2006.** Supplementary Irrigation on Yield of Chickpea Genotypes in a Mediterranen Climate. Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal. Manuscript LW 04 005. Vol. VIII. May, 2006.

- Palleroni N. J., 2005.** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, Vol. 2. The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria. Brenner, D.J., Krieg, N.R., and Staley, J.T. (eds). New York, USA: Springer, pp. 323–379.
- Palleroni N. J., 2010.** The *Pseudomonas* story. *Envir. Microbiol.* 12 (6): 1377-1383.
- Pande S., Sing G., Naraana Rao J., Bakr M. A., Chaurasia P.C.P. Joshi S., Singh S. D., Kumar J., Rahman M. M., and Gowda C. L. L., 2001.** Integrated management of *botrytis* gray mold of chickpea. (In En. Summaries in En, Fr.). information Bulletin no. 61. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India. International Crops research Institute for the semi-Arid Tropics. 32pp.
- Parker G. F, Daniel R. A. and Errington J., 1996.** Timing and genetic regulation of commitment to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 142: 3445–3452.
- Parry J. M., Turnbull P. C. B. and Gibson J. R., 1983.** A Color Atlas of *Bacillus* Species Ipswich, UK: Wolfe Medical Publications.
- Patil S., Shivannavar C. T., Bheemaraddi M.C., Gaddad S. M., 2015.** Antiphytopathogenic and plant growth promoting attributes of *Bacillus* strains isolated from rhizospheric soil of chickpea. *J. Agr. Sci. Tech* 17:1365-1377
- Patten C. L., Glick B. R., 1996.** Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42, 207-220.
- Penrose D. M. et Glick B.R., 2001.** Levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in exudates and extracts of canola seeds treated with plant growth-promoting bacteria. *Can. J. Microbiol.* 47:368–372.
- Pikovskaya, R.I., 1948.** Mobilization of phosphorus in soil inconnection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*.17: 362-370.
- Ping L. et Boland W., 2004.** Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 9:263-266.
- Piyush P., Kang S. C. and Maheshwari D. K., 2005.** Isolation of endophytic plant growth-promoting Burkholderia sp MSSP. from root nodules of *Mimosa pudica*. *Curr. Sci.* 89(1).
- Pleban S., Ingel F., Chet I., 1995.** Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *Eur. J. Plant Pathol.* 101 (6): 665–672.
- Podile A. R. and Kishore G.K., 2006.** Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam SS (ed) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Netherlands, pp 195-230.
- Prescott L. M., Harley J. P. et Klein D. A., 2003.** Microbiologie, de Boeck 2e édition protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée. Thèse de doctorat, 332p.
- Raaijmakers J. M., Vlami M. and De Souza J. T., 2002.** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 537-547.
- Ramette A., Frapolli M., Defago G. et Moenne-Loccoz Y., 2003.** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcn BC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 16: 525-535.
- Ramos Solano B., Barriuso Maicas J., Pereyra de la Iglesia M. T., Domenech J., Gutierrez Manero F. J., 2008.** Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease

protection, and biotic elicitors. *Phytopathology* 98:451–457. doi:doi:10.1094/PHYTO-98-4-0451.

Rangarajan S., L. M. Saleena et S. Nair., 2002. Diversity of *Azospirillum* strains isolated from rice plants in coastal agri-ecosystems. *Microb. Ecol.*, 44: 271-277.

Rapilly F., 1968. Les Techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des Epiphytes*, vol. 19. Institut National de la Recherche Agronomique ; Paris; 102 pp.

Recourt K., Schripsema J., Kijne J. W., Vanbrussel A. A. N., Lugtenberg B. J. J., 1991. Inoculation of *Vicia sativa* Subsp Nigra Roots with *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Viciae* Results in release of Nod gene activating flavanones and chalcones. *Plant Molecular Biology* 16: 841-852.

Reddy M. V. et Singh K. B., 1984. Evaluation of a World collection of chickpea germplasm accessions for resistance to *Ascochyta* blight. *Plant Dis.* 69: 900-901.
relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp--mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. biochem.* 19:45 1-457.

Renwick A., Campbell R. et Coe S., 1991. Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, 40, pp. 523-532.

Richardson A.E., 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants *Aus. J. Plant Physiol.* 28(9): 897–906.

Rodriguez H. and Fraga R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319- 339.

Rodriguez H., Gonzalez T., Goire I., and Hashan Y., 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, 91:552-555.

Rush C. M. and Kraft J. M., 1986. Effects of inoculum density and placement on *Fusarium* root rot of peas. *Phytopathology* 76:1325-1329.

Ryu C. M., Farag M. A., Hu C. H., Reddy M. S., Kloepper J. W. and Pare P. W., 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1017-1026.

Sanchis V., Bourguet D., 2008. *Bacillus thuringiensis*: Applications in agriculture and insect resistance management: A review. *Agron Sustain Dev* 28:11–20

Sandra Gacitúa A., Carolina Valiente F., Katy Díaz P., José Hernández C., Matilde Uribe M., and Eugenio Sanfuentes V., 2009. Identification and biological characterization of isolates with activity inhibitive against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.. *Chilean journal of agricultural research* 69(4):526-533.

Sarawgi S.K., Tiwari P.K. and Tripathi R.S., 1999. Uptake and balance sheet of nitrogen and phosphorus in gram (*Cicer arietinum*) as influenced by phosphorus, biofertilizers and micronutrients under rainfed condition. *Indian J. Agron.*, 44, 768–772.

Satrani B., El Ouadihi N., Guedira A., Frey-Klett P., Arahou M., Garbaye J., 2009. Effet de la bactérisation des graines sur la croissance des plants de *Cedrus atlantica* Manetti. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2009 13(3), 367-372.

Saxena M. C. and Singh K. B., 1987. The chickpea published by C.A.B. Int. ICARDA. pp: 250-252.

- Saxena M.C., 1985.** Food legume improvement program at ICARDA, an overview. In: Faba Beans, Chickpeas and Lentils in the 1980s. M.C. Saxena and S. Varma (Editors), ICARDA, Aleppo, pages: 1-13.
- Saxena M.C., 1987.** Agronomy of chickpea. In: The Chickpea; M.C. Saxena and K.B. Singh (Editors), CAB International, Wallingford, pages: 207-232.
- Saxena M.C., 1989.** Problems and potential of chickpea production in the nineties. Proceeding of the second International Workshop on Chickpea Improvement, pages: 13-25.
- Saxena M.C., 1990.** Problems and potential of chickpea production in the nineties. In: chickpea in the nineties (eds. van Rheenban, H.H. and Saxena M.C.).*Proc.2nd Intl. Workshop on Chickpea Improvement*, pp. 13-25. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT). Patancheru, Andhra Pradesh, India.
- Schippers B. and Van Eck W.H., 1981.** Formation and survival of chlamydospores in *Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy (Nelson, P.E., Tousson, T.A. and Cook, R.J. eds.) plenum, NY. and London. pp: 21-34.
- Schmidt C. S., Agostini F., Leifert C., Killham K., Mullins C. E., 2004.** Influence of soil temperature and matric potential on sugar beet seedling colonization and suppression of *Pythium* damping-off by the antagonistic bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 94 (4): 351–363.
- Schneider K. A., Grafton K. F., Kelly J. D., 2001.** QTL Analysis of Resistance to *Fusarium* Root Rot in Bean. *Crop Science*, 41: 535–542.
- Schwinghamer M., Knights T. and Moore K., 2009.** Virus control in chickpea—special considerations. *Plant Pathologist, Industry & Investment NSW, Tamworth Agricultural Institute.* (Australian pulse bulletin).
- Seifert K.A., 2001.** *Fusarium* anamorphic generic concepts. In: *Fusarium*. (Eds. Summerville B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden W.L. , Burgess L.W), APS Press St. Paul,USA.
- Sharma A. et Johri B. N., 2003.** Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions.
- Shoda M., 2000.** Bacterial control of plant diseases. *J Biosci Bioeng* 89: 515–521
- Silini A., 2012.** Effets des molécules osmoprotectrices sur la survie et l'activité de *Azotobacter* sur la croissance du blé en milieu salin. Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas, Sétif, 138p.
- Simons M., van der Bij A. J., Brand I., de Weger L. A., Wijffelman C. A. et Lugtenberg B. J. J., 1996.** Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant-growth promoting *Pseudomonas* bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions.*, 7:600-607.
- Singh D. K. and Jha M. M., 2003.** Effect of fungicidal treatment against chickpea wilt
- Singh F. and Diwakar B., 1995.** Chickpea Botany and Production Practices. Skill Development Series n°16.
- Singh K. B., 1988.** Winter chickpea: Problems and potential in the Mediterranean region. In *Proceeding on Present Status Production and Improvement in the Mediterranean Countries.* 11-13 Jul 1988, Zagaroza, Spain.

- Singh K. B., Dahiya B. S., 1973.** Breeding for wilt resistance in chickpea. In: Symposium on Wilt Problem and Breeding for Wilt Resistance in Bengal Gram. Indian Research Institute, New Delhi, India, pp. 13-14.
- Singh K. B., Saxena H. C. et Agridley H. E., 1983.** Screening chickpea for cold tolerance and frost resistance. In: Workshop on Ascochyta blight and winter sowing of chickpea; ICARDA, Aleppo.
- Singh K.B., 1987.** Chickpea breeding. In: Saxena, MC, Singh, KB, eds. The Chickpea. Wallingford, UK: CAB Int., 127-62.
- Singh O. V., Labana S., Pandey G., Budhiraja R., Jain R. K., 2003.** Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 405-412.
- Singh R. K., Kumar D. P., Solanki M. K., Singh P., Srivastva A. K., Kumar S., Kashyap P. L., Saxena A. K., Singhal P. K., Arora D. K., 2013.** Optimization of media components for chitinase production by chickpea rhizosphere associated *Lysinibacillus fusiformis* B-CM18. *J. Basic Microbiol* 53:451-460
- Slama F., 1998.** Cultures industrielles et légumineuses à graines. Ed. Centre de diffusion Universitaire Tunisie, en Arabe, 300p.
- Slepecky R. A. and Hemphill H.E., 2006.** The Genus *Bacillus*—Nonmedical, Chapter 1.2.16, *Prokaryotes* (2006) 4:530-562. DOI: 10.1007/0-387-30744-3_16.
- Smith I. M., J. Dunez D. H. Phillips R. A. Lelliott S. A. Archer eds., 1988.** European
- Smitha K. P., Mohan R., Devadason A., Raguchander T., 2015.** Exploiting novel rhizosphere *Bacillus* species to suppress the root rot and wilt pathogens of chickpea. *Afr. J. Microbiol. Res* 9(15):1098-1104. DOI: 10.5897/AJMR2015.7445
- Soltani A., Hammer L., Torabi B., Robertson M.J., Zeinali E., 2006.** Modeling chickpea growth and development: Phenological development. *Field Crops Research*, 99:1-13.
- Somers E, Vanderleijden J, Srinivasan M., 2004.** Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* 30:205-240
- Soran H., 1975.** The most diseases of chickpea in central Anatolia. *J. Turkish Phytopath.* 4(2): 53-60.
- Soufiane B., 2013.** Propriétés physiologiques et génétiques-communes entre *Bacillus weihenstephanensis* et des souches de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus mycoides*. Thèse de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire, 204p.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R., 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425-448
- species. *Pennsylvania State University Press, University Park* 5 1 pp.
- Standing D., Banerjee S., Rangel-Castro J. I., Jaspars M., Prosser J. I., Killham K., 2008.** Novel Screen for Investigating In Situ Rhizosphere Production of the Antibiotic 2, 4-Diacetylphloroglucinol by Bacterial Inocula. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 39 (11-12): 1720-1732.
- Suarez-Estrella F., Vargas-Garcia C., Lopez M.J., Capel C., Moreno J., 2007.** Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop. Prot.* 26 (1): 46-53.

- Sunil C. D., Suresh M. and Singh B., 2007.** Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. Volume 40, Issue 1, pages 118-127.
- Swain M. R., Ray R. C., 2007.** Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. Microbiol. Res. 164 (2): 121–130.
- Thangavelu R., Palaniswami A., Velazhahan R., 2004.** Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. Agriculture, Ecosystems & Environment Volume 103, Issue 1, Pages 259–263.
- Thrane U., 2001.** Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites. In: *Fusarium*. (Eds. Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2. Euphytica, 93: 145–153.
- Toker C., 2009.** A note on the evolution of kabuli chickpeas as shown by induced mutations in *Cicer reticulatum* Ladizinsky. Genet. Resour. and Crop Evol. 56: 7–12.
- Toussaint V., 1996.** Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophthora Fragariae* var. *rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maîtrise ès science. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- Trapero-Casas A. and Jiménez-Díaz R. M., 1985.** Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. Phytopathology 75:1146-1151.
- Trapero-Casas A., Jimenez-Díaz R. M., 1985.** Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. Phytopathology 75, 1146-1151.
- Trujillo S. K., Willems A., Abril A., Planchuelo A. M., Rivas R., Ludena D., Mateo P. F., Martinez-Molina E. and Velazquez E., 2005.** Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupine* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. 71 (3): 1318- 27.
- Turnbull, P.C.B., Hutson R.A., Ward M.J., Jones M.N., Quinn C.P., Finnie N.J., Duggleby C.J., Kramer J.M., Melling J. 1992.** *Bacillus anthracis* but not always anthrax. Journal of Applied Bacteriology, 72, 21 28.
- Upadhyaya H. D., Bramel P. J., et Singh S., 2001.** Development of a Chickpea Core Subset Using Geographic Distribution and Quantitative Traits. Plant Genetic Resources; Crop Sci. 41, 206–210.
- Van der Maesen L. J. G., 1972.** *Cicer* L. A monograph on the genus with special references to the chickpea (*Cicer arietinum* L.), its ecology and cultivation. Thesis, Agricultural University Wageningen Medad Landbouwhogeschool, Wageningen, 72-10.
- Van der Maesen L.J.G., 1987.** Origin, history, and taxonomy of chickpea. P 11-34, du “the chickpea”, (Saxena M.C. et Singh K.B., eds), UK.
- Van der Maessen G., 1979.** Genetic resources at ICRISAT; Chickpea Newsletter (1): 2 p.
- Van Loon L. C., 2007.** Plant responses to plant growth-promoting bacteria. Eur J Plant Pathol 119:243–254.
- Van Loon L. C., Bakker P. A. H. M., Pieterse C. M. J., 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36, 453–483.
- Van Rheenen H.A., Bond D. A., Erskine W., and Sharma B., 1988.** Future breeding strategies for pea, lentil, faba bean and chickpea. Pages 1013-1030 in Proceedings of the International Food Legume Research Conference on Pea, Lentil, Faba Bean, and Chickpea

(Summerfield, R.J., ed.). 6-11, Spokane, Washington, USA. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers.

Vazquez P., Holquin G., Puente M. E., Lopez-Cortez A. and Bashan Y., 2000. Phosphate solubilizing microorganism associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fert. Soil* 30: 460-468.

Verghis T.I., McKenzie B.A. et Hill G.D., 1999. Phenological development of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Canterbury, New Zealand. *New Zealand Journal of crop and Horticultural Science*; 27: 249-256.

Verma M., Brar S. K., Tyagi R. D., Surampalli R. Y., Valéro J. R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp., Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*.; 37:1–20.

Villajuan-Abgona R., Kagayama K., Hyakumachi M., 1996. Biocontrol of Rhizoctonia damping-off of cucumber by non pathogenic binucleate Rhizoctonia. *Eur. J. Plant Pathol.*, 102: 227-235.

Wani P. A et Khan M. S., 2010. *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. *Food Chem Toxicol* 48:3262–3267

Wani P. A., Khan M. S., Zaidi A., 2007. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphatesolubilizing rhizobacteria on the performance of fieldgrown chickpea. *J Plant Nutr Soil Sci* 170(2):283-287.

Wei G., Kloepper J. W. et S. Tuzum., 1991. Induction of systemic résistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant-growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81: 1508-1512.

Wery J., 1990. Adaptation to frost and drought stress in chickpea and implications in plant breeding. In: Saxena M.C; Cubero J.I. et Wery (Eds), Present status and future prospects of chickpea crop production and improvement in the Mediterranean countries, Options

Westerlund F. V., Campbell R. N. and Kimble K. A., 1974. Fungal root rot and wilt of chickpea in California. *Phytopathology*, 64: 432–436.

Westover K. M., Kennedy A. C. and Kelley S. E., 1997. Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with Co-occurring plant species. *J. Ecol.* 85, 563-873.

Weyens N., Monchy S., Vangronsveld J., Taghavi S., et Vander Lelie D., 2010. Plant-Microbe Partnerships, p. 254-2564 . In K.N. Timmis (ed.), Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Wheatley R. E., 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Anton Leeuw J Microb* 81:357–364.

Whipps JM., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487–511.

Wilhelm N., Le Coustumier A., Fevrier F., Le Flèche A., Grasmick C., Grimont P., 2005. Bactéries d'identification difficile ou non cultivables en routine : Quelles solutions ? Apport du séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16 S dans le diagnostic microbiologique de routine. Colloque du SNBH, Spectra Biologie n° 145, p 49 – 54.

Williams G. E., Asher M. J., 1996. Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crop Prot*, 15:479-86.

Wipat A. et Harwood C. R., 1999. The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium, *FEMS Microb. Ecol.* 28:1-9.

- Woltz S. S. and Jones J. P., 1981.** Nutritional requirements of *Fusarium oxysporum*: Basis for a disease control system, pp. 340-349.
- Xie D., Peng J., Wang J., Hu J., Wang Y., 1998.** Purification and properties of antifungal protein X98III from *Bacillus subtilis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 38(1):13–19.
- Yadav R. S., Tarafdar J. C., 2003.** Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. *Soil Biol Biochem.*;35(6):745–751.
- Yang C. H., Crowley D. E., 2000.** Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 345-351.
- Yara K., Kunimi Y., Iwahana H., 1997.** Comparative studies of growth characteristic and competitive ability in *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil. *Appl Entomol Zool.*, 32(4):625-634.
- Yazdani M., M. A. Bahmanyar H., Pirdashti and Esmaili M. A., 2009.** Effect of Phosphate solubilization microorganisms (PSM) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of Corn (*Zea mays* L.). *Proc. World Acad. Science, Eng. Technol.* 37:90-92.
- Yoshida S., Hiradate S., Tsukamoto T., Hatakeda K., Shirata A., 2001.** Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 91 (2): 181–187.
- Zaghoulane O., 1997.** La situation et les perspectives de développement des légumineuses alimentaires en Algérie. *Revue céréaliculture*, n°30. Août 1997.
- Zahir Z.A., Arshad M. and Frankenberger W.T., 2004.** Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. In *Advances in Agronomy*, pp. 97-168.
- Zamani M. R, Motallebi M. and Rostamian A., 2004.** Characterization of Iranian Isolates of *F. oxysporum* on the Basis of RAPD Analysis, Virulence and Vegetative Compatibility. *J. Phytopathology*, 152, 449–453
- Zeller S. L., Brand H., Schmid B., 2007.** Host-Plant Selectivity of Rhizobacteria in a Crop/Weed Model System. *Plos One*, 2: 846.
- Zhang J. X., Xue A. G., Tambong J. T., 2009.** Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Dis.*;93:1317–1323.

ANNEXES

ANNEXE 1

Composition des différents milieux de cultures utilisées

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Rapilly, 1968)

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 000 ml

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

Gélose nutritive

Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
Eau distillée	1 000 ml

Milieu Pikovaskey solide de bleu de bromophénol (Pikovskaya, 1948)

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5g
KCl	0,2g
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,1g
glucose	10g
FeSO_4	0,005g
Bleu bromophénol	0,25g
Agar	15g
Eau distillée	1L

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

Milieu Trypticase soja additionné de glycine

Glycine	4,4 g
Tryptic soy broth	3 g
Agar	20g
Eau distillée	1L

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

- **Solution de picrate de sodium** : cette solution a couleur jaune contenant 2,5g/L d'acide picrique et 12,5g/L de carbonate de calcium

ANNEXE 1

Milieu de Luria-Bertani enrichi avec du tryptophane (LBT) (Bric *et al.*, 1991)

L-tryptophane	1,02 g
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5g
NaCl	5 g
Agar	20g
Eau distillée	1L

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

- **Solution de Salkowski** est composée de 2% de FeCl₃ (0,5 M) dans une solution de 35% d'acide perchlorique

Milieu minimal utilisé pour la production de chitinase (Reniwick *et al.*, 1991)

Glucose	5 g
Na ₂ HPO ₄	3g
NH ₄ Cl	1g
NaCl	0,5 g
CaCl ₂	0,1
MgSO ₄	0,12g
chitine colloïdale	1% (p:v)
Agar	20g
Eau distillée	1L

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

Milieu minimal utilisé pour la production de cellulase (Miller, 1974)

Glucose	5 g
Na ₂ HPO ₄	3g
NH ₄ Cl	1g
NaCl	0,5 g
CaCl ₂	0,1
MgSO ₄	0,12g
Cellulose	10g
Agar	20g
Eau distillée	1L

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH : 7,0-7,2

ANNEXE 3

Chapitre 1 :

Importance du flétrissement vasculaire du pois chiche dans le nord-ouest Algérien

Tableau : analyse de la variance du test de pathogénicité

<i>Source des variations</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
Entre Groupes	9	1115,31	116,17
A l'intérieur des groupes	10	9,6	

F : test de Fischer

Tableau : Analyse de la variance des mensurations de la longueur et la largeur des microconidies

<i>Source des variations</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
Entre Groupes	9	1,147	0,15
A l'intérieur des groupes	10	7,39	

F : test de Fischer

Tableau : Analyse de la variance des mensurations de la longueur et la largeur macroconidies

<i>Source des variations</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
Entre Groupes	9	5,132	0,012
A l'intérieur des groupes	10	424,00	

F : test de Fischer

Chapitre 2 :

Isolement et sélection des rhizobactéries antagonistes

Tableau : Analyse de la variance de la confrontation directe entre le 29 rhizobactéries et FOC1

Source des variations	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F
Entre Groupes	28	334,85	74,27
A l'intérieur des groupes	58	4,50	
Total	86		

Tableau : Analyse de la variance de la confrontation directe entre le 29 rhizobactéries et FOC2

Source des variations	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F
Entre Groupes	28	204,60	78,32
A l'intérieur des groupes	58	2,61	
Total	86		

Tableau : Analyse de la variance de la confrontation à distance entre le 29 rhizobactéries et FOC1

Source des variations	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F
Entre Groupes	28	175,66	173,31
A l'intérieur des groupes	58	1,01	
Total	86		

Tableau : Analyse de la variance de la confrontation à distance entre le 29 rhizobactéries et FOC2

Source des variations	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F
Entre Groupes	28	198,48	359,55
A l'intérieur des groupes	58	0,55	
Total	86		

ANNEXE 5

Chapitre 3 :

Caractérisation des rhizobactéries antagonistes

Tableau: Analyse de la variance de la solubilisation de P par les rhizobactéries antagonistes en milieu solide

<i>Source des variations</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
Entre Groupes	28	1,65	287,23 *
A l'intérieur des groupes	29	0,005	

*significative à un niveau de 1% de probabilité ($p < 0,01$)

F : test de Fischer

Tableau: Analyse de la variance de la solubilisation de P par les rhizobactéries antagonistes en milieu liquide

<i>Source des variations</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>
Entre Groupes	28	526,72	2546,09*
A l'intérieur des groupes	29	0,206	

*significative à un niveau de 1% de probabilité ($p < 0,01$)

F : test de Fischer

Tableau: Analyse de la corrélation entre la concentration de P soluble et le pH de milieu, entre la solubilisation de P dans le milieu PVK solide et liquide.

Corrélation	Coefficient de corrélation
	r
PVK liquide X pH de milieu	0,890 *
PVK liquide X PVK solide	0,427 ns

*Significative au seuil de 0,05

ns : non significative

Tableau: Analyse de la variance de la production d'AIA par les rhizobactéries antagonistes

Source de variation	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F
Entre Groupes	28	12475,72	23865,16**
A l'intérieur des groupes	29	0,52	

**Significative à un niveau de 1% de probabilité ($p < 0,01$) ; F : test de Fischer

ANNEXE 5

Tableau: Analyse de la corrélation entre la production de l'AIA en milieu liquide et en milieu solide

Corrélation	Coefficient de corrélation
PVK liquide X PVK solide	r = 0,808*

*Significative au seuil de 0,05

Tableau: Contribution relative des variables

Activités	Axe 1	Axe 2	Axe 3
CD	-0,6961	-0,4073	0,1992
CAD	-0,7782	-0,4620	0,2426
SPL	-0,6329	0,3077	-0,2764
HCN	-0,8052	-0,3266	0,3364
AIA MS	-0,7662	0,5801	0,0120
AIA ML	-0,4925	0,7484	0,3838
CHI	-0,5588	-0,1310	-0,4400
SPS	-0,5433	-0,0524	-0,6917

CD : confrontation directe, **C à D** : confrontation à distance, **SPL** : solubilisation du phosphate en milieu liquide, **HCN** : acide cyanidrique, **AIA MS** : acide indole acétique en milieu solide, **AIA ML** : acide indole acétique en milieu liquide, **CHI** : chitinase, **SPS** : solubilisation du phosphate en milieu solide

Tableau: contribution relatives de rhizobactéries testées à l'ACP.

	Axe 1	Axe 2	Axe 3
Rb1	0,76943	0,33482	-0,54045
Rb2	-0,00862	-0,09971	-1,68712
Rb3	0,00879	0,47860	-1,32835
Rb4	-2,07516	0,11317	-0,38144
Rb5	-0,40078	2,51709	0,54372
Rb6	-1,64160	-1,63071	0,35683
Rb7	0,49920	-0,04109	-1,11131
Rb8	0,70105	-0,43324	0,65497
Rb9	-1,03773	2,32958	2,72149
Rb10	0,94806	-0,69250	-0,37446
Rb11	0,81867	0,02726	0,68425
Rb12	-0,93794	-1,64721	0,64037
Rb13	0,35284	0,11413	-0,75270
Rb14	-0,02293	-0,56393	0,49445
Rb15	-1,70187	-0,91755	0,36324
Rb16	-0,35476	0,76068	-2,53823
Rb17	0,18498	0,51129	-0,42892
Rb18	-0,00791	1,07016	-0,25333
Rb19	0,31503	0,09884	-0,59720
Rb20	-0,45710	1,76584	0,29418
Rb21	1,39298	-0,46378	0,91141
Rb22	-0,54096	-0,35983	-0,07020
Rb23	1,44925	-0,38767	0,86958
Rb24	1,36423	-0,50772	0,95313
Rb25	1,17627	-0,76938	1,12286
Rb26	-0,15079	-0,13612	-0,25848
Rb27	1,53493	0,01974	-0,44930
Rb28	-0,80383	-0,01383	-0,31947
Rb29	-1,37371	-1,47692	0,48051

ANNEXE 6



Galerie Api 50 CHB (Témoin)



Résultat après ensemencement de Rb29 sur la Galerie
Api 50 CHB

ANNEXE 7

Chapitre 5 :

Efficacité *in vivo* de quelques isolats de *Bacillus* spp. sur FOC en pots et en plein champ

Tableau: Analyse statistique de la **réduction de l'incidence de la maladie**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F
Modèle	5	6998,673	1399,735	127,434
Erreur	5	54,920	10,984	
Total corrigé	10	7053,593		

Tableau: analyse de la variance **H** : la hauteur des plantes ;

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F
Modèle	11	1288,438	117,131	206,200
Erreur	23	13,065	0,568	
Total corrigé	34	1301,503		

Tableau: analyse de la variance **Nt Go** : le nombre total de gousses ;

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F
Modèle	11	311128,971	28284,452	202,535
Erreur	23	3212,000	139,652	
Total corrigé	34	314340,971		

Tableau: analyse de la variance **Go/ Pl** : le nombre de gousses par plante ;

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F
Modèle	11	540,106	49,101	181,655
Erreur	23	6,217	0,270	
Total corrigé	34	546,322		

Tableau: analyse de la variance **Nt G** : le nombre total de graines ;

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F
Modèle	11	342778,083	31161,644	200,724
Erreur	23	3570,667	155,246	
Total corrigé	34	346348,750		

Tableau: analyse de la variance **G/Pl** : le nombre de graines par plante ;

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F
Modèle	11	592,802	53,891	32,614
Erreur	23	38,005	1,652	
Total corrigé	34	630,807		

Tableau: analyse de la variance **G/Go** : le nombre de graines par gousse ;

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F
Modèle	11	0,005	0,000	5,297
Erreur	23	0,002	0,000	
Total corrigé	34	0,006		

Tableau: analyse de la variance **Pt G (g)** : le poids total graines ;

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F
Modèle	11	41077,330	3734,303	124,960
Erreur	23	687,333	29,884	
Total corrigé	34	41764,663		

Tableau: analyse de la variance **P 100 (g)** : le poids de 100 graines.

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F
Modèle	11	271,502	24,682	75,691
Erreur	23	7,500	0,326	
Total corrigé	34	279,002		

PUBLICATION

BIOCONTROL OF CHICKPEA *FUSARIUM* WILT BY *BACILLUS* SPP. RHIZOBACTERIA

Souad Zaim^{1*}, Lakhdar Belabid², Miloud Bellahcene³

¹Laboratoire de Recherche sur les Systèmes Biologiques et la Géomatique, Université de Mascara, P.O. Box 305, Algeria

²Laboratory of Microbial Engineering, Bioconversion and Health Safety, University of Mascara, P.O. Box 305, Mascara, Algeria

³Laboratoire de microbiologie, Faculté des Sciences, Université de Mostaganem, Algeria

Received: January 25, 2013

Accepted: April 5, 2013

Abstract: Among 131 rhizobacteria isolates, 29 potentially antagonistic strains were screened in *in vitro* assays. The five antagonistic *Bacillus* spp. Rb29, Rb6, Rb12, Rb4, and Rb15 showed the most inhibitory effect against FOC1 (from 25.63 to 71.11%), mycelial growth, and FOC2 (from 28.43 to 60.65%) *in vitro*. Results also revealed that production of volatile metabolite, components and inhibition of the test pathogen by volatile metabolites varied among different antagonistic rhizobacteria. Isolates Rb29, Rb6, Rb12, Rb4, and Rb15 produced more volatile metabolites which inhibited mycelial FOC growth by 40%. Chickpea *Fusarium* wilt severity caused by FOC1 was reduced from 60 to 99% in the susceptible cultivar ILC 482 treated with antagonistic *Bacillus* spp. (Rb29, Rb6, Rb12, Rb4, and Rb15) in pot assays and by 98, 81, 68, 64, 57.20%, respectively, in the field trials. As for their beneficial effects on disease control, the results revealed that *Bacillus* spp. may improve plant growth and disease control.

Key words: antagonistic strains, *Bacillus*, bacterized seed, *Cicer arietinum*, screening

INTRODUCTION

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is the world's fourth most important legume crop after Soybean, common bean, and peas. In developing countries, chickpea is a rich complement to the cereal diet since it has a high nutritive value. Mainly grown for its highly proteinated edible seeds, this crop can be used for both seed and forage production (Yadav *et al.* 2011). In several countries (Algeria, Morocco, Syria, Turkey, Pakistan, India, etc.), production of chickpea did not increase because of low productivity and unstable output (Labdi 1995). Causes of regression are agronomic, abiotic and biotic factors (Labdi 1995). In Algeria, where the market is very favorable for the Kabuli type chickpea, production is developing very slowly because of low yields and because of competition with other crops on limited land areas (Pluvillage 1990).

Chickpea *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato (FOC) is a destructive disease agent, and an important pathogen in Algerian economy (Labdi 1990).

The use of resistant cultivars is one of the most practical and cost efficient strategies for managing plant diseases. However, the efficiency of resistant cultivars in managing a disease can be seriously limited by pathogenic variability occurring in pathogen populations, including the existence of pathogenic races and pathotypes (Jiménez-Gasco *et al.* 2004). Increasing the use of chemical inputs causes several negative effects such as the development of pesticide resistance to applied agents. Chemical

inputs also have an effect on non-targeted environmental impacts (Gerhardson 2002).

Lately, people are more and more concerned about fungicides and concerned because the limited use of cultural methods. Biological control has emerged as an important alternative in managing soil-borne plant diseases. Several rhizobacteria have been extensively used as biological agents to control many soil-borne plant pathogens, including FOC (Dileep Kumar 1999; Landa *et al.* 2004). Various biocontrol agents, including bacteria belonging to the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, and fungi such as nonpathogenic fusaria, have been used successfully. The results in reducing pathogenic fungal growth *in vitro* and disease development *in vivo* are significant. *Bacillus* spp. are gram-positive bacteria, frequently retrieved from the rhizosphere. This species has already been mentioned as a biocontrol agent in the work of many researchers (Landa *et al.* 2001; Johri *et al.* 2003). *Bacillus* spp. have also been shown to be potential candidates as biocontrol agents since they are abundant in soils and because they produce heat resistant spores apart from their active metabolites (Milner *et al.* 1996).

Our research was carried out as an alternative strategy to chemical control. We aimed to develop an effective biological control of FOC. For this reason, the most promising rhizobacteria antagonists towards FOC (mainly *Bacillus* spp.), were isolated and screened for *in vitro* trials. Our objectives were also to evaluate the potential efficacy of the antagonists for controlling chickpea *Fusarium* wilt in northwestern Algeria.

*Corresponding address:
zaimsouad1528@yahoo.fr

MATERIALS AND METHODS

Isolation of rhizobacteria

Rhizobacteria isolates were isolated from rhizosphere soils of healthy chickpea plants in order to be used as natural biocontrol agents. The rhizosphere soil samples had been collected during the period from 2008 to 2010 from nine locations in Algeria (Table 1). The samples were placed in polyethylene bags, closed tightly, and stored in a refrigerator at 4°C until needed.

Isolation of rhizobacteria was performed using a soil dilution plating technique as described by Fang (1998). One gram of dried soil samples was suspended in 9 ml sterile distilled water, agitated for 1 min, and allowed to settle for 1 h. The suspension was subsequently diluted to 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , and 10^{-6} . The 0.1 ml soil dilutions of 10^{-3} to 10^{-6} were separately streak-plated on nutrient agar (NA) medium, in triplicate. The plates were then incubated at 28°C for 24 h. From the countable plates, ten to fifteen representative colonies with different morphological appearances were selected and re-streaked on a new plate containing the same medium, to obtain pure colonies.

In vitro screening of rhizobacteria isolates for their antagonistic activity

Dual culture assay

In vitro inhibition of mycelial growth of FOC (FOC1 and FOC2) by the bacterial isolates were tested using the dual culture technique described by Landa *et al.* (1997) and Swain and Ray (2007), but with some modifications. Four agar discs from nutrient agar cultures of each rhizobacteria were placed equidistantly along the perimeter of Potato Dextrose Agar (PDA) plates and were incubated in the dark at 28°C. After 24 h, a 6 mm agar disc from fresh PDA cultures of seven-day-old FOC was placed in the center of the plate. Plates without rhizobacteria were used as the control and incubated at 25°C for six days. The inhibition zone, noted by the absence of any contact between the bacteria and FOC after incubation, was scored as described (Suarez-Estrella 2007). Each test was replicated three times. After 2 to 6 days of incubation, the interface region was observed under light microscope.

Distance culture assay

Rhizobacterial inhibition through production of the volatile antifungal substance (s) was measured following a modified method used by Fiddaman and Rossall (1995).

Table 1. Sampling locations and source of potentially antagonistic rhizobacteria

Number	Isolates	Department	Location	Year collected
1	Rb1	Mascara	Maoussa	2009
2	Rb4		Maoussa	2010
3	Rb6		Tighenif	2008
4	Rb12		El-Bordj	2008
5	Rb15		Maoussa	2010
6	Rb16		Maoussa	2009
7	Rb8	Sidi Bel-Abbes	Tassala	2008
8	Rb23			2009
9	Rb2	Tlemcen	Tlemcen	2008
10	Rb3			
11	Rb10			
12	Rb18			2009
13	Rb21			2010
14	Rb25			
15	Rb7	Tiaret	Si El Hawas	2008
16	Rb13		Tiaret	2008
17	Rb26		Tiaret	2009
18	Rb11	Mostaganem	Mostaganem	2008
19	Rb20			
20	Rb24			2010
21	Rb27			
22	Rb17	Relizene	Mendès	2008
23	Rb22	Chlef	Chlef	2008
24	Rb28			2009
25	Rb9	Guelma	Oued El Zanati	2008
26	Rb14		Guelma	2009
27	Rb19		Guelma	2010
28	Rb5	Constantine	Ain Abid	2008
29	Rb29			2009

Four agar discs from nutrient agar cultures of each rhizobacteria, were placed equidistantly along the perimeter of PDA plates. After incubation at 28°C for 24 h, a second Petri dish containing PDA with a 6 mm plug of the test fungus, was placed in the center of the plate, inverted and placed over the bacterial culture. The two plates were sealed together with Parafilm to prevent gas diffusion and then they were incubated at 25°C. This incubation ensured that both organisms were growing in the same conditions though they were physically separated. As a control, a Petri dish containing PDA medium without bacteria was placed over the PDA medium inoculated with the fungal pathogen (FOC1/FOC2). Any radial growth increase of the test fungus over 48h intervals, for a period of six days, was recorded. Each test was replicated three times.

Identification of efficient antagonistic rhizobacteria

The best-selected rhizobacterial isolates were tentatively identified as to the genus, according to the method described in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Sneath 1986; Holt *et al.* 1994). Complementary biochemical traits were determined through API 20E tests (Földes *et al.* 2000).

Effect of *Bacillus* isolates on chickpea *Fusarium* wilt, in experiments conducted in pots and in the field

Chickpea cultivar

One FOC susceptible chickpea line (ILC 482) was used in this experiment. The seeds of ILC 482 were obtained from the Technical Institute of Field Crops in Saïda, Algeria.

Fungal inoculum preparation

Two isolates of FOC (FOC1 and FOC2), originated from Mascara (Algeria) were used in the present study.

After preparing monoconidial FOC isolates, the isolates were kept on a PDA medium and incubated at 25°C for 15 days. Spore suspensions were prepared by removing the spores from the sporulating edges of the culture with a sterile rod and adding 5 ml of sterile distilled water for better spore separation. Spore suspensions were sieved through two paper filters, and spore concentration was determined by the aid of a haemocytometer (10^6 conidia/ml) (El Aoufir 2001).

After observing visual symptoms of *Fusarium* wilt and death of young seedling, FOC1 was selected as the most virulent isolate, and was used (FOC1) as a target pathogen in this experiment.

Bacterial inoculum preparation

Bacterial isolates were grown in nutrient broth on a rotary shaker at 28°C and 180 rpm for 24 h. the suspension was centrifuged in 50 ml capacity sterile plastic tubes at 5,000 rpm for 10 min. A new pellets-suspension was prepared in quarter-strength sterile distilled water to give a final concentration of 10^8 bacteria/ml (Idris *et al.* 2007).

Pot experiment

A pot experiment was conducted in 2009 and 2010 to evaluate the performance of bacteria as a bio-control

agent against wilt. Four treatments and three replicates were done. We sowed each of three susceptible chickpea cultivar ILC 482 seeds in a 7 cm diameter sterilized surface (3% Sodium hypochlorite) plastic pot, filled 2/3 full with a sterilized soil mixture and peat (V/V). Sterilization was done at 120°C for 1 h three times in three days. Chickpea seeds were surface sterilized with 2% sodium hypochlorite for 3 min and rinsed three times with sterile distilled water and then dried. The experiment was replicated four times.

Preparation 1 including the non-inoculated control, was treated with sterile distilled water without bacterial and fungal inoculum (with no rhizobacteria and no pathogen). Preparation 2 was treated only with conidia of FOC1 (with pathogen and no rhizobacteria). Preparation 3 including seeds bacterized with *Bacillus* spp. was mixed with 10^6 conidia/ml of FOC1 (with rhizobacteria and pathogen). Preparation 4 containing seeds bacterized separately with the efficient rhizobacteria but with no conidia of the pathogen (rhizobacteria + no pathogen) was settled. Chickpea seeds were thoroughly soaked in a bacterial suspension containing 10^8 bacteria/ml to ensure a uniform coating of the surface.

Pots were kept under observation for wilt incidence for 40 days, and compared after sowing with the control pots.

Field experiment

As in the preceding experiment, the same cultivar was studied: five *Bacillus* isolates and four treatments. The field was subdivided into 2x2 m plots; in each plot 24 seeds were sown in three lines. Each treatment was replicated three times. The non-bacterized seeds were kept as the controls. Seeds were sown during the first week of March 2009.

When plants were ten-weeks-old, the total number of wilted plants was recorded. Evaluation of disease incidence was initiated when the first disease symptoms appeared on plants which had been only inoculated with FOC1. Subsequently, disease incidence was evaluated every three days for 20 to 22 days after inoculation.

Disease assessment

Disease reactions were assessed according to the severity of symptoms at 2 to 3 days intervals, using a 0 to 4 rating scale based on the percentage of foliage with yellowing or necrosis in acropetal progression (0 = 0%, 1 = 1–33%, 2 = 34–66%, 3 = 67–100%, and 4 = dead plant) (Landa *et al.* 1997). The percentage suppression of *Fusarium* wilt was calculated according to the disease severity index (Villajuan-Abgona *et al.* 1996). The FOC isolate, FOC1, was isolated again from wilted plants by plating stem pieces from the crown region onto PDA medium.

Statistical analysis

Data obtained from all *in vitro* experiments were subjected to analysis of variance (ANOVA) and significant means were separated through Newman-Keuls Multiple Range Test at $p < 0.05$ calculating also standard errors (SE). Each test was replicated three times.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolating rhizobacteria and identifying efficient antagonistic isolates

Isolating rhizobacteria from different locations helps in the identification of organisms which have adapted to various environmental conditions. In the present study, a total of 131 rhizobacterial isolates was obtained from nine locations in Algeria: Mascara, Sidi Bel-Abbes, Tlemcen, Tiaret, Relizane, Mostaganem, Chlef, Constantine, and Guelma.

A primary selection was made from antagonism test plates where confluent bacterial growth from the chickpea rhizosphere inhibited fungal mycelia development. Pure rhizobacterial cultures isolated from those plates were tested for fungal antagonism.

With this procedure, 29 isolates inhibiting more than 20% of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* were obtained, and compared to fungi growing alone. Based on *in vitro* efficiency against FOC1 and FOC2, five rhizobacterial isolates (Rb29, Rb6, Rb12, Rb4, and Rb15) were selected. They were identified with the use of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, and subjected to morphological, physiological and biochemical properties of the *Bacillus* genus.

Colonies on Tryptic soya agar medium (TSA) from these isolates are wrinkled and white. These isolates are Gram positive, aerobic, rods forming endospores, hydro-

lyse starch, and motile. With these results, we confirmed that they all belong to the *Bacillus* genus.

In vitro screening of rhizobacteria isolates for antagonism against *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*

Among 131 rhizobacteria tested, twenty-nine rhizobacteria isolated were screened by the dual culture method against two FOC isolates (FOC1 and FOC2). Antagonism was evident in Petri dishes through the different magnitudes of the FOC inhibition halo. All isolates significantly inhibited growth of FOC1 and FOC2 pathogens. All isolates also reduced FOC1 and FOC2 development where inhibition percentage varied from 25.63 to 71.11% and from 28.43 to 60.65%, respectively (Table 2).

Isolates Rb29, Rb6, Rb12, Rb4, and Rb15 were the most efficient *in vitro* and caused growth inhibition of FOC1 and FOC2 above 50%. The highest inhibitory effect was noted in Rb29 with a 71.11% rate. On the other hand, the lowest inhibitory effect towards FOC1 was noted in Rb27/Rb3 with a 25.63/26.65% rate. The lowest inhibitory effect towards FOC2 was in Rb27 and Rb3 with a 28.43/28.62% rate. The control plates without rhizobacteria, were completely covered by pathogen mycelia showing no fungus growth inhibition. The mean mycelium growth inhibition of the most effective bacterial isolates revealed that inhibition was highly significant ($p < 0.05$). According to these results, Rb29, Rb6, Rb12, Rb4, and Rb15 were used in the further experimentation.

Table 2. Screening for antagonistic rhizobacteria against *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* plant pathogen of chickpea

Rhizobacterial isolats	% mycelial inhibition* of FOC in					
	a dual culture assay			a distance culture assay		
	FOC1 ^a	FOC2 ^a	mean ^b ±SE	FOC1 ^a	FOC2 ^a	mean ^b ±SE
Rb1	43.33	34.26	38.80 f ±4.54	15.66	15.24	15.45 x ±0.21
Rb2	37.77	36.45	37.11 f ±0.66	25.41	25.57	25.49 n ±0.08
Rb3	26.66	28.61	27.64 h ±0.98	28.56	28.67	28.62 h ±0.06
Rb4	57.50	55.71	56.60 c ±0.89	33.33	37.20	35.27 e ±1.94
Rb5	38.98	39.02	39.00 f ±0.02	21.66	22.84	22.25 r ±0.59
Rb6	64.16	54.71	59.44 b ±4.73	44.68	45.74	45.21 a ±0.53
Rb7	44.43	35.86	40.15 f ±4.28	19.99	20.33	20.16 t ±0.17
Rb8	45.55	40.56	43.05 f ±2.50	26.66	26.74	26.70 k ±0.04
Rb9	41.42	36.80	39.11 f ±2.31	28.89	29.60	29.24 g ±0.36
Rb10	35.55	31.83	33.69 g ±1.86	26.66	26.87	26.77 j ±0.11
Rb11	53.33	41.85	47.59 e ±5.74	16.67	17.10	16.88 w ±0.22
Rb12	58.53	50.54	54.54 d ±4.00	40.00	42.90	41.45 c ±1.45
Rb13	46.55	40.20	43.38 f ±3.18	20.34	20.66	20.50 s ±0.16
Rb14	43.33	42.71	43.02 f ±0.31	28.61	28.60	28.60 h ±0.00
Rb15	56.72	52.56	54.64 d ±2.08	43.00	43.33	43.17 b ±0.16
Rb16	35.66	37.17	36.42 f ±0.75	19.56	20.23	19.89 u ±0.33
Rb17	48.88	35.77	42.33 f ±6.56	21.66	22.85	22.26 r ±0.59
Rb18	45.55	35.72	40.64 f ±4.92	22.33	22.84	22.59 r ±0.26
Rb19	47.50	38.57	43.03 f ±4.46	21.88	22.85	22.37 r ±0.48
Rb20	45.44	38.53	41.99 f ±3.46	25.88	26.65	26.27 l ±0.39
Rb21	45.77	32.85	39.31 f ±6.46	18.33	19.04	18.69 v ±0.36
Rb22	36.66	31.56	34.11 fg ±2.55	30.48	30.50	30.49 f ±0.01
Rb23	30.00	31.71	30.86 g ±0.85	22.44	23.82	23.13 q ±0.69
Rb24	33.33	30.71	32.02 g ±1.31	24.94	25.71	25.32 o ±0.38
Rb25	46.66	39.60	43.13 f ±3.53	23.33	23.90	23.61 p ±0.28
Rb26	52.22	42.56	47.39 e ±4.83	24.67	26.59	25.63 m ±0.96
Rb27	25.63	28.42	27.03 i ±1.40	14.11	14.28	14.19 y ±0.08
Rb28	50.00	42.84	46.42 e ±3.58	26.66	27.50	27.08 i ±0.42
Rb29	71.11	60.65	65.88 a ±5.23	36.66	40.00	38.33 d ±1.67

*inhibition percentage of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* radial growth 6 days after incubation

^athe values are the means of three replications

^bmeans followed by a different letter are significantly different ($p \leq 0.05$)

No physical contact between any of the tested antagonistic rhizobacteria and FOC1 or FOC2 was noticed. Moreover, an inhibitory halo suggesting the presence of fungistatic metabolites secreted by rhizobacteria was seen. Change in FOC colony mycelia color was also observed.

A microscope was used to make observations, thus we think that with mycelium collected from the interface region having the best tested rhizobacteria, the isolates Rb29, Rb6, Rb12, Rb4, and Rb15 caused a modification in the mycelium appearance. These modifications were: mycelia color changing from white to red, reddish brown or darker brown. With these isolates, a coagulation of fungal cytoplasm that can be observed up to the hypha was detected, resulting in the presence of small vesicles and the appearance of big vacuoles. In this case, the destructive effect of FOC by rhizobacteria was high, resulting in serious damage of the hyphae, associated with a series of degradation events.

The mycoparasitic potential of *Bacillus* spp. is well documented (Johri *et al.* 2003; Saharan and Nehra 2011). Thus, this phenomenon has often been used as a means for *in vitro* screening of biocontrol agents (Elad *et al.* 1980). Similar conclusions have been reported by El Hassni *et al.* (2007) and Idris *et al.* (2007). They reported a modification of the fungal mycelium appearance, due to antifungal secondary metabolite production. Generally, biocontrol capacity through antagonistic bacteria involves either competition (Elad and Chet 1987) or bacterial metabolite production, such as siderophores, hydrogen cyanide, antibiotics or extracellular enzymes for antagonism towards plant pathogens (Kamilova *et al.* 2005; Sang *et al.* 2006). It has been reported that *Bacillus* spp. contains various biocontrol characteristics including secondary metabolites, the colonizing potential, and the production of competitors (Yoshida *et al.* 2001; Schmidt *et al.* 2004).

Rhizobacteria isolates volatile metabolite effects on *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* *in vitro*

Higher volatile metabolite concentrations were produced by isolates Rb29, Rb6, Rb12, Rb4, and Rb15: they inhibited FOC1 and FOC2 at a rate varying from 33.33 to 44.66% and 37.2 to 45.75%, respectively (Table 2). While other isolates moderately inhibited its growth from 19.56 to 30.5%. The lowest volatile metabolite activity was observed in Rb27, Rb1, Rb11, and Rb21: they inhibited target pathogen FOC1 from less than 14.11 to 18.33%, and they inhibited FOC2 from 14.28 to 19.05%. The antagonistic potential was also noted to vary through volatile metabolites, and direct parasitism on the pathogen among different isolates of an antagonist rhizobacteria isolate. In addition, a change in mycelia color which was a different than the mycelium color of the control, close to the FOC colony was observed. We noted a stronger antibiosis mechanism of antagonistic rhizobacteria and a higher pathogen inhibition through volatile metabolites. Volatile toxic substances produced by antagonists spread easily and inhibit pathogen growth *in vitro*.

Five isolates highly efficient towards two isolates of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, were finally selected based on the performance of *in vitro* isolates selected for their ef-

iciency on individual pathogens. These selected efficient strains were used for further studies.

The production of antifungal compounds and siderophores is a primary mechanism in suppressing disease by *Bacillus* spp. and fluorescent *Pseudomonas* spp. (Edwards *et al.* 1994).

Peptide antibiotics and several other compounds which are toxic to plant pathogens have been recovered from several *Bacillus* strains (Yu *et al.* 2002).

***Bacillus* spp. efficiency on chickpea *Fusarium* wilt disease in pot and field experiments**

Pots assay

These tests showed that susceptible cultivar reacts to FOC1 with a high incidence of *Fusarium* wilt. Nevertheless, 6 weeks after sowing, there was 100% more disease on wilted plants. Bacterized seeds with isolates Rb29, Rb6, Rb12, Rb4, and Rb15 significantly reduced the percentage of wilted plants, from 99–60%. All chickpea seedlings inoculated by a conidial suspension of FOC1 had a 3.8 mean score rating of infection, and showed foliage with yellowing or necrosis in acropetal progression. This is characteristically distinctive of *Fusarium* wilt with 100% wilt incidence. Compared to plants from seeds treated with the *Bacillus* isolates towards FOC1, we noted less yellowish foliage and low disease severity. We demonstrated that *Bacillus* isolate treatments enhance chickpea growth in pots under controlled conditions, even if growth promotion varies with the treatment.

Field assay

We first observed that seed germination is much better when seeds were only inoculated with FOC1. Mashooda Begum *et al.* (2003) reported the same result. They showed that colonization of the bacterial strains *B. pumilus* (SE-34), *B. pasteurii* (T4), *B. subtilis* (IN 937-6), and *B. subtilis* (GB-03) reduced seed mycoflora incidence. This indirectly enhances seed germination percentage and the seedling strength index. In addition, we observed that the typical yellowing form of symptoms start on the bottom shoots and gradually go up until there is severe leaf sclerosis and flaccidity. Wilt appears after 25 days in all seedlings that were inoculated only with FOC1. We found a 3.7 average wilt severity and a 97.93% wilt incidence. We note that *Bacillus* isolates: reduced disease severity caused by FOC1 (Fig. 1), that disease incidence decreased, and that chickpea seedlings were significantly protected against *Fusarium* wilt. There were differences within the isolates. We found that *Bacillus* spp. (Rb29) had a stronger ability to control FOC1 compared to the ability of Rb15. We also found that disease appearance drops with isolates Rb29, Rb6, Rb12, Rb4, and Rb15 at 98, 81, 68, 64, and 57.20%, respectively. The decrease in disease is significant in bacterized treatment. We noticed a big difference. Plants treated with isolates Rb29 get significantly stronger if compared to plants resulting from seeds inoculated only with FOC1 conidia. In this case, treatment with *Bacillus* spp. Rb29 enhances the biomass of plants and increases the total number of leaves. Our investigations suggest, that if we compare plants infected only with FOC1, a modified rooting system may

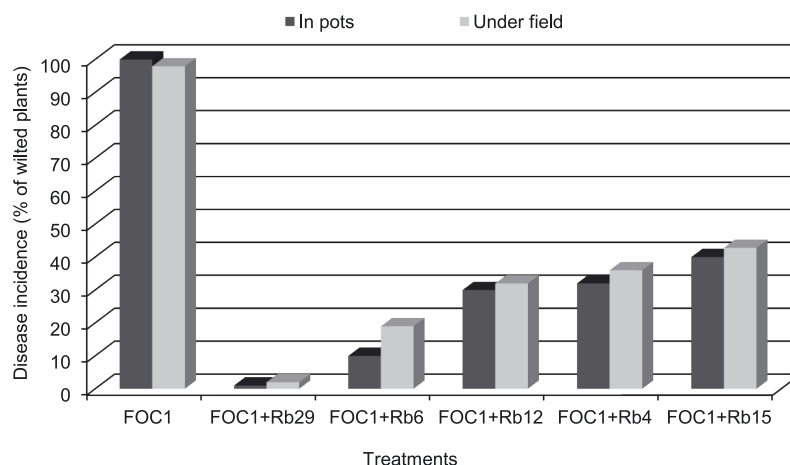


Fig. 1. Reduction of Fusarium wilt (%), in pots and in the field conditions, and a comparison between inoculated plants by FOC1 alone and inoculated plants treated by *Bacillus* spp.

be related to the increased growth response caused by *Bacillus* isolates. Plants infected only with FOC1, displayed stunted and reduced root systems.

Bacillus spp. from spores, are resistant to unfavorable conditions and can thus be adapted to the field. According to Gardener (2004), diverse populations of aerobic endospore-forming bacteria appear in agricultural fields, this may directly and indirectly contribute to crop productivity. Multiple *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. can promote crop health in varied ways. In addition, through the work of Reva *et al.* (2004), and Demoz and Korsten (2006), we know that some *Bacillus* spp. are good root colonizers and can effectively protect infection regardless of soilborne or airborne pathogens.

Choudhary and Johri (2009) demonstrated that the number of *Bacillus* strain activities suppress pathogens or otherwise promote plant growth. Improvements in plant health and productivity are mediated through three different ecological mechanisms: (i) pathogen antagonism, (ii) host nutrition and growth promotion, and (iii) plant host defense stimulation. Rhizobacteria are ideal for use as biocontrol agents. Rhizobacteria inhabit the rhizosphere that provides the front line defense for roots against attack by pathogens. Pathogens find antagonism from rhizobacteria before and during primary root infection. Rhizobacteria are reported to provide protection against several plant pathogens. Generally, rhizobacteria traits associated with plant pathogens biocontrol include: antibiotic synthesis (Haas and Defago 2005), production of low molecular weight metabolites such as hydrogen cyanide with antifungal activity (Dowling and O'Gara, 1994), production of enzymes including chitinase, β -1-3-glucanase, protease, and lipase. These enzymes can lyse some fungal cells (Chet and Inbar 1994). According to O'Sullivan and O'Gara (1992) and Loper and Henkels (1997), producing oxidative stress enzymes such as catalases, superoxide dismutases, peroxidase, and polyphenol oxidases is effective in scavenging active oxygen species, out-competing phytopathogens for nutrients and occupying niches on the root surface.

Rhizosphere competition with biocontrol agents is potentially important for controlling plant diseases. This study led to the selection of potential biocontrol agents

against chickpea *Fusarium* wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, and demonstrated that local isolates of *Bacillus* spp. have a prospective use as biological control agents to protect chickpea plants. Characterizing efficient biocontrol agents against soilborne diseases is important for carrying out a successful action in complex environmental conditions and dynamic rhizosphere.

REFERENCES

- Chet I., Inbar J. 1994. Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochem. Biotechnol. 48 (1): 37–43.
- Choudhary D.K., Johri B.N. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiol. Res. 164 (5): 493–513.
- Demoz B.T., Korsten L. 2006. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. Biol. Control 37 (1): 68–74.
- Dileep Kumar B.S. 1999. Fusarial wilt suppression and crop improvement through two rhizobacterial strains in chickpea growing in soils infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Biol. Fert. Soils 29 (1): 87–91.
- Dowling D.N., O'Gara F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. Trends Biotechnol. 12 (Suppl. 4): 133–141.
- Edwards S.G., McKay T., Seddon B. 1994. Interaction of *Bacillus* species with phytopathogenic fungi. Methods of analysis and manipulation for biocontrol purposes. p. 101–118. In: "Ecology of Plant Pathogens" (J.P. Blakeman, B. Williamson, eds). Wallingford, UK, CAB International, 384 pp.
- El Aoufir A. 2001. Étude du Flétrissement Vasculaire du Pois Chiche (*Cicer arietinum*) Causé par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Evaluation de la Fiabilité de L'analyse Isoenzymatique et de la Compatibilité Végétative pour la Caractérisation des Races Physiologiques. Thèse de doctorat, Université Laval, Canada, 161 pp.
- El Hassni M., El Hadrami A., Daayf F., Chérif M., Ait Barka E., El Hadrami I. 2007. Biological control of bayoud disease in date palm: selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. Environ. Exp. Bot. 59 (2): 224–234.

- Elad Y., Chet I., Katan J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70 (2): 119–121.
- Elad Y., Chet I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology* 77: 190–195.
- Fang Z.D. 1998. *Plant Pathology Technology*. 3rd ed. Beijing: Chinese Agriculture Press, 243 pp. (in Chinese).
- Fiddaman P.J., Rossall S. 1995. Selection of bacterial antagonists for the biological control of *Rhizoctonia solani* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Pathol.* 44 (4): 695–703.
- Földes T., Bánhegyi I., Herpai Z., Varga L., Szigeti J. 2000. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 89 (5): 840–846.
- Gardener B.B.M. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. *Agricultural Systems Symposium the Nature and Application of Biocontrol Microbes: Bacillus* spp. *Phytopathology* 94 (11): 1252–1258.
- Gerhardson B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.* 20 (8): 338–343.
- Haas D., Defago G. 2005. Biological control of soil borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (4): 307–319.
- Haware M.P. 1990. *Fusarium* wilt and other important diseases of chickpea in the Mediterranean area. *Options Méditerranéennes, Série Séminaires* 9: 61–64.
- Holt J.G., Kreig N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 816 pp.
- Idris H.A., Labuschagne N., Korsten L. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biol. Control.* 40 (1): 97–106.
- Jiménez-Gasco M.M., Navas-Cortés J.A., Jiménez-Díaz R.M. 2004. The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *Int. Microbiol.* 7 (2): 95–104.
- Johri B.N., Sharma A., Virdi J.S. 2003. Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 84: 49–89.
- Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I., Lugtenberg B. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* 7 (11): 1809–1817.
- Labdi M. 1990. Chickpea in Algeria. *Options Méditerranéennes, Série Séminaires* 9: 137–140.
- Labdi M. 1995. Etude de la résistance à l'antracnose (*Ascochyta rabiei*) chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Thèse de Doctorat, ENSA de Montpellier, France, 143 pp.
- Pluvinaige J. 1990. Chickpea in the Mediterranean production systems: two contrasting examples of possible developments in Algeria and France. *Options Méditerranéennes, Série Séminaires* 9: 133–136.
- Landa B.B., Hervas A., Bethiol W., Jimenez-Diaz R.M. 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica* 25 (4): 305–318.
- Landa B.B., Navas-Cortés J.A., Hervás A., Jiménez-Díaz R.M. 2001. Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of *Fusarium* wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology* 91 (8): 807–816.
- Landa B.B., Navas-Cortés J.A., Jiménez-Díaz R.M. 2004. Influence of temperature on plant-rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of *Fusarium* wilt of chickpea. *Plant. Pathol.* 53: 341–352.
- Loper J.E., Henkels M.D. 1997. Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1): 99–105.
- Mashooda B., Ravisankar Rai V., Lokesh S. 2003. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed borne fungal pathogens in okra. *Indian Phytopathol.* 56 (2): 156–158.
- Milner J.L., Silo-Suh L., Lee J.C., He H., Clardy J., Handelsman J. 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (8): 3061–3065.
- O'Sullivan D.J., O'Gara F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56: 662–676.
- Reva O.N., Dixelius C., Meijer J., Priest F.G. 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48 (2): 249–259.
- Saharan B.S., Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci. Med. Res.* 2011, p. 21.
- Sang M.K., Chiang M.H., Yi E.S., Park K.W., Kim K.D. 2006. Biocontrol of Korean ginseng root rot caused by *Phytophthora cactorum* using antagonistic bacterial strains ISE13 and KJ1R5. *Plant. Pathol. J.* 22 (1): 103–106.
- Schmidt C.S., Agostini F., Leifert C., Killham K., Mullins C.E. 2004. Influence of soil temperature and matric potential on sugar beet seedling colonization and suppression of *Pythium* damping-off by the antagonistic bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 94 (4): 351–363.
- Sneath P.H.A. 1986. Endospore forming Gram-positive rods and cocci. p. 1104–1137. In: "Bergey's Manual of systematic Bacteriology" (N.R. Krieg, J.G. Holt, eds.). Vol 2, Williams and Wilken, Baltimore, MD, 2898 pp.
- Suarez-Estrella F., Vargas-Garcia C., Lopez M.J., Capel C., Moreno J. 2007. Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop. Prot.* 26 (1): 46–53.
- Swain M.R., Ray R.C. 2007. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. *Microbiol. Res.* 164 (2): 121–130.
- Villajuan-Abgona R., Kagayama K., Hyakumachi M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of cucumber by non pathogenic binucleate *Rhizoctonia*. *Eur. J. Plant Pathol.* 102 (1996): 227–235.
- Yadav J., Verma J.P., Tiwari K.N. 2011. Plant growth promoting activities of fungi and their effect on chickpea plant growth. *Asian J. Biol. Sci.* 4 (3): 291–299.
- Yoshida S., Hiradate S., Tsukamoto T., Hatakeda K., Shirata A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91 (2): 181–187.
- Yu G.Y., Sinclair J.B., Hartman G.L., Bertagnolli B.L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* 34 (7): 955–963.