



Faculté des sciences de la Nature et de la vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Option: Microbiologie appliquée

# THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DE DIPLOME DE  
DOCTORAT ES- SCIENCES

Par

**BOUZNAD AHCENE**

**Isolement et caractérisation des rhizobactéries libres et endophytes (*Bacillus sp* et *Pseudomonas sp*): Etude de leur pouvoir protecteur vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* et leur caractères liés à la promotion de la croissance des plantes.**

## MEMBRES DE JURY

<b>Youcef-Benkada Mokhtar</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université Mostaganem</b>	<b>Président</b>
<b>Bellahcene Miloud</b>	<b>Professeur,</b>	<b>C.U. Ain-Témouchent</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Belabid Lakhdar</b>	<b>Professeur,</b>	<b>Université Mascara</b>	<b>Examineur</b>
<b>Michel Nicole</b>	<b>Directeur de recherche</b>	<b>I.R.D Montpellier</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mekhaldi Abdelkader</b>	<b>Professeur,</b>	<b>Université Mostaganem</b>	<b>Examineur</b>
<b>Djibaoui Rachid</b>	<b>Maitre de conférences,</b>	<b>Université Mostaganem</b>	<b>Examineur</b>

Année universitaire 2015/2016

Travail réalisé dans le laboratoire de microbiologie et biologie végétale, Mostaganem

# Avant Propos

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale (LMBV) à l'université de Mostaganem. Tout d'abord, je tiens à remercier tous les directeurs qui se sont succédé à la tête du laboratoire ainsi que tous les membres fondateurs avec j'ai eu souvent des moments très agréables.

Le travail a été réalisé sous la direction du Professeur BELLAHCENE Miloud. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir encadré toutes ses années durant, pour sa patience, pour ses corrections et ses conseils constructifs tout au long de ce parcours. Je lui suis aussi reconnaissant pour sa disponibilité et ses encouragements quand la volonté et le souffle de continuer me font défaut. J'ai énormément appris à son contact.

Mes remerciements vont également à Monsieur MICHEL Nicole, directeur de recherche à l'IRD de Montpellier, pour son accueil chaleureux ainsi que sa disponibilité durant ma visite à son laboratoire.

J'exprime également toute ma gratitude et mes remerciements à Monsieur YUCEF-BENKADA Mokhtar, Professeur à l'université de Mostaganem, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.

Je remercie Monsieur BELABID Lakhdar, Professeur à l'université de Mascara, pour le temps qu'il m'a consacré pour examiner ce travail. Mes remerciements s'adressent également à mes collègues MEKHALDI Abdelkader, professeur à l'université de Mostaganem et Monsieur DJIBAOUI Rachid, maître

de conférences à l'université de Mostagenem, pour leurs encouragements et leurs remarques pertinentes.

Etant donné qu'un travail de recherche ne se fait jamais seul, je tiens à adresser un grand remerciement également aux membres du laboratoire de microbiologie végétale, à tous les étudiants du département de biologie auprès desquels parfois j'ai retrouvé le courage pour continuer ce parcours : Hakim, Hiba, Imène, Amina et tous les autres.

En fin un grand bisou à tous mes enfants (quatre), mon épouse et mes frères et sœurs.

## DEDICACES

*Je remercie allah le généreux pour m'avoir guidé  
vers la lumière de la science.*

*A la mémoire mes très chers parents*

*A la mémoire de mon très cher ami Bouleknafet*

*Ahmed.*

*A ma chère épouse*

*A mes enfants : Amine, Nafaa, Bahaeddine et....*

*Farès.*

*A tous mes professeurs*

*Je dédie ce travail*

*Ahcene*

## TABLE DES MATIERES

Avant propos	
Table des matières	
Liste des abréviations	
Index des figures	
Index des tableaux	
Résumé	
Introduction	

### Chapitre I : Rhizobactéries libres et endophytes

---

I.1. Rhizosphère.....	4
I.2. Microorganismes et rhizosphère .....	5
I.2.1. les Bactéries épiphytes (de surface des racines) .....	5
I.2.2. Bactéries endophytes .....	6
I.2.2.1. Modes de pénétration des bactéries endophytes au sein de la plante .....	7
I.3 Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (RPCP) ou (PGPR): .....	8
I.3.1. Les Pseudomonas.....	9
I.3.1.1. Définition .....	9
I.3.1.2. Taxonomie du Pseudomonas : Historique et outils d'identification.....	9
I.3.1.3. Habitat des Pseudomonas .....	12
I.3.1.4. Activité des espèces de Pseudomonas dans la lutte biologique .....	13
I.3.2. Les Bacillus.....	15
I.3.2.1. Caractères bactériologiques du genre Bacillus .....	16
I.3.2.2. Habitat des Bacillus .....	17
I.3.2.3. Activité des espèces de Bacillus dans la lutte biologique.....	18

### Chapitre II : Mécanismes d'action

---

II.1. Mécanismes d'actions des bactéries impliquées dans la lutte biologique .....	19
II.1.1. La compétition.....	20
II.1.2. Antibiose.....	22
II.1.2.1. Production des antibiotiques par les rhizobactéries.....	22
II.1.3. Hyperparasitisme .....	25
II.1.4. Induction de la résistance de la plante hôte .....	27
II.2. Mécanismes d'action impliqués dans la promotion de la croissance de l'hôte .....	28

II.2.1. Solubilisation du phosphate inorganique.....	28
II.2.2. Production des phytohormones .....	30
II.2.2.1. Production de l'acide indole acétique (AIA):.....	30

### **Chapitre III : Plante hôte**

---

III.1. Historique et Origine de la tomate .....	32
III.2. Etymologie .....	32
III.3. Classification botanique .....	32
III.4. Description botanique.....	33
III.4.1. L'appareil végétatif .....	34
III.4.2. L'appareil reproducteur de la tomate .....	34
III.5. Culture et importance alimentaire de la tomate.....	36
III.6. Importance alimentaire et économique de la tomate.....	36
III.6.1 Valeur nutritionnelle de la tomate .....	36
III.6.2. Importance économique de la tomate dans le monde.....	37
III.6.3. Importance économique de la tomate en Algérie.....	38
III.7. Les maladies de la tomate .....	40
III.7.1. Maladies d'origine bactérienne (les bactérioses) .....	40
III.7.2. Maladies d'origine virale .....	41
III.7.3. Maladies cryptogamiques.....	42
III.7.4. Stratégies de lutte .....	46

### **Chapitre IV : L'agent pathogène**

---

IV.1. L'agent pathogène: Fusarium oxysporum f.sp lycopersici .....	48
IV.1.1. Taxonomie du Fusarium oxysporum .....	49
IV.1.2. Biologie de F. oxysporum .....	50
IV.1.3. Cycle de vie du champignon Fusarium oxysporum.....	51
IV.1.4. Pathogénie du Fusarium oxysporum.....	54
IV.1.4.1. Les enzymes .....	54
IV.1.4.2. Les toxines .....	55
IV.2. Maladies causées par F. oxysporum chez la plante de tomate.....	57
IV.2.1. La fusariose de la tomate .....	57
IV.2.1.1. Le flétrissement vasculaire de la plante de tomate .....	57

IV.2.1.2. La pourriture de la racine et du collet de la tomate.....	58
IV.3. Méthodes de lutte (Moyens de lutte) contre la fusariose de la tomate.....	59
IV.3.1. Moyens de lutte culturaux.....	59
IV.3.2. Moyens de lutte chimiques.....	59
IV.3.3. Moyens de lutte génétiques ou résistance variétale.....	60
IV.3.4. Lutte physique.....	60
IV.3.5. lutte intégrée.....	60
IV.6.5. Lutte biologique (« biological control » ou « biocontrol »).....	61

## **Chapitre V : Matériel et Méthodes**

---

V.1. Méthodes d'isolement des rhizobactéries libres et endophytes.....	63
V.1.1. Echantillonnage.....	63
V.1.2. Isolements des souches rhizobactériennes à partir de l'ectorrhizosphère.....	63
V.1.3. Isolement des souches bactériennes (épiphytes) à partir de rhizoplane.....	64
V.1.4. Isolement des bactéries endophytes à partir de l'endorrhizosphère.....	65
V.1.4.1. Stérilisation de la surface des racines.....	65
V.1.4.2. Macération des tissus de racines.....	65
V.1.4.2. Isolement des bactéries endophytes cultivables.....	65
V.1.5. Purification des isolats bactériens.....	65
V.1.6. Caractérisation des isolats par étude des caractères microscopiques et biochimiques.....	66
V.1.7. Conservation des isolats bactériens.....	66
V.II. Isolement et caractérisation de l'agent pathogène.....	66
V.II.1. Prospection et évaluation de l'importance de la fusariose de la tomate dans la zone d'étude.....	66
V.II.1.2. Collecte des échantillons.....	66
V.II.2. Caractérisation de l'agent pathogène.....	67
V.II.2.1. Isolement de l'agent phytopathogène.....	67
V.II.2.2. Purification de l'agent pathogène.....	67
V.II.2.3. Préparation d'une culture monospore.....	67
V.II.2.4. Identification macroscopique et microscopique du pathogène.....	68
V.II.3. Estimation du pouvoir pathogène des isolats de <i>F. oxysporum</i> .....	68
V.II.3.1. Evaluation de la pathogénie des isolats de <i>F. oxysporum</i> in planta.....	68
V.3. Etude de l'activité antagoniste in vitro des isolats bactériens vis-à-vis de <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> .....	71
V.3.1. production des substances diffusibles (Antibiose).....	71

V.3.2. Production des substances volatiles et l'acide cyanhydrique (HCN).....	71
V.3.2.1. Test de la production des substances volatile.....	71
V.3.2.2. Test de la production de l'acide cyanhydrique (HCN) : .....	72
V.3. 3. Production des sidérophores.....	72
V.3.4. Production d'enzymes hydrolytiques .....	72
V.3.4.1. Production de l'amylase .....	72
V.3.4.2. Production de la protéinase .....	73
V.3.4. 3. Production de la cellulase.....	73
V.3.4.5. Production de la pectinase.....	73
V.4. Etude des propriétés associées à l'action des isolats sur la promotion de la croissance de la plante tomate .....	74
V.4.1. Solubilisation des phosphates inorganiques .....	74
V.4.2. Production d'acide indole acétique (AIA).....	74
V.4.2.1. Effet de la concentration du tryptophane sur la production de l'acide indole acétique (AIA).....	75
V.4.3. Production de l'ammoniaque (NH <sub>3</sub> ).....	75
V.5. Evaluation in vivo de la capacité des souches microbiennes pré-sélectionnées pour la promotion de la croissance de plants de tomate .....	76
V.5.1. Protocole de désinfection des graines de tomate.....	76
V.5.2. Préparation de l'inoculum bactérien (antagoniste).....	76
V.5.3. Préparation du sol.....	77
V.5.4. Détermination du taux de germination et l'index de vigueur.....	77
V.5.5. Evaluation de l'effet de l'inoculation par les isolats bactériens sur la promotion de la croissance des plants de tomate.....	78
V.6. Evaluation de l'effet protecteur des plants de tomate par des isolats bactériens vis-à-vis de l'agent pathogène ( <i>F. oxysporum</i> f. sp lycopersici) .....	79
V.6.1. Préparation de l'inoculum fongique (agent pathogène) : .....	79
V.6.2. Préparation du sol infecté avec <i>F.oxysporum</i> f. sp lycopersici .....	79
V.6.3. inoculation des plantules de tomate.....	79
V.6.4. Lecture des résultats .....	80
V.7. Analyses statistiques.....	80

## **Chapitre VI : Résultats et discussion**

---

VI.1. Isolement des rhizobactéries libres et endophytes à partir de la rhizosphère des plantes de tomate .....	81
VI.1.1.Discussion .....	85

VI.2. Agent pathogène .....	88
VI.2.1. Résultats des prospections et importance de la maladie : .....	88
VI.2.2. Symptomatologie de la maladie : .....	88
VI.2.3. Caractérisation morphologique et identification de l'agent pathogène .....	88
VI.2.3.1. L'identification macroscopique .....	88
VI.2.3.2. L'identification microscopique .....	90
VI.2.3.3. Détermination des morphotypes .....	91
VI.2.4. Test du pouvoir pathogène des isolats de <i>F. oxysporum</i> .....	93
VI.2.5. Ré-isolement de l'agent pathogène .....	95
VI.2.6. Discussion .....	96
VI.3. Etude de l'activité antagoniste in vitro des isolats bactériens vis-à-vis de <i>F. oxysporum</i> f. sp lycopersici .....	98
VI.3.2. Activité antagoniste des rhizobactéries isolées à partir de la rhizoplane .....	100
VI.3.3. Activité antagoniste des rhizobactéries (endophytes) isolées à partir des tissus internes des racines.....	101
VI.3.4. Effet du milieu de culture sur l'activité antagoniste .....	102
VI.3.5. Inhibition par les substances volatiles et production de l'acide cyanidrique (HCN) .....	103
VI.3.6. Production des sidérophores (Pyoverdines).....	105
VI.3.7. Activités enzymatiques lytiques des isolats rhizobactériens.....	106
VI. 3.8. Discussion .....	112
VI.4. Etude des propriétés associées à l'action des isolats sur la promotion de la croissance de la plante tomate .....	116
VI.4.1. Solubilisation des phosphates inorganiques.....	116
VI.4.2. Production d'acide indole acétique (AIA) .....	120
VI.4.3. Production de l'ammoniaque (NH <sub>3</sub> ).....	121
VI.4.4. Discussion .....	124
VI. 5.1. Sélection des isolats utilisés dans l'évaluation in vivo .....	127
VI.5.2. Effet de la bactérisation des semences de tomate sur le taux de germination et l'index de vigueur.....	128
VI.5.3. Effet de la bactérisation sur la promotion de la croissance de la plante.....	129
VI. 5.3.1. Promotion de la longueur et poids des racines.....	129
VI. 5.3.2. Promotion de la longueur et le poids de la tige.....	132
VI.5.3. Discussion .....	135
VI.6. Evaluation de l'effet protecteur des plants de tomate par des isolats bactériens vis-à-vis de l'agent pathogène ( <i>F. oxysporum</i> f. sp lycopersici) .....	138
VI.6.1. Evaluation de l'effet de protecteur des isolats antagonistes sur l'incidence de la maladie .....	138

VI.6.2. Evaluation de l'effet de protecteur des isolats antagonistes sur les paramètres de croissance des plantules de tomate.....	139
VI.6.2.1. Effet sur la longueur de la tige et des racines.....	139
VI.6.2.2. effet sur le poids sec de la tige et des racines.....	140
VI.6.3.Discussion .....	141
<b>Conclusion et perspective .....</b>	<b>143</b>
<b>Référence bibliographique .....</b>	<b>147</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>178</b>
<b>Publication</b>	

---

## Abbréviations

---

AIA : acide indole acétique

BSP : Bactéries solubilisant le phosphate

CMC : carboxy methyl cellulase

FOL : *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*

HCN : Hydro cyanidric acid

IAF : indice d'altération foliaire

ISP : Indice de solubilisation de phosphate

ISR : induced systemic resistance

IV : index de vigueur

PBS : Phosphate buffer saline

PDA : Potato dextrose agar

PGP : Plant Growth Promotion

PGPR : Plant growth promoting rhizobacteria

PVK : Pikovskaya

SAR : systemic acquired resistance

TCP : Tricalcique phosphate

## INDEX DES FIGURES

FIGURE	PAGE
<b>Figure I.1 :</b> Coupe longitudinale de la racine montrant les différents composants de la rhizosphère	4
<b>Figure I.2 :</b> Illustration des sites possibles d'infection et de colonisation des racines par des bactéries endophytes présentés par une section longitudinale et transversale d'une racine.	7
<b>Figure II.1.</b> Schéma représentant les mécanismes possibles des PGPR impliqués dans la lutte biologique.	19
<b>Figure II.2.</b> Structures des Sidérophores : (A) : hydroxamate ; (B) : Ferrichrome ; (C): Triacetylfusarinine C. (D): Ferrioxamine. <i>Catecholate Enterobactin.</i>	21
<b>Figure II.3.</b> Structure de quelques métabolites secondaires produits par <i>Pseudomonas</i> sp impliqués dans le contrôle biologique des maladies des plantes.	23
<b>Figure II.4.</b> Schéma général des voies de mobilisation et immobilisation du phosphore dans le sol par les bactéries.	29
<b>Figure II.5.</b> Aperçu des différentes voies de biosynthèse de l'AIA par les bactéries (Les noms de voies sont indiquées par des mots soulignés).	31
<b>Figure III.1.</b> Coupe d'une fleur de tomate.	35
<b>Figure III.2.</b> Coupe transversale d'un fruit de tomate.	35
<b>Figure III.3.</b> Evolution de la superficie de culture de la tomate en Algérie de 2001 à 2010.	39
<b>Figure III.4.</b> Evolution de la production de la tomate en Algérie de 2001 à 2010.	39
<b>Figure III.5.</b> Symptômes de maladies d'origine bactérienne affectant la tomate	41
<b>Figure III.6.</b> Symptômes de certaines maladies cryptogamiques de la tomate.	44
<b>Figure IV.1.</b> Les types de fructifications (spores asexuées) rencontrés chez <i>F. oxysporum</i>	51
<b>Figure IV.2.</b> Cycle de la maladie de flétrissement vasculaire causée par <i>F.oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> chez la tomate.	53
<b>Figure IV.3.</b> Structure chimique de quelques toxines produites par <i>Fusarium</i> sp.	56

<b>Figure IV.4.</b> Symptômes du flétrissement de la tomate causé par <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> .	<b>58</b>
<b>Figure V.1.</b> Carte de la localisation géographique des points de prélèvement des échantillons de plantes et de sol dans la wilaya de Mostaganem.	<b>63</b>
<b>Figure V.2.</b> Dispositif expérimentale pour l'étude de la pathogénie des isolats fongiques.	<b>70</b>
<b>Figure V.3.</b> Culture des plantules de tomate dans plaques alvéoles.	<b>80</b>
<b>Figure VI. 1:</b> Répartition des différents groupes de microorganismes isolés en fonction de ;	<b>83</b>
<b>Figure VI. 2 :</b> Répartition des différents isolats en fonction du type de paroi parmi les trois sites d'isolement	<b>83</b>
<b>Figure VI.3 :</b> Répartition et identification des espèces microbiennes appartenant au groupe des bacilles Gram positif isolées à partir de la rhizosphère des solanacées.	<b>84</b>
<b>Figure VI.4 :</b> Répartition et identification des espèces microbiennes appartenant au groupe des bacilles gram négatif isolées à partir de la rhizosphère des solanacées.	<b>84</b>
<b>Figure VI.5.</b> Aspect macroscopique des colonies de <i>Fusarium oxysporum</i> sur milieu PDA.	<b>90</b>
<b>Figure VI.6.</b> Macroconidies et microconidies observés au microscope optique (x400)	<b>90</b>
<b>Figure VI.7.</b> Les différents morphotypes de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> sur milieu PDA.	<b>92</b>
<b>Figure VI.8.</b> Schéma générale montrant les différentes étapes pour la détermination de l'indice de l'altération foliaire.	<b>94</b>
<b>Figure VI.9.</b> Aspect macroscopique de certains agents pathogènes après ré-isolement sur milieu PDA.	<b>95</b>
<b>Figure VI.10.</b> Résultats des tests de confrontation directs préliminaire pour la sélection des isolats inhibiteurs de la croissance de <i>FOL</i> (trois isolats bactériens différents par boîte).	<b>98</b>
<b>Figure VI.11.</b> Pourcentages d'inhibition de la croissance de <i>FOL</i> par les isolats bactériens isolés à partir de l'ectorrhizosphère.	<b>99</b>
<b>Figure VI.12</b> Pourcentages d'inhibition de la croissance de <i>FOL</i> par des	<b>100</b>

isolats bactériens isolés à partir de la rhizoplane.	
<b>Figure VI.13.</b> Pourcentages d'inhibition de la croissance de <i>FOL</i> par les isolats bactériens endophytes isolés à partir des tissus internes des racines.	<b>101</b>
<b>Figure VI.14.</b> Effet du milieu de culture sur l'activité antagoniste des isolats bactériens vis-à-vis du <i>FOL</i> .	<b>102</b>
<b>Figure VI.15.</b> Effet des substances volatiles produites par les isolats inhibiteurs de la croissance de <i>FOL</i> .	<b>104</b>
<b>Figure VI.16.</b> Mise en évidence de la production de l'acide cyanidrique (HCN)	<b>104</b>
<b>Figure VI.17.</b> Production de la pyoverdine (sidérophore) par les différents isolats (A : croissance en absence de FeCl <sub>3</sub> ; B : Croissance en présence de FeCl <sub>3</sub> )	<b>105</b>
<b>Figure VI.18.</b> Mise en évidence de l'activité enzymatique chez les différents isolats après culture sur milieux gélosés spécifiques (A : CMCase ; B : Protéase ; C : Pectinase ; D : Lipase).	<b>107</b>
<b>Figure VI.19.</b> Répartition générale des activités enzymatiques parmi les souches microbiennes isolées à partir de différents sites de la rhizosphère des plantes de tomates.	<b>108</b>
<b>Figure VI.20 :</b> Répartition des différentes activités enzymatiques par rapport aux origines des souches microbiennes.	<b>108</b>
<b>Figure VI.21.</b> Halos de solubilisation du phosphate inorganique sur milieu PVK.	<b>117</b>
<b>Figure VI.22</b> Index de solubilisation du phosphate chez les rhizobactéries isolées à partir de l'ectorrhizosphère.	<b>118</b>
<b>Figure VI.23.</b> Index de solubilisation du phosphate chez les rhizobactéries isolées à partir de la rhizoplane.	<b>118</b>
<b>Figure VI.24.</b> Index de solubilisation du phosphate chez les rhizobactéries isolées à partir de l'endorrhizosphère.	<b>119</b>
<b>Figure VI.25.</b> Evolution de l'index de solubilisation des isolats en fonction du temps d'incubation.	<b>119</b>
<b>Figure VI.26.</b> Effet de la concentration du tryptophane sur la production de l'acide indole acétique par les rhizobactéries isolées de: A : l'ectorrhizosphère, B : l'endorrhizosphère , C : la rhizoplane.	<b>123</b>

<b>Figure VI.27.</b> Effet de l'inoculation des plantules de tomates par les isolats sur certains sur la croissance des racines.	<b>131</b>
<b>Figure VI.28.</b> Effet de l'inoculation des plantules de tomates par les isolats sélectionnées sur la croissance de la tige.	<b>133</b>
<b>Figure VI.29.</b> Effet du traitement par les agents antagonistes sur l'incidence de flétrissement des plantules de tomates.	<b>138</b>
<b>Figure VI.30.</b> Effet du traitement par des isolats antagonistes sur la longueur de la tige et des racines des plantules de tomates.	<b>139</b>
<b>Figure VI.31.</b> Effet du traitement par des isolats antagonistes sur le poids sec de la tige et des racines des plantules de tomates	<b>140</b>

## INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU	PAGE
<b>Tableau I.1.</b> Quelques exemples récents d'agents de contrôle biologiques à base de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents (depuis 2004).	<b>14</b>
<b>Tableau I.2.</b> Nombre des espèces attribuées au genre <i>Bacillus</i> dans les différents éditions du Manuel de Bergey jusqu'au 1974.	<b>15</b>
<b>Tableau I.3 :</b> Position taxonomique du genre <i>Bacillus</i>	<b>16</b>
<b>Tableau II. 1:</b> les principaux antibiotiques produits par certaines espèces de <i>Bacillus</i> et leur spectre d'action.	<b>26</b>
<b>Tableau III.1.</b> Composition chimique du fruit cru de tomate (moyenne pour 100g de fruit).	<b>37</b>
<b>Tableau III.2.</b> Production mondiale de la tomate en 2007.	<b>38</b>
<b>Tableau III.3.</b> Différentes maladies virales de la plante de tomate.	<b>42</b>
<b>Tableau III.4.</b> Synthèse des principales stratégies de lutte contre les maladies de la tomate.	<b>47</b>
<b>Tableau IV.1.</b> Quelques exemples de souches de <i>Fusarium oxysporum</i> et leurs plantes hôtes spécifiques.	<b>49</b>
<b>Tableau IV.2.</b> Position systématique du <i>Fusarium oxysporum</i> .	<b>50</b>
<b>Tableau IV.3.</b> Symptômes de la pourriture de la racine et du collet causée par <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>radicis-lycopersici</i> .	<b>58</b>
<b>Tableau V.1.</b> Echelle d'évaluation de l'altération foliaire.	<b>68</b>
<b>Tableau VI.1.</b> Origine et caractères macroscopiques des isolats de <i>F. oxysporum</i> .	<b>89</b>
<b>Tableau VI.2 :</b> Indice d'altération foliaire des isolats de F.O.L.	<b>93</b>
<b>Tableau VI.3.</b> Concordance entre l'Activité hydrolytiques et l'activité inhibitrice des différentes souches microbiennes isolées à partir de l'ectorhizosphere des racines de tomates.	<b>109</b>
<b>Tableau VI.4.</b> Concordance entre l'activité hydrolytiques et l'activité inhibitrices des différentes souches microbiennes isolées à partir de la rhizoplane des racines de tomates.	<b>110</b>
<b>Tableau VI.5.</b> Concordance entre l'activité enzymatiques hydrolytiques et	<b>111</b>

<b>l'activité inhibitrice des différentes souches microbiennes isolées à partir de l'endorhizosphère des racines de tomates.</b>	
<b>Tableau VI.6. Production de l'indole acétique et l'ammoniaque par les différentes espèces des rhizobactéries isolées des trois sites de la rhizosphère de la tomate.</b>	<b>122</b>
<b>Tableau VI.7. Caractéristiques des isolats sélectionnés pour l'étude de l'effet <i>in planta</i></b>	<b>128</b>
<b>Tableau VI.8. Effet de la bactérisation sur le pouvoir de germination des graines de tomates</b>	<b>129</b>
<b>Tableau VI.9. Analyse statistique des effets de l'innoculation des plantules de tomate par les différents isolats sélectionnés</b>	<b>134</b>

## ABSTRACT

The plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are commonly inoculated to improve growth and yield of agricultural crops. They are developed to be effective plant growth promoting and successful biocontrol agents by diverse set of traits. The present study focuses on screening of PGPR isolates showing biocontrol to phytopathogenic fungi and promotion of plants growth. 109 strains belonging to *Pseudomonas* and *Bacillus* genera have been isolated from rhizosphere and endosphere of tomato roots from Mostaganem region. Among which, 46.79% have been isolated from ectorrhizospheric region, 35.78% isolated from the rhizoplane and 17.43% from the endorhizosphere. They were screened initially via their *in vitro* antagonistic activity against *F. oxysporum* f. sp *lycopersici* by dual culture inoculation on plate assay. 54.12% of the tested isolates demonstrated a variable inhibition rate of the phytopathogenic agent growth. The production ability of volatiles substances (HCN), siderophores and hydrolytic enzymes (pectinase, CMcellulase, protease and amylase) has also been detected.

These isolates were then tested *in vitro* for specific PGPR traits such as the production of phosphate solubilizing enzymes, Indole Acetic Acid (IAA) and ammonia. Among the tested strains, 41% were able to solubilize the inorganic P, 69% were able to produce AIA and the all isolates were ammonia producers.

Inoculation of tomato seedlings with seven different isolates has significantly enhanced seed germination, seedling vigor index, plant height, fresh weight and dry weight in comparison with control. Biocontrol activity of the seven (07) bacterial isolates has been also evaluated under greenhouse conditions. The results indicated that these Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strains provided a significant increase in shoot and root length, and shoot and root biomass over the uninoculated control.

These results also indicate that the tested PGPR improved growth parameters in tomato plants and contribute towards biocontrol of the tomato wilt pathogen.

**Key words :** PGPR, rhizosphere, plant promotion, biocontrol, *F. oxysporum* f. sp *lycopersici*

## RESUME

Le développement d'un inoculant PGPR efficace nécessite la conjugaison d'un ensemble de caractères diversifiés qui peuvent contribuer fortement à la promotion de la croissance et la protection des plantes. Ainsi, la présente étude se concentre sur le dépistage des isolats PGPR porteurs de multiples caractères liés à la lutte biologique la promotion de la croissance des plantes. 109 souches appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* ont été ainsi isolées à partir de la rhizosphère et l'endosphère des plantes de tomate dans la région de Mostagane (Nord-Ouest, Algérie), parmi lesquelles 46.79 % rhizosphériques, 35.78% épiphytes et 17.43 % endophytes. Le test d'antagonisme direct vis-à-vis du FOL a montré que 54,12% des isolats ont exercé des taux d'inhibition variable de la croissance de l'agent phytopathogène. La capacité des isolats à produire des substances volatiles (HCN), des sidérophores et des enzymes hydrolytiques (pectinase, CMcellulase, la protéase et d'amylase) ont également détectées.

Ces isolats ont ensuite été testés *in vitro* pour leurs traits spécifiques à la promotion de la croissance des plantes tels que la solubilisation de phosphate, la production de l'acide indole acétique (AIA) et de l'ammoniac. Parmi les souches testées, 41% étaient capables de solubiliser le P inorganique, 69% étaient en mesure de produire de l'AIA et la totalité des isolats étaient producteurs d'ammoniac.

L'inoculation des plantules de tomate avec les sept isolats sélectionnés a considérablement amélioré la germination des graines, l'indice de vigueur, la longueur des racines, la hauteur de la tige et le poids sec des racines et de la tige en comparaison avec le témoin. L'activité de protectrice des sept (07) isolats bactériens a été également évaluée dans des conditions en pots sous serre. Les résultats indiquent que ces rhizobactéries favorisant la croissance des plantes en provoquant une diminution de l'incidence de la maladie chez les plantes infectées ainsi qu'une amélioration significative du poids sec et de la longueur des tiges, et la longueur et la biomasse racinaire par rapport aux témoins non inoculés.

Ces résultats indiquent que le PGPR testé améliorée dans les paramètres de croissance des plants de tomate et de contribuer à la lutte biologique de l'agent pathogène tomate flétrissement.

**Mots clés :** PGPR, rhizosphère, endorhizosphere, promotion des plantes, biocontrôle.

## الملخص

يتطلب تحضير البكتيريا المحفزة لنمو النباتات PGPR من الجذور الجمع بين مجموعة من الصفات المتنوعة التي يمكن أن تساهم إلى حد كبير في تعزيز نمو وحماية النباتات. تم التركيز في هذه الدراسة على فحص عزلات من الـ PGPR تحمل سمات متعددة ذات صلة بالمكافحة البيولوجية و تعزيز نمو النبات. 109 سلالة بكتيرية تنتمي إلى جنس *Bacillus* و *Pseudomonas* كلها معزولة من المنطقة الخارجية و الداخلية لجذور نباتات الطماطم المزروعة بمنطقة مستغانم (شمال غرب الجزائر). من بين مجموع هذه العزلات, 46.79% معزولة من المنطقة الخارجية للجذور, 35.78% معزولة من منطقة سطح الجذور و 17.43% من السلالات عزلت من الأنسجة الداخلية للجذور. أظهر اختبار التضاد مع فطر الفيزاريوم (*Fusarium*) المسبب لمرض الذبول عند الطماطم أن 54.12% من العزلات قد تسببت في تثبيط نمو الفطرو بمعدلات محصورة بين 0.1% و 77.78%. كما تم الكشف أيضا علي قدرة هذه العزلات عل إنتاج المواد الطيارة (HCN) والسيدروفورات و انزيمات الحلمهة من نوع البكتينازو السليلازو البروتيازو والأميلاز.

ومن جهة أخرى تم اختبار خصائص العزلات المحفزة لنمو النبات مثل القدرة على إذابة الفوسفات المعدني و إنتاج حمض الإندول أستيك (IAA) و الأمونيا . وقد أظهرت النتائج المتحصل عليها أن 41% من السلالات المختبرة كانت قادرة على إذابة الفوسفات غير العضوي و 69% كانت منتجة لل IAA بينما جميع العزلات كانت منتجة للأمونيا.

إن تطعيم شتلات طماطم بسبعة من العزلات ذات خصائص متعددة أدى إلى تحسن في نسبة إنبات البذور بشكل ملحوظ . كما زاد أيضا في قوة المؤشر و طول الجذور وارتفاع الساق وكذا الوزن الجاف لكل من الساق و الجذور مقارنة بالشاهد .

أما فيما يخص دور السلالات البكتيرية السبعة في وقاية شتلات الطماطم ضد مرض الذبول الوعائي في تربة ملوثة بالعامل الممرض. فقد أشارت النتائج إلى أن هذه العزلات أدت إلى تعزيز النمو من خلال التقليل في تأثير المرض في النباتات المصابة وزيادة كبيرة في الوزن الجاف(الكتلة الحيوية) وطول الساق و الجذر مقارنة مع الشاهد المصاب غير المعامل.

*Introduction*  
*générale*

# INTRODUCTION GENERALE

Les maladies des plantes sont souvent à l'origine de grandes pertes dans les rendements de différentes cultures et représentent ainsi une menace chronique à la sécurité alimentaire pour la population de nombreuses régions du monde. Les méthodes actuelles de lutte contre les maladies affectant ces cultures sont basées principalement sur les fongicides et les bactéricides chimiques comme une méthode fiable pour maintenir la stabilité économique de la production agricole. Les engrais chimiques sont utilisés pour fournir suffisamment de nutriments pour optimiser les rendements des cultures. Cependant, le recours exclusif à l'utilisation de pesticides et d'engrais chimiques de synthèse crée souvent des inquiétudes chez les populations autour de questions de développement de la résistance des agents pathogènes aux pesticides, la pollution de l'environnement, la contamination des eaux de surface et souterraines et les effets secondaires sur les humains, les microorganismes bénéfiques du sol, les insectes, les oiseaux et les poissons (Waard *et al.*, 1993). Ainsi, les préoccupations du public à propos de l'environnement a accru la nécessité d'élaborer et de mettre en œuvre des approches alternatives de contrôle pour la protection des cultures. L'utilisation rhizobactéries favorisant la croissance végétale (PGPR) comme des biopesticides et des engrais biologiques peut être une de ces alternatives (Banerjee *et al.*, 2005; Chandler *et al.*, 2011).

Les PGPR (plant growth promotion rhizobacteria) ou rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (RFCP) est un terme introduit par Kloepper *et Schroth* (1978) pour désigner les bactéries colonisant la rhizosphère des plantes capables aussi bien de stimuler la croissance de leur hôtes, que de réduire les attaques par les agents phytopathogènes (Van Loon *et al.*, 1998 ; Bowen and Rovira, 1999 ; Beneduzi *et al.*, 2012). Les mécanismes par lesquels ces microorganismes exercent leurs effets bénéfiques sont encore mal déterminés. Comme agents de lutte biologique, Les PGPR agissent par deux mécanismes majeurs : un mécanisme direct par antagonisme direct de l'agent pathogène et survient le plus souvent par la production d'antibiotiques (Gupta *et al.*, 2015), l'acide cyanohydrique (HCN) (Flaishman *et al.*, 2001) ou sidérophores (Scher and Baker, 2006) et un mécanisme indirect par induction de la résistance systémique chez la plante. Comme agent biofertilisants les PGPR agissent principalement par : (i) la production ou amélioration de la production de certains régulateurs de croissance chez les plantes e.g. Acide indole acétique ou acide gibbérellique (Arshad and Frankenberger, 1992) (ii) fixation asymbiotique de l'azote atmosphérique ou l'éthylène (Boddey and Dobereiner, 2000) (iii) solubilisation des phosphates inorganiques (De Freitas *et al.*, 2007).

Une large variété de microorganismes est considérée comme des PGPR, parmi les quels on retrouve les espèces appartenant aux genres : *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, etc. (Kloepper et al., 1989; Glick, 1995). Les souches appartenant aux genre *Bacillus* et *Pseudomonas* sont largement exploités (Roopa et al., 2012; Shau et Sindhu, 2011). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux types de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques et ils sont faciles à cultiver *in vitro* ou et à être manipulés au laboratoire. De plus, les bacillus offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu avantage aussi pour la formulation du produit (Raaijmakers et al. 2002; Cavaglieri et al. 2005).

Les PGPR peuvent être aussi classés comme des PGPR extracellulaires (existant dans les différentes parties de la rhizosphère) et des PGPR intracellulaire (existant dans des structures nodulaires, principalement les bactéries fixatrices d'azote) (Berg, 2009 ; Ahmed et Kibret, 2014). Le premier groupe est un groupe hétérogène et qui rassemble des germes appartenant aux différents niveaux de la rhizosphère. On distingue ainsi les PGPR endophytes qui colonisent les tissus internes des racines, les PGPR épiphytes souvent restent attachés à la surface des racines après éliminations des particules du sol et les PGPR rhizosphériques (libres) qui appartiennent à la partie externe de la rhizosphère (Joseph et al. 2007). Contrairement aux PGPR intracellulaires, les PGPR extracellulaires peuvent interagissent avec une large variété de plantes hôtes sans nécessité à former des structures spécifiques (nodules) chez la plante hôte (Lugtenberg and Kamilova, 2009; Drogue et al., 2012). L'application de ces microorganismes et leurs interactions avec les plantes sont largement rapportés comme biofertilisants ou agents de lutte biologique pour par différentes études (Sivasakthi et al., 2014 ; Hassan et Bano, 2015 ).

En Algérie, la culture de la tomate occupe une place privilégiée parmi les cultures maraîchères et joue un rôle socio-économique important dans le développement du pays. Elle occupe jusqu'à 63% de surface agricole cultivée en Algérie. En même temps la quantité annuelle produite est relativement faible, elle ne représente que 8.33% de la production nationale en cultures maraîchères (Anonyme, 2009). Les mauvaises pratiques de culture ou l'attaque par une multitude de microorganismes pathogènes sont autant de facteurs qui peuvent être à l'origine de cette situation.

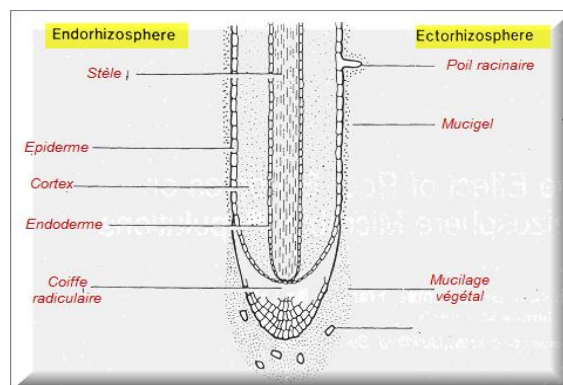
La fusariose de la tomate, causée par *F. oxysporum f. sp lycopersici*, est parmi les maladies responsables de la destruction de grandes superficies de cultures dans le monde entier (Beckman, 1987). Sa présence en Algérie a été rapportée par plusieurs auteurs (Henni et al., 1994, Henni, 1998; Hamini, 2011 ; Benaouali et al., 2014). La disponibilité actuelle de variétés résistantes à l'agent causal ainsi que le recours aux produits phytosanitaires n'ont pas pu contribuer à l'éradication totale de la maladie. Considérant les potentialités multiples des rhizobactéries libres et endophytes, l'objectif de ce travail est d'essayer d'apporter une contribution dans le domaine de lutte biologique par la mise en application de microorganismes capables d'agir directement sur l'agent pathogène en même par action indirecte par leur capacité à promouvoir la croissance de la plante hôte. La stratégie suivie durant cette étude consiste à :

- Isoler des rhizobactéries libres et endophytes appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* à partir de la rhizosphère des plantes de tomates.
- Prospections et isolement de l'agent causal du flétrissement de la tomate dans la région de Mostaganem..
- Evaluer de la capacité des isolats à inhiber la croissance de *Fusarium oxysporum f. sp lycopersici* in vitro et étude des modes d'action possibles impliqués dans cette inhibition.
- Caractériser les isolats exerçant un effet inhibiteur contre *F. oxysporum f. sp lycopersici* par étude de leurs caractères biochimiques et morphologiques.
- Déterminer la capacité des isolats sélectionnés à produire certains métabolites impliqués dans la promotion de la plantes.
- Evaluer la capacité des souches sélectionnées à promouvoir in vivo la croissance des plantes de tomate dans un sol stérile.
- Evaluer la capacité des souches sélectionnées à protéger la culture des plantes dans un sol infecté par *F. oxysporum f. sp lycopersici*.

*Chapitre I :*  
*Rizhobactéries*  
*Libres et*  
*endophytes*

### I.1. Rhizosphère

Le mot "Rhizosphère" a été défini par [Lorenz Hiltner](#) (1904), "Rhizo" vient du grec "rhiza," signifiant "racine", "Sphère" est le champ d'action ou d'influence. Aujourd'hui, ce terme rhizosphère correspond à une définition plus générale : 'c'est le volume de sol soumis à l'influence de l'activité racinaire' ([Darrah, 1993](#)). Ce volume de sol varie avec la nature des plantes, la densité du système racinaire et ses propriétés de surface et les propriétés physico-chimiques du sol ([Abhilash and Singh, 2009](#)). Globalement, il existe trois composantes distinctes reconnues dans la rhizosphère, rhizosphère en soi (le sol: ectorhizosphère), la rhizoplane, et la racine elle-même (endorhizosphère). La rhizosphère est donc la zone de sol influencée par les racines grâce à la libération de substrats qui affectent l'activité microbienne. La rhizoplane est la surface de la racine, y compris les particules de sol adhérant fortement. La racine elle-même (endorhizosphère) est une partie du système racinaire, parce que certains micro-organismes endophytes sont capables de coloniser les tissus racinaires internes ([Bowen et Rovira, 1999](#)) (Figure I.1).



**Figure I.1** : Coupe longitudinale de la racine montrant les différents composants de la rhizosphère

La rhizosphère et la rhizoplane sont des termes utilisés aujourd'hui pour la description de la zone externe des racines ([Botelho et Mendoca-hagler, 2006](#)).

Les plantes, comme la plupart des êtres vivants, vivent au contact de nombreux micro-organismes. Le contact entre plantes et micro-organismes est permanent. Il s'établit dès que la graine tombe au sol, se poursuit et se développe lors de la germination et de la croissance du végétal, et se termine à la mort de celui-ci. Ce contact est aussi étroit puisque l'on peut détecter plus de  $10^6$  bactéries/g de feuille et de  $10^9$  /g de racine ([Gobat et al., 2003](#)).

Un grand nombre d'organismes microscopiques tel que les bactéries, protozoaires et les algues coexistent dans la rhizosphère. Les bactéries sont largement les plus abondants dans cette partie de l'environnement de la plante, il est fort probable qu'ils influencent grandement la physiologie de la plante.

### I.2. Microorganismes et rhizosphère

La rhizosphère est riche en micro-organismes, notamment en bactéries et champignons microscopiques, qui se nourrissent des cellules et des substances sécrétées par la plante dans un processus appelé rhizo-déposition, impliquant une grande quantité de protéines, sucres et autres sécrétions racinaires. De nombreuses symbioses et synergies sont observées entre plantes, bactéries et virus du sol (Hinsinger *et al.*, 1996).

Les interactions entre les bactéries et les plantes sont dynamiques et complexes, elles peuvent être classées en trois catégories: neutre, négatif ou positif (Whipps, 2001). La plupart des rhizobactéries associées aux plantes sont commensaux, dans ce cas les bactéries établissent une interaction inoffensif, qui n'a aucun effet visible sur la croissance et la physiologie de la plante (Beattie, 2006). D'autre part la rhizosphère contient également des rhizobactéries qui influencent négativement la croissance et la physiologie de la plante tel que les phytopathogènes, un troisième groupe de microorganismes stimulent la croissance des plantes par la production d'hormones et d'autres éléments favorisant directement la croissance de la plante ou indirectement par la production de substances capables de supprimer ou ralentir la croissance et le développement des agents phyto-pathogènes (Beattie,2006). En plus de ces classifications fonctionnelles, les microorganismes de la rhizosphere peuvent aussi être regroupées selon les compartiments de la plante qu'ils occupent, dans telle classification on distingue: (I) les bactéries vivant dans le sol près des racines (rhizosphère), utilisant des métabolites libérés par les racines comme sources de carbone et d'azote pour leur croissance (II) bactéries colonisant la rhizoplane (surface radiculaire), (III) les bactéries qui résident dans les tissus des racines, qui habitent les espaces entre les cellules corticales (endophytes) et enfin, (IV) des bactéries vivant à l'intérieur des cellules dans les structures profondes spécialisées (les nodules : bactéries fixatrices d'azote) (Gray and Smith, 2005).

#### I.2.1. les Bactéries épiphytes (de surface des racines)

La surface de la racine de la plante est revêtue d'une couche composée par le mucilage végétal, les cellules bactériennes, les produits métaboliques, les colloïdes organiques et les éléments minéraux. Le mucilage végétal est libéré par les racines sous forme d'exsudats et sécrétions. Les exsudats contiennent des acides aminés, des sucres, des acides organiques, des protéines et des polysaccharides et d'élément favorisant la croissance des microorganismes.

Les bactéries épiphytes sont des bactéries qui sont capables de vivre (c'est-à-dire de se multiplier) sur les surfaces des différentes parties de la plante (racines et feuilles) (Hirano et Upper, 1991; Leben, 1965). Contrairement à ceux qui sont considérés comme des endophytes, les bactéries épiphytes peuvent être éliminées à partir de feuilles par lavage (Leben, 1965), ou tués par irradiation UV ou par une désinfection chimique de la surface des racines (Henis et Basan, 1986).

Toute fois dans ce groupe de bactéries, on distingue ceux qui sont le plus souvent associées à la surface de la feuille et dénommées : phyllobacteries (Beattie et Lindow, 1999) et ceux qui sont appelées : rhizobactéries épiphytiques, utilisé pour désigner toutes les bactéries associées à la racine des plantes.

### I.2.2. Bactéries endophytes

Les bactéries endophytes ont été définies comme des micro-organismes qui pourraient être isolés à partir de la surface des organes végétaux désinfectés (Hardoim et al., 2008). En agronomie, ce concept a été encore élargi pour englober toutes les bactéries qui peuvent être isolées à partir de la surface des tissus végétaux stérilisés et ne nuisent pas visiblement aux plantes hôtes (Hallmann et al., 1997). Conformément à leurs stratégies de vie, les bactéries endophytes peuvent être classées comme «obligatoire» ou «facultatif». Les bactéries endophytes obligatoires ou strictes sont strictement dépendantes de la plante hôte pour leur croissance et leur survie et la transmission à d'autres plantes se produit à la verticale ou par des vecteurs. Les bactéries endophytes facultatives ont au moins un stade de leur cycle de vie dans lequel ils existent en dehors des plantes hôtes (Baldani et al., 1997).

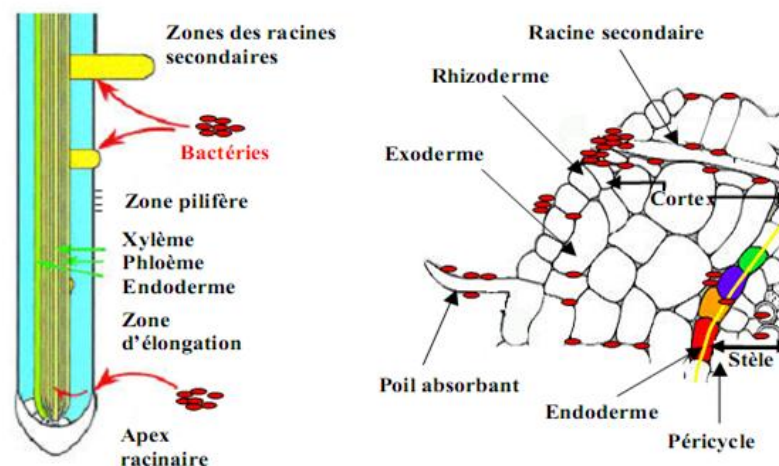
Le cycle de vie des endophytes peut être caractérisé comme un cycle biphasique, en alternant leur présence entre les plantes et l'environnement (principalement des sols). La grande majorité des micro-organismes qui peuvent prospérer à l'intérieur des plantes ont probablement une prédisposition à ce mode de vie biphasique. En fait, la diversité des microorganismes observés à l'intérieur des plantes pourrait s'expliquer par la capacité de ces endophytes d'entrer et de persister dans les tissus de la plante (Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006). Ces endophytes proviennent souvent de la terre, d'abord elles infectent la plante hôte en colonisant, par exemple, les fissures qui se sont formées dans les jonctions des racines latérales, puis en se répandant rapidement dans les espaces intercellulaires des tissus racinaires (Chi et al., 2005).

Bien que d'autres sites d'entrée existent chez la plante (par exemple les blessures causées par des nématodes ou les phytopathogènes microbiens ou les stomates trouvées dans les tissus de la feuille), les fissures profondes sont reconnues comme les principaux points de

prédilection pour la colonisation bactérienne (Sørensen et Sessitsch, 2006). Par conséquent, pour être écologiquement efficace, les endophytes qui infectent les plantes dans le sol doivent être colonisateurs compétents des racines de la plante hôte.

### I.2.2.1. Modes de pénétration des bactéries endophytes au sein de la plante

D'après la littérature, la colonisation endophytique des rhizobactéries au niveau racinaire peut se réaliser de différentes façons (Figure I.2). Tout d'abord, la zone d'émergence des racines secondaires constitue une ouverture naturelle permettant l'entrée des rhizobactéries à l'intérieur de la plante (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998). Ensuite, les blessures provoquées par des facteurs biotiques, comme les bio-agresseurs, peuvent également permettre l'entrée des bactéries (Lodewyckx *et al.*, 2002). Une autre possibilité consiste en la sécrétion par ces micro-organismes d'enzymes dégradant les parois cellulaires de la plante telles que des cellulases, des endoglucanases, des polygalacturonases et des xylanases (Hallman, 2001; Gyaneshwar *et al.*, 2001; Lodewyckx *et al.*, 2002). Cette sécrétion enzymatique est cependant de faible intensité et n'est pas une sécrétion continue qui détruirait les tissus de la plante. Elle permet ainsi juste à certaines PGPR endophytes d'entrer à l'intérieur de leur hôte végétal (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998)



**Figure I.2 :** Illustration des sites possibles d'infection et de colonisation des racines par des bactéries endophytes présentés par une section longitudinale et transversale d'une racine (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998).

### I.3 Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (RPCP) ou (PGPR):

La rhizosphère, définie comme la partie du sol située au voisinage immédiat des racines des plantes, contient plus d'un million de micro-organismes par gramme de sol et l'activité microbienne est particulièrement intense dans cette zone sous influence des racines des différents espèces végétales (Favre- Bonte et al., 2005).

Une partie des bactéries présente dans cette rhizosphère peuvent être impliquée dans l'amélioration de la croissance des plantes par divers mécanismes. L'effet stimulateur de ces espèces microbiennes est connu depuis des décennies et elles ont été introduites dans le sol, sur semences ou dans les racines afin d'améliorer la croissance des plantes et de les protéger vis-à-vis des maladies (Raaijmakers et al., 2002). Le genre *Rhizobium*, un exemple parmi les microorganismes favorisant la croissance, est le groupe le plus largement connu. Il a été commercialisé avec succès avec de nombreuses applications dans l'agriculture pour le développement de la symbiose avec les plantes.

Le terme rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) a été initialement utilisé pour décrire uniquement le groupe microbien impliqué dans la lutte biologique (Kloepper et al., 1980). Ce terme a ensuite été élargi pour englober toutes les bactéries bénéfiques associées aux plantes. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes sont généralement classés en deux grands groupes : (I) bactéries favorisant la croissance des plantes par le bio-contrôle des agents pathogènes (Biocontrol PGPR) et (II) bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) (Bashan et Holguin, 1998).

Les PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) forment un groupe hétérogène de bactéries qui peuvent être trouvées dans la rhizosphère, à la surface des racines et en association avec les racines, qui peuvent améliorer, directement ou indirectement, la qualité de croissance de la plante.

Les PGPR sont majoritairement composées à partir des espèces du genre *Bacillus*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, et *Pseudomonas* et sont considérés comme inoffensifs pour la plante hôte, la densité de leurs population est souvent très élevés ( $10^8$  bactéries / g des racines) (Weller 1988; Lugtenberg et al. 2001).

La plupart des souches bactériennes exploitées comme agent de contrôle biologique (biocontrol BGPR) appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (Haas et Défago, 2005). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des colonisateurs communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies causées par les microorganismes du sol. Ils ont aussi la capacité de produire de nombreux antibiotiques et sont faciles à cultiver ou

à manipuler en laboratoire. 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., 2009; Cavaglieri et al., 2005).

### I.3.1. Les *Pseudomonas*

#### I.3.1.1. Définition

Les *Pseudomonas* est un genre appartenant au groupe des *gamma proteobacteria*, ils forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. Ces bactéries Gram négatives, non sporulantes, sont aérobies obligatoires, à l'exception de certaines souches pouvant utiliser le NO<sub>3</sub> comme accepteur final d'électrons. Leur mobilité est assurée par plusieurs flagelles polaires, et elles ont un métabolisme mésophile et chimioorganotrophe, la plupart étant saprophytes (Bossis et al., 2000). Quelques espèces comme *P. syringae*, sont phytopathogènes et certaines peuvent causer des infections chez l'être humain, particulièrement *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (Mavrodi et al., 2001). Plusieurs études ont souligné le degré de diversité au sein de *P. fluorescens*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différents biovars (Bossis et al., 2000).

Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Premièrement, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). Cette grande rhizo-compétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires (Chin-A-Woeng et al., 2003). De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Fenton et al., 1992 ; Chin-A-Woeng et al., 2001).

#### I.3.1.2. Taxonomie du *Pseudomonas* : Historique et outils d'identification

Le genre *Pseudomonas* a été décrit par Migula (1894). Ses membres sont très répandus dans les habitats naturels tels que le sol, les plantes, les animaux et l'eau (Palleroni, 1984). Les études nutritionnelles de Stanier et al. (1966) ont montré que la capacité des souches de *Pseudomonas* pour utiliser différents composés comme seule source de carbone et de l'énergie fournit l'essentiel pour la caractérisation phénotypique du genre. Les groupes d'espèces diffèrent considérablement dans leur exigence nutritionnelle.

La classification du genre *Pseudomonas* a servi de référentiel pour des bâtonnets droits, strictement aérobies, de couleur crème, Gram-négatifs et souvent mobiles par un ou

plusieurs flagelles polaires. Cette classification a subi de multiples réévaluation sur la base des caractéristiques physiologiques, moléculaires et phénotypiques (Sneath *et al.*, 1981), hybridation de l'ADN (Palleroni, 1984), similarité dans le séquence du gène de l'ARNr 16S (Anzai *et al.*, 2000) et données chimio-taxonomiques (Oyaizu *et Komagata*, 1983; Vancanneyt *et al.*, 1996).

### 1.3.3.1. La classification phénotypique

Des décennies durant, les bactéries ont été caractérisées, regroupées ou identifiées sur la base de caractères phénotypiques : morphologie, pigmentation, réaction vis-à-vis de certains colorants, formation de spores, production d'acide par la dégradation de sucres ou résistance à certains inhibiteurs (Bossis *et al.*, 2000). Ces méthodes simplifiées de caractérisation demeurent encore la base des systèmes d'identification et de classification des espèces du *Pseudomonas*.

Les études de Jensen (1965), qui a classé une grande collection de *Pseudomonas* fluorescents en 82 biotypes, et ceux de Lelliot *et al.* (1966), Stanier *et al.* (1966) ont contribué dans l'amélioration de la classification de ce groupe et sa subdivision en espèces et biotypes. La classification du genre *Pseudomonas* sur des bases phénotypiques a été reprise même dans l'édition du Bergey's manual of determinative bacteriology (1974) avec l'introduction du G+C comme caractère génétique.

Bossis *et al.* (2000) ont proposé une clé dichotomique pour l'identification des *Pseudomonas* fluorescents en se basant sur des caractères phénotypiques tels que la fluorescence, l'oxydase, la capacité de réduire la gélatine, le tréhalose et bien d'autres caractères. Cette clé dichotomique permet de discriminer entre les deux principaux groupes de ces *Pseudomonas* à savoir *P. fluorescens* et *P. putida*.

La découverte plus tard du caractère de renaturation de l'ADN a permis de confirmer la classification phénotypique des *Pseudomonas*, par les essais d'hybridation ADN/ADN ce qui a permis à Palleroni *et al.* (1973) de classer le groupe en cinq sous classes d'ARNr. Néanmoins l'éloignement phénotypique des différents groupes d'ARNr a conduit Peix *et al.* (2009) à établir que seules les espèces du groupe ARNr I appartiennent au genre *Pseudomonas*.

### 1.3.3.2. La classification phéno-génétique

Les premiers changements majeurs dans la taxonomie de *Pseudomonas* fussent apportés par Woese *et al.* (1984) qui ont proposé une nouvelle classification de ces espèces sur la base de leurs ARN ribosomiaux. Toutefois ce nouveau schéma d'identification n'a pas été pris en considération dans l'édition 1994 du Bergey's Manual. Plus tard Kersters *et al.*

(1996) ont repris les propositions de Woese et al. (1984) dans leur rapports pour classer les proteobactéries sur la base de l'ARNr 16s en 15 genres.

A partir de 1990, le séquençage de l'ARNr 16s est appliqué pour l'ensemble des bactéries nouvellement isolées. Partiel au début pour être ensuite appliqué sur l'ensemble du génome. Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S et le développement des modèles mathématiques des arbres représentant les similitudes des séquences ont permis une classification phylogénétique des procaryotes (Peix *et al.*, 2009).

Les résultats des études de similarité d'ARNr chez le genre *Pseudomonas* ont été très frappantes, car ils ont clairement indiqué que genre était en fait une entité multi-génériques qui pourrait être divisée en au moins cinq groupes lointainement apparentés et qui méritent d'être classés en genre indépendants (et éventuellement en famille ou ordre) (Palleroni *et al.* 1973).

En analysant les séquences du gène codant pour l'ARN<sub>r</sub> de 128 espèces de *Pseudomonas* Peix *et al.* (2009) ont conclu que 57 seulement appartenaient aux groupe des *Pseudomonas sensu stricto*; la comparaison de 1073 nucléotides les a subdivisées en 7 classes (Mezaache, 20112):

- Le groupe des *P. syringae*.
- Le groupe des *P. chlororaphis*.
- Le groupe des *P. fluorescens*.
- Le groupe des *P. putida*.
- Le groupe des *P. stutzeri*.
- Le groupe des *P. aeruginosa*.
- le groupe des *P. pertucinogena*.

### 1.3.3.3. La classification chimio-taxonomique

Les études taxonomiques polyphasiques et l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S ont largement contribué à la stabilisation de la taxonomie de *Pseudomonas*. Toutefois, la valeur de la chimio-taxonomie pour aider à délimiter les taxons est encore largement négligée. Plusieurs paramètres chimiques et biochimiques ont été utilisés pour la différenciation entre les espèces de *Pseudomonas*. C'est ainsi que Janse *et al.* (1992), avaient analysé les acides gras d'une collection de phytopathogènes opportunistes, pour clarifier la position taxonomique de souches de *P. marginalis* incluses dans le groupe de *P. fluorescens*. De même que Meyer *et al.* (2002) ont utilisé le siderotypage des *Pseudomonas* fluorescents et non fluorescents ce qui a conduit à la mise en évidence de pyoverdines spécifiques aux espèces.

Actuellement, les techniques les plus modernes d'analyse des biomolécules sont appliquées pour la taxonomie des *Pseudomonas*. En effet, l'empreinte génétique par spectroscopie à fluorescence (spectres d'émission de fluorophores intrinsèques: NADH, tryptophane et un complexe d'acides aminés aromatiques et d'acides nucléiques), a permis une discrimination entre les genres *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Xanthomonas* ou *Stenotrophomonas* avec une grande sensibilité. Mais aussi, entre les espèces de *P. chlororaphis*, *P. lundensis*, *P. fragi*, *P. taetrolens* et *P. stutzeri* groupé séparément de *P. putida*, *P. pseudoalcaligenes* et *P. fluorescens* (Mezaache, 2012).

### I.3.3.4. Les espèces de *Pseudomonas*

Les espèces de *Pseudomonas* sont omniprésentes dans l'environnement et sont répandues dans la rhizosphère et phyllosphère. Un sous-groupe particulier, les *Pseudomonas* fluorescents a fait l'objet de nombreuses études dans le domaine de la lutte biologique. Ces bactéries se distinguent par la formation d'un pigment diffusible, jaune-vert résultant de la production d'un sidérophore, pyoverdine (pseudobactine) (Meyer et Abdallah, 1978). Les *Pseudomonas* fluorescents sont composés d'une gamme d'espèces telles que *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida*.

- *Pseudomonas syringae*: phytopathogène se caractérise par une croissance lente sur les milieux de culture usuels, par l'absence d'arginine dihydrolase et une réaction positive au test d'hypersensibilité des feuilles de tabac. Ils sont également oxydases négatives.
- *Pseudomonas fluorescens*: A l'inverse de *P. aeruginosa*, elle est très hétérogène et se subdivise en biotypes ou biovars sur la base de critères taxonomiques divers. Palleroni (2010) précise qu'aucune de ces subdivisions n'est entièrement satisfaisante, l'exemple le plus représentatif est la description de l'espèce psychotrophe isolée de viande *P. lundensis*, préalablement décrite comme groupe bien défini au sein d'un des biovars.
- *Pseudomonas putida* : espèce fluorescente saprophyte et gélatinase négative, a été divisée par Stanier et al. (1972) en deux biovars: le biovars A et biovars B, ce dernier présente un phénotype plus proche de *P. fluorescens* que de celui de *P. putida* biovars A (Freney et al., 2000).

### I.3.1.3. Habitat des *Pseudomonas*

Les Pseudomonades ont souvent une versatilité nutritionnelle très large, ce qui leur permet de vivre dans des niches écologiques naturelles très diverses. A cause de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreuses conditions environnementales ce qui favorise la sélection de certaines espèces dans certains milieux particuliers.

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes, *P. brassicacearum* et *P. thivervalensis* ont été isolés respectivement de plants d'ail et de riz (Ahouak *et al.*, 2000). *P. rhizosphaerae*, *P. lutea* et *P. argentinensis* isolé de la rhizosphère de l'herbe (Peix, 2005), d'autres ont été isolées à partir de la phyllosphère des plantes le cas de *P. lurida* de la phyllosphère de l'herbe (Behrendt *et al.*, 2007) alors que d'autres peuvent même coloniser les tissus internes des plantes (Ramesh et Joshi, 2009).

Les bactéries de cette famille sont relativement rares au contact de l'homme ; on les retrouve très rarement sur la peau ou les muqueuses, et plus souvent dans la flore intestinale. Elles vivent principalement dans l'eau douce et dans le sol (souches dulçaquicoles). Des souches marines existent aussi, certaines halophiles stricts et d'autres halophiles facultatives, qui appartiennent à diverses espèces dulçaquicoles, en particulier du groupe fluorescent (Le Minor et Véron, 1982).

Elles peuvent aussi grâce au caractère psychotrope de nombreuses souches, détériorer des denrées alimentaires, des médicaments ou des réactifs biologiques conservés au froid (Leminor et Véron, 1982).

### I.3.1.4. Activité des espèces de *Pseudomonas* dans la lutte biologique

L'intérêt pour *Pseudomonas* en lutte biologique a débuté dans les années 1970 par des recherches à l'Université de Californie, Berkeley, où des souches de *Pseudomonas* ont été appliquées sur la pomme de terre, betteraves à sucre et les grains de radis pour l'amélioration de la croissance des plantes (Schoth et Hancock, 1982). Des études ultérieures se sont axées sur le rôle des composés chélateurs de fer ou les sidérophores dans la suppression des agents pathogènes (Klopper 1980; Schroth et Hancock, 1982). Bien que la production d'antibiotiques de *Pseudomonas* a été démontrée *in vitro*, la première preuve expérimentale qu'un antibiotique de *Pseudomonas* était responsable de la suppression de la maladie sur une plante hôte a été démontrée en 1988 par Thomashow et Weller. Leur expérience a clairement démontré que l'antibiotique d'acide pénazine 1-carboxylique (PCA), produit par *P. fluorescens* 2-79 a été capable de supprimer le piétin-échaudage, maladie causée par *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* sur le blé (Thomashow et Weller, 1988). Peu après, une autre étude a été publiée décrivant l'activité antagoniste d'une autre souche, *P. fluorescens* CHAO. La souche *P. fluorescens* 2-79 a été isolé de la rhizosphère du blé. *P. fluorescens* CHAO a été isolé du sol naturellement suppressif au pourriture des racines du tabac. Ces deux espèces ont été émergées comme des organismes de lutte biologique modernes et une pléthore

## Chapitre I : Rhizobactéries libres et endophytes

d'antibiotiques produits par ces dernières et d'autres isolats ont été identifiés. *Pseudomonas chlororaphis* souche MA<sub>342</sub> en traitement de semences de pois a été également testé pour lutter contre les maladies causées par *Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes* et *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (Voisard et al., 1989) .

**Tableau I.1.** Quelques exemples récents d'agents de contrôle biologiques à base de *Pseudomonas* spp. fluorescents (depuis 2004) (Amkraz, 2013)

Agent de contrôle	Plante	Pathogènes à contrôler
<i>P. fluorescens</i> PSR21	Tomate	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>
<i>P. fluorescens</i>	Olivier	<i>Verticillium dahliae</i>
<i>P. putida</i>	Olivier	<i>Verticillium dahliae</i>
<i>P. fluorescens</i> Q8r1-96	Blé	Plusieurs champignons
<i>P. putida</i> HF142	Tomate	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>
<i>P. fluorescens</i> HF22	Tomate	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>
<i>P. fluorescens</i> PGPR1-9	Cacahuète	Plusieurs champignons
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cajanus cajan	Plusieurs pathogènes
<i>P. aeruginosa</i> PUPa3	Plusieurs plantes	Plusieurs champignons
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Plusieurs plantes	Divers phytopathogènes
<i>Pseudomonas</i> sp.	Plusieurs plantes	Divers champignons
<i>P. CMR5c</i>	Le macabo	<i>Pythium myrotylum</i>
<i>P. CMR12a</i>	Le macabo	<i>Pythium myrotylum</i>
<i>P. corrugata</i>	Diverses plantes	<i>F. oxysporum</i> et <i>A. alternaria</i>
<i>P. aeruginosa</i> CMG1055	Divers plantes	Divers champignons
<i>P. chlororaphis</i> PCL1391	Haricot vert	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
<i>P. fluorescens</i> WCS365	Haricot vert	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
<i>P. putida</i> PCL1760	Tomate	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	Canne à sucre	<i>Colletotrichum falcatum</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cotton	<i>Xanthomonas compestris</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	Aubergine	<i>Ralstonia solanacearum</i>
<i>P. putida</i> strain P9	Pomme de terre	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>P. fluorescens</i>	Tomate	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>
<i>P. fluorescens</i>	Riz	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>P. fluorescens</i> PCI2	Tomate	Plusieurs champignons
<i>P. fluorescens</i>	Concombre	Phytophthora drechsleri
<i>Pseudomonas</i> RFP 36	Fève	<i>R. solani</i> et <i>M. phaseolina</i>
<i>P. protegens</i> CHAO	Plusieurs plantes	Divers pathogènes

### I.3.2. Les *Bacillus*

L'histoire du genre *Bacillus* est longue et chevauche avec l'histoire de la bactériologie. '*Vibrio subtilis*' – actuellement *Bacillus subtilis* - a été décrit par Ehrenberg en 1835 et en 1864 Davaine attribut le nom '*Bacteridium*' au microorganisme associé à l'anthrax. Finalement, le genre *Bacillus* a été proposé pour la première fois par Cohn en 1872 (Berkeley, 2002).

En 1872, Ferdinand Cohn, un élève de Robert Koch, reconnut et nomma la bactérie *Bacillus subtilis*. L'organisme a été fait pour représenter un grand nombre et diversifié d'espèces de *Bacillus*, et il a été ensuite placée dans la famille des *Bacillaceae*. La Caractéristique distinctive de la famille est la production d'endospores, qui n'est pas une structure de reproduction, mais plutôt une forme de survie et de résistance en dormance. Depuis ce temps, les membres du genre *Bacillus* sont caractérisés comme des bacilles, gram-positif, aérobies et anaérobies facultatives, formant des endospores (Todar, 2005).

Depuis la découverte (création) du genre *Bacillus*, la systématique du genre a connu des changements massifs. Le tableau I.2 donne un aperçu numérique des espèces attribuées au genre *Bacillus* dans les huit premières éditions de *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* révisées par Gordon (1981) (Berkeley, 2002).

**Tableau I.2.** Nombre des espèces attribuées au genre *Bacillus* dans les différents éditions du Manuel de Bergey jusqu'au 1974 (Gordon, 1981).

Manuel de Bergey	Année	Nombre des espèces
1 <sup>ere</sup> édition	1923	75
2 <sup>eme</sup> édition	1925	75
3 <sup>eme</sup> édition	1930	93
4 <sup>eme</sup> édition	1934	95
5 <sup>eme</sup> édition	1938	146
6 <sup>eme</sup> édition	1948	33
7 <sup>eme</sup> édition	1954	25
8 <sup>eme</sup> édition	1974	Groupe I : 22 Groupe II : 26

### I.3.2.1. Caractères bactériologiques du genre *Bacillus*

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles pratiquement rectilignes, à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0.5 x 1.2 µm jusqu'à 2.5 x 10 µm), sporulés, à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que chez les très jeunes cultures). Généralement, mobiles grâce à une ciliature péritriche (*Bacillus anthracis* et *Bacillus mycoides* sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulés (*Bacillus anthracis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* et *Bacillus subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase.

La culture de ces germes peut s'avérer difficile car certaines espèces exigent de nombreux facteurs de croissance. L'aspect des colonies obtenues sur milieu gélosé est extrêmement variable et les phénomènes de dissociation sont fréquents. Lorsque les conditions deviennent défavorables, les *Bacillus* sporulent et donnent des spores (une seule spore par cellule végétative) souvent très résistantes dans le milieu extérieur. Le phénomène de sporulation, n'est pas inhibé par l'oxygène. La sporulation dépend des conditions de culture et, *in vitro*, certaines espèces ne sporulent que dans des milieux spécifiques (Euzéby, 2004). Chez certaines espèces la formation des spores n'a pas été détectée (*B. infernus*, *B. subterraneus*, and *B. thermoamylovorans*) (Logan et Allen, 2008).

**Tableau I.3** : Position taxonomique du genre *Bacillus* (Maheshwari, 2010)

Domaine	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Firmicutes</i>
Classe III	<i>Bacilli</i>
Ordre I	<i>Bacillales</i>
Famille I	<i>Bacillaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Bacillus</i>

Traditionnellement, les espèces du genre *Bacillus* sont réparties en trois groupes selon la morphologie de la spore et du sporange (Euzéby, 2004).

- **Le groupe I** est constitué des bacilles à Gram positif, présentant une spore centrale ou terminale, sphérique ou ovoïde, ne déformant pas la cellule. Ce groupe est divisé en 2 sous-groupes :
  - Le sous-groupe IA** constitué par des bacilles d'un diamètre supérieur à 1 µm et contenant des inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*).
  - Le sous- groupe IB** rassemblant des bacilles d'un diamètre inférieur à 1 mm et dépourvus d'inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate (*Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*...).
- **Le groupe II** est constitué des espèces à Gram variable, présentant une spore ovoïde, centrale ou terminale, déformante (*Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*...).
- **Le groupe III** est caractérisé par des bacilles à Gram variable et présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou sub-terminale (*Bacillus fusiformis*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus insolitus*, *Bacillus sphaericus*...)

### I.3.2.2. Habitat des *Bacillus*

Les *Bacillus* sont des germes de l'environnement dont l'habitat principal est le sol où ils joueraient un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote. La résistance des spores et la diversité physiologique des formes végétatives en font des bactéries très ubiquistes que l'on peut isoler à partir des différents types de sol allant des sols acides aux sols alcalins en passant par les sols neutres du sol, de l'eau de mer, de l'eau douce ou de denrées alimentaires. Quarante-vingt-cinq pour cent des bacilles Gram positif du sol appartiennent au genre *Bacillus*. Les 5% restants appartiennent au genre *Arthrobacter* et *Frankia*.

Plusieurs facteurs sont connus pour affecter la formation des endospores chez les *Bacillus* (température de croissance, pH de l'environnement, l'aération, la présence de certains minéraux et les sources d'azote et du carbone, du phosphore et leurs concentrations), mais deux types de facteurs environnementaux, l'épuisement des éléments nutritifs et la densité de population sont d'une importance particulière dans l'induction de la sporulation. Les endospores sont métaboliquement inertes et cette dormance est la clé de leur résistance à de nombreux agents, notamment la chaleur, les rayonnements et les produits chimiques ce qui leur assure une survie sur de longues périodes (Logan et Halket, 2011).

### I.3.2.3. Activité des espèces de *Bacillus* dans la lutte biologique

Les spores de *Bacillus sp* ont un niveau élevé de résistance à la sécheresse, cette capacité de résistance offre les *Bacillus sp* comme les meilleurs candidats pour le développement des biopesticides efficaces. Les espèces du genre *Bacillus* sont souvent considérés comme des usines microbiennes pour la production d'une vaste gamme des molécules biologiquement actives; ces molécules inhibent la croissance des phytopathogènes, comme les Kanosamines ou Zwittermycine A de *Bacillus cereus* (Emmert et Handelsman, 1999).

L'espèce *Bacillus subtilis* est très connue dans le contrôle biologique notamment dans la lutte de la pourriture de la racine de tomate causée par *Fusarium oxysporum* (Makoto, 2000); dont, 4% à 5% de son génome est orienté vers la synthèse des antibiotiques (Stein, 2005).

Il a été démontré que *Bacillus subtilis* produit plusieurs types d'antibiotiques: bacillomycine, mycosubtiline et mycobaciline qui sont impliqués dans le bio-contrôle (Makoto, 2000).

Fiddman et Rossal (1993) ont démontré que *Bacillus* produit des composés volatiles qui sont des antifongiques contre *Rhizoctonia solani* et *Pythium ultimum*. La croissance de ces deux champignons a été sévèrement diminuée par la présence de ces composés volatiles, ainsi que des anomalies physiologiques du mycélium ont été observées incluant leur déformation et vacuolisation (Anandhakummar, 2006).

*Bacillus cereus* synthétise une enzyme chitinolytique qui est utilisé dans le biocontrôle contre *Rhizoctonia solani*. L'espèce *Bacillus mycoides* induit la résistance de betterave à sucre par production des enzymes (peroxydases, chitinases et  $\beta$  1,3 glucanase).

Les Surfactins et lichenysins ont été isolés à partir de *Bacillus coagulans* (Huszcza et Burczyk, 2006), *Bacillus pumilus* et *Bacillus lichenniformis* (Peypoux et al.,1999).

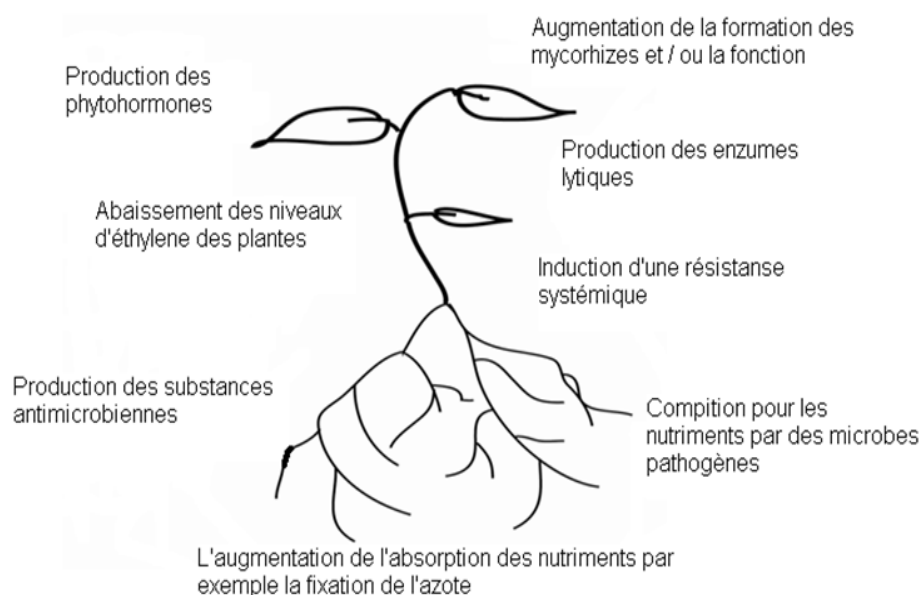
La production des fengycins a été identifiée chez *Bacillus cereus* (Tsuge et al., 1999), *Bacillus thuringiensis* (Kim et al.,2004), *Bacillus subtilis* (Jacques et al.,1999) et *Bacillus amyloliquefaciens* (Koumoutsi et al.,2004).

*Chapitre II :*  
*Mécanismes*  
*d'action*

### II.1. Mécanismes d'actions des bactéries impliquées dans la lutte biologique

La lutte biologique est définie par l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique et intégrée contre les animaux et les plantes nuisibles) (1971) comme étant « l'utilisation d'organismes vivants ou de leurs produits pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs aux productions végétales ». Cette définition a été ensuite élargie pour considérer comme agents de lutte biologique les microorganismes (bactéries, champignons, virus), les composés organiques tels que les extraits de plante ainsi que les substances minérales d'origine naturelle qui permettent le contrôle d'agents pathogènes. Le contrôle biologique offre une alternative prometteuse pour suppléer ou compléter les méthodes conventionnelles de lutte contre les maladies des plantes (Duffy *et al.*, 2003).

La lutte biologique au moyen de microorganismes non pathogènes s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'actions. Ces bactéries peuvent agir directement sur l'agent pathogène, par antibiose, compétition ou parasitisme, ou bien indirectement par stimulation des réactions de défense de la plante conduisant à leur tour à la mise en place d'une résistance systémique vis-à-vis de l'agent pathogène (fig. II.1) (Magnin-Robert, 2007). Selon Guetsky *et al.* (2002), l'efficacité de la lutte biologique peut être parfois insuffisante et la variabilité dans les résultats peut être élevée. Pour surmonter ce problème et améliorer l'efficacité de la lutte biologique, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le bio-contrôle est nécessaire.



**Figure II.1.** Schéma représentant les mécanismes possibles des PGPR impliqués dans la lutte biologique (Lotta, 2008).

### II.1.1. La compétition

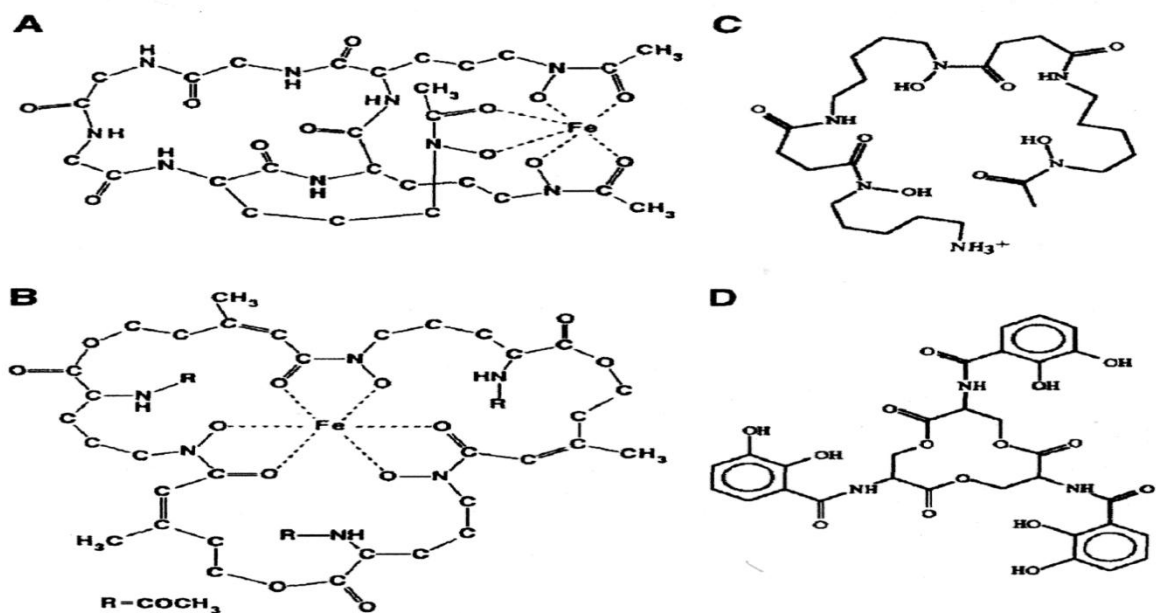
Droby et Chalutz (1994) définissent la compétition comme le chevauchement des niches, où on enregistre une demande simultanée par deux ou plusieurs populations microbiennes pour les mêmes ressources nutritives. Tous les micro-organismes ont besoin d'éléments nutritifs pour leur développement et leur multiplication, la concurrence pour les éléments nutritifs sur les surfaces des plantes ou dans la rhizosphère peut être un mécanisme important de la lutte biologique contre les agents pathogènes qui dépendent des nutriments externes pour le développement de leur population (Shtienberg et al., 2001). Basé la démonstration que l'addition du glucose aux sols suppressifs les transforme en sols conductifs, il a été admis que la compétition pour le carbone est un des mécanismes de la suppression des agents pathogènes dans le sol suppressif. De leur part Lemanceau et al. (1993) ont démontré *in vitro* que la compétition pour le carbone est un mécanisme principale par le quel la souche Fo47 inhibe la croissance de *F. oxysporum* f. sp *dianthi* WCS816. La compétition trophique s'exerce essentiellement pour les exsudats racinaires et pour le fer.

Un cas particulier de la compétition pour les éléments nutritifs repose sur la compétition pour le fer. En effet, ce dernier élément bien qu'abondant dans le sol, s'y trouve essentiellement sous forme oxydée ( $Fe^{3+}$ ) non assimilable par les micro-organismes telluriques. Certains micro-organismes ont la capacité de synthétiser des molécules chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. Ces composés, appelées sidérophores, ont une grande affinité pour le  $Fe^{3+}$  (Figure II.2). En s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, les microorganismes rendent ainsi le fer non disponible pour l'agent pathogène, ce qui provoque un ralentissement de sa croissance. Kloepper et al. (1980) ont été les premiers à prouver la synthèse d'un sidérophore (Pseudobactin) par une souche de *P. putida*. Ces auteurs ont pu démontrer la corrélation entre la synthèse de cette molécule et le potentiel antagoniste de cette souche contre les pathogènes; ceci grâce à l'utilisation de souches mutantes dont le gène responsable de la synthèse de Pseudobactin a été supprimé (Amkraz, 2013).

Dans certains cas, la réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Reyes et al. 2004). Cependant, cette corrélation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n'est dans certains cas pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale. Selon Elad et Stewart (2004). La réduction de la concentration en nutriments dans le milieu conduit généralement à un taux réduit de spores germées de l'agent

pathogène et à un ralentissement de sa croissance mycélienne, limitant ainsi l'infection et l'expansion des lésions.

Une illustration de l'effet de la compétition pour l'espace concerne la lutte biologique contre le *Fusarium oxysporum*, agent de flétrissement des plantes, par l'utilisation de *Fusarium oxysporum* non pathogène (Alabouvette, 1990) ou par *Trichoderma* sp. Il est à noter que les mycorhizes sont aussi considérés comme des colonisateurs d'espaces (Haupt, 2007). Mandeel et Baker (1991) rapportent que le nombre de sites d'infection à protéger par l'agent non pathogène est limité et que le contrôle de l'agent pathogène ne nécessite pas une concentration élevée de l'inoculum par contre un rapport non pathogène/pathogène élevé est nécessaire pour un effet protecteur efficace.



**Figure II.2.** Structures des Sidérophores : (A) : hydroxamate ; (B) : Ferrichrome ; (C) : Triacetylfusarinine C. (D) : Ferrioxamine. *Catecholate Enterobactin* (Leong et Winkelmann, 1998).

### II.1.2. Antibiose

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte (Jacobsen, 2006). Il s'agit de la production par un microorganisme de métabolites secondaires toxiques pour l'agent pathogène qui vont inhiber la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents pathogènes (Montesinos *et al.*, 2009). Des substances responsables de l'antibiose ont pu être caractérisées chez plusieurs souches appartenant à diverses espèces d'agents de lutte biologique (notamment *Bacillus subtilis*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas fluorescens*), et les gènes impliqués dans la production de certaines de ces substances ont été identifiés (Duffy *et al.*, 2003; Raaijmakers *et al.*, 2002).

#### II.1.2.1. Production des antibiotiques par les rhizobactéries

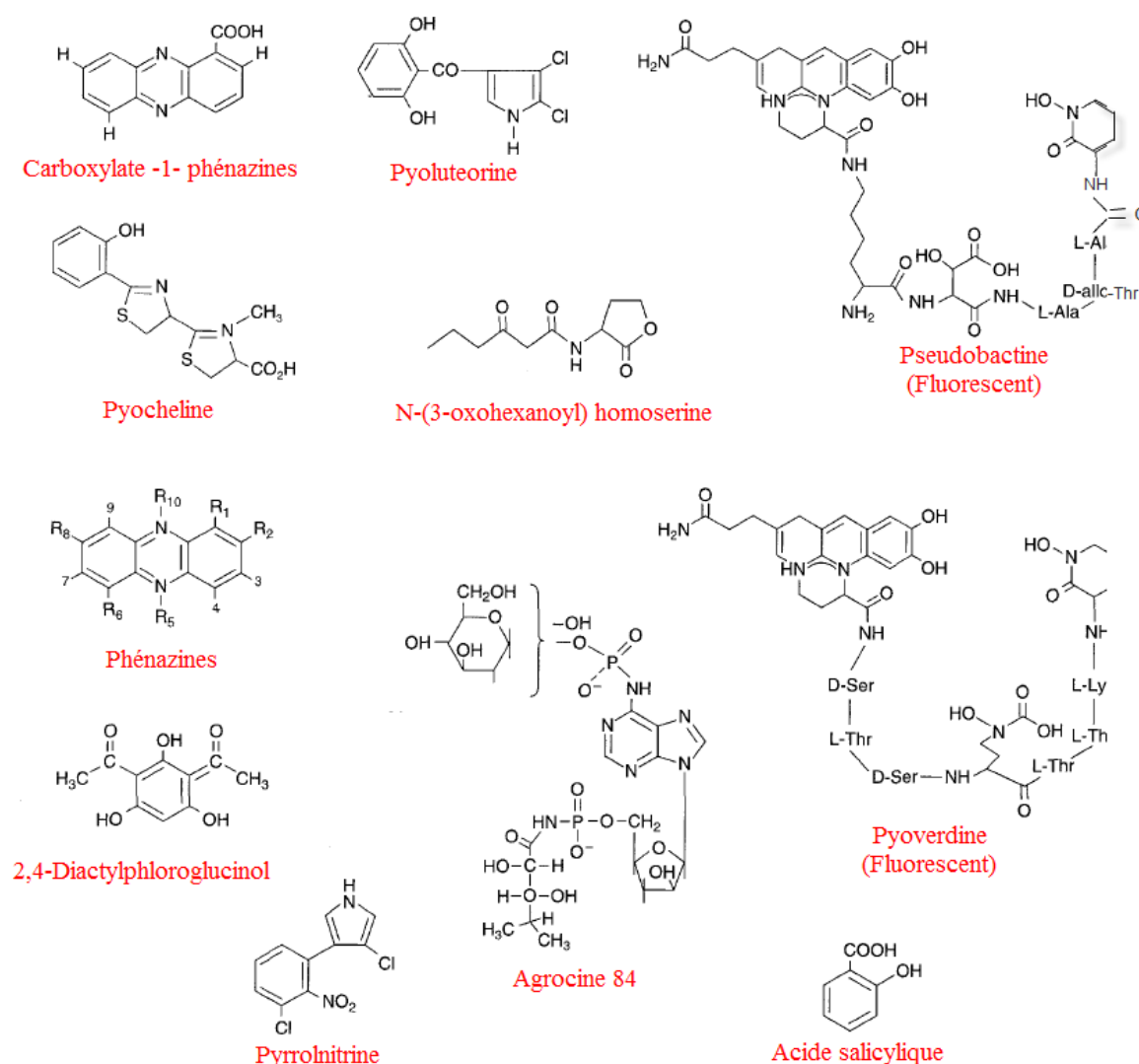
Au cours des 20 dernières années, de nombreuses études ont démontré sans équivoque que plusieurs métabolites, y compris les antibiotiques, les enzymes et des substances volatiles produits par les bactéries antagonistes jouent un rôle clé dans le contrôle biologique des divers agents phytopathogènes (Weller 1988; Whipps, 1997).

Un antibiotique est défini comme une substance d'origine biologique ou synthétique, agissant spécifiquement sur une étape essentielle du métabolisme des bactéries (agent antibactérien) ou des champignons (agent antifongique). L'antibiotique est capable d'inhiber la croissance ou de détruire d'autres micro-organismes (Le Minor et Véron, 1989). Les antibiotiques englobent un groupe de composés organiques hétérogènes, de faible poids moléculaire produit par les microorganismes. A faibles concentrations, les antibiotiques sont délétères pour la croissance ou l'activité métabolique d'autres microorganismes (Fravel, 1988). La production des antibiotiques est un phénomène très répandu dans la nature, un grand nombre de microorganismes sont reconnus comme producteurs d'antibiotiques *in vitro* et peuvent avoir un rôle dans le contrôle d'un certains nombre de maladies (Droby and Chalutz 1994). Dans les dernières décennies, de nombreux antibiotiques ont été isolées à partir de différentes souches agents de lutte biologique représentant différents genres bactériens. Cependant il faut noter que la production des antibiotiques est souvent influencée par les facteurs environnementaux (biotiques ou abiotiques), essentiellement les interactions avec la microflore du sol, la composition en matière organique, le pH ou encore la température (Toumatia, 2015).

### II.1.2.1.1. Les antibiotiques du genre *Pseudomonas*

La production d'antibiotiques par *Pseudomonas* est désormais reconnue comme un facteur important dans le contrôle de plusieurs maladies. Ce genre bactérien produit une myriade de composés présentant des activités antimicrobiennes, notamment; les phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine, la tropolone et le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG). Leur spectre d'action varie grandement d'une molécule à l'autre. Certains sont faiblement spécifiques, telle la tropolone, qui pourrait entraver la croissance d'organismes bénéfiques.

La figure II.3 illustre justement la structure diverse de plusieurs métabolites secondaires produites par *Pseudomonas*.



**Figure II.3.** Structure de quelques métabolites secondaires produits par *Pseudomonas* sp impliqués dans le contrôle biologique des maladies des plantes (Dowling et O'gara, 1994).

### II.1.2.1.2. Les antibiotiques du genre *Bacillus*

Les membres du genre *Bacillus* sont capables de produire des antibiotiques comme métabolites secondaires pendant la fin de la phase logarithmique ou le début de la phase stationnaire de la croissance des cultures en discontinu. Plus de 169 de ces métabolites secondaires ont été mis en évidence chez les *Bacillus*. Il a été par exemple démontré que 68 différents antibiotiques sont produits par différentes souches de *B. subtilis*, pendant que *B. brevis* peut produire jusqu'à 23 antibiotiques (Katz et Demain, 1977). Selon Stein (2005), de 4 à 5% du génome de *B. subtilis* est exclusivement consacré pour la synthèse des antibiotiques et cette espèce a le potentiel de produire une dizaine de molécules d'antibiotiques de structure chimique variable.

Parmi la vaste gamme de molécules biologiquement actives synthétisées par *Bacillus*, certains ont été reconnus pour leur activité inhibitrice contre les agents phyto- pathogènes et cette activité antagoniste ou antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et le plus utilisé par ces espèces pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte.

En fonction de leur structure chimique, les antibiotiques peptidiques représentent la classe prédominante des antibiotiques de *Bacillus*. Ils sont de différentes tailles, peuvent être composés entièrement d'acides aminés mais certains contiennent d'autres résidus. Les antibiotiques cycliques ou Oligopeptides linéaires et des aminoglycosidiques sont aussi produits le plus souvent (Stein, 2005).

Une classe majeure des antibiotiques peptidiques de *Bacillus* sont les antibiotiques lipopeptides cycliques qui peuvent varier en fonction du type et de la séquence des résidus d'acides aminés ainsi que la nature de la cyclisation du peptide et dans la nature et la longueur de la chaîne de l'acide gras (Ongena et Jacques, 2008). Dans diverses espèces de *Bacillus*, les trois familles principales sont les surfactines, les iturines et les fengycines. Chacune des familles renferment des variants structuraux selon l'origine génétique de la souche productrice considérée et par conséquent chaque groupe d'antibiotiques peptidiques affiche une activité antagoniste différentielle vis-à-vis des différents agents phyto-pathogènes (Cawoy et al., 2011).

Un autre groupe d'antibiotiques peptidiques habituellement produits par *Bacillus subtilis* sont les antibiotiques (Stein, 2005). Ces composés présentent de fortes activités antibactériennes contre les bactéries gram-positive mais leur implication dans l'activité de lutte biologique des isolats de *Bacillus* associées aux plantes n'a pas été clairement démontré à ce jour. Des molécules plus simples, tel que le bacillysine (un dipeptide) exhibent également

des effets bactéricides forts et sont apparemment impliqués dans le contrôle de certains agents phyto-pathogènes (Chen *et al.*, 2009).

### II.1.3. Hyperparasitisme

Le parasitisme des agents pathogènes par d'autres microorganismes repose sur la production d'enzymes dégradant les parois cellulaires des agents pathogènes. Le parasite pénètre dans les cellules de sa cible et le détruit *via* la colonisation de ses organes. Le parasitisme des champignons a été largement étudié, notamment avec *Trichoderma*, *Gliocladium* et *Pythium* spp. qui figurent parmi les principaux parasites reconnus. Le champignon *Coniothyrium minutans* parasite l'agent pathogène *Sclerotinia sclerotiorum* en produisant des enzymes qui dégradent les parois cellulaires de l'agent pathogène cible (Elad *et* Stewart, 2004 ; Comby, 2011). L'usage en protection biologique d'hyperparasites a des contraintes comme la nécessité d'un contact direct avec l'agent pathogène et la lenteur possible de la destruction de ce dernier (Fravel, 2005).

Il faut également souligner que les enzymes hydrolytiques et les antibiotiques produits par les agents antagonistes ont souvent une activité synergique, et qu'à l'instar des antibiotiques, la production des enzymes est soumise à l'influence des facteurs biotiques et abiotiques (Toumatia, 2015).

**Tableau II. 1.** les principaux antibiotiques produits par certaines espèces de *Bacillus* et leur spectre d'action (Slepecky et Hemphil, 2006).

Espèces	Antibiotiques
<i>B. subtilis</i>	Subtiline <sup>a</sup>
	Surfactine <sup>b</sup>
	Bacilysine <sup>a</sup>
	Difficidine <sup>c</sup>
	Oxydifficidine <sup>c</sup>
	Bacillomycine F <sup>d</sup>
	Mycobacilline <sup>d</sup>
<i>B. brevis</i>	Gramicidine <sup>a</sup>
	Lincar gramicidine <sup>a</sup>
	Tyrocidine <sup>a</sup>
<i>B. licheniformis</i>	Bacitricine <sup>a</sup>
	Proticine
<i>B. pumilis</i>	Pumiline <sup>a</sup>
	Tétaine
<i>B. mesentericus</i>	Esperine <sup>a</sup>
<i>B. polymexa</i>	Polymixine <sup>e</sup>
	Colistine <sup>e</sup>
<i>B. circulans</i>	Circuline <sup>a</sup>
	Butirosine <sup>a</sup>
<i>B. laterosporus</i>	Laterosporamine <sup>a</sup>
	Laterosporine <sup>a</sup>
<i>B. cereus</i>	Biocerine <sup>e</sup>
	Cerexine <sup>a</sup>

**A : actif contre les bactéries Gram positif**  
**C : large spectre d'action**  
**D : action antifongique**  
**E : actif contre les bactéries Gram négatif**

### II.1.4. Induction de la résistance de la plante hôte

En plus des barrières physiques et chimiques préformées, les plantes possèdent des systèmes de reconnaissance et de réponses de défense induites qui sont déclenchées immédiatement après le premier contact avec des molécules étrangères et sont renforcées par l'interaction prolongée avec les agents pathogènes (Göhre et Robatzek, 2008). Lorsque leurs barrières physiques et biochimiques constitutives ne suffisent plus à limiter le pouvoir infectieux de pathogènes nécrotiques, les végétaux peuvent faire appel à l'activation d'un spectre complexe de mécanismes de défense cellulaires. Les deux formes les mieux définies de résistance induite sont la résistance systémique acquise (SAR) et la résistance systémique induite (ISR) (Figure IV.10). Ces deux types de résistance peuvent être différenciés par la nature de l'agent inducteur et les voies régulatrices impliquées (Pieterse *et al.*, 1996; Knoester *et al.*, 1999; Schenk *et al.*, 2000).

Certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes. (Ryals *et al.*, 1996). Les rhizobactéries de la famille des *Pseudomonaceae* sont capables de synthétiser de nombreuses molécules de différentes natures impliquées dans l'induction ou la potentialisation des réactions de défense de la plante, conduisant à leur tour à la mise en place d'une ISR. L'utilisation de mutants bactériens déficients en différents composés a fait preuve de nombreuses démonstrations quant à la signification physiologique des constituants bactériens associées à l'ISR. Parmi les composés bactériens stimulateurs des réactions de défense et / ou inducteurs de l'ISR, on note la production de sidérophores, d'antibiotiques, de lipopolysaccharides, d'exopolysaccharides (EPS), de flagelline (Magnin-Robert, 2007).

### II.2. Mécanismes d'action impliqués dans la promotion de la croissance de l'hôte

Diverses souches de PGPR des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Rhodobacter*, *Azospirillum* ont été récemment décrites pour leur effet direct positif sur la croissance des plantes et l'augmentation du rendement de la culture (légumes, pomme, citron, myrtille, mûre, abricot, framboise, betterave à sucre...) (Welbaum et al., 2004). Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par divers mécanismes tels que : la fixation d'azote (N<sub>2</sub>), la solubilisation d'oligo-éléments tel que le phosphate (P), l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante, la synthèse des phytohormones ou de vitamines ou par la diminution de la toxicité des métaux lourds (Burd et al., 1998; Whipps 2001).

#### II.2.1. Solubilisation du phosphate inorganique

Le phosphore est l'un des principaux éléments nutritifs dans le sol. Il est souvent désigné comme l'«énergisant», car il permet le stockage et le transfert d'énergie lors de la photosynthèse. Il fait également partie du matériel génétique de toutes les cellules - ADN et l'ARN. Toutes les plantes ont besoin de phosphore pendant les périodes de croissance rapide. Sans phosphore, la croissance des plantes est retardée. Les symptômes de carence en phosphore comprennent des racines rabougries, un pigment rouge dans les bases des feuilles, des feuilles ternes vert-grisâtre (Abat, 2006).

Dans le sol, le phosphate se présente sous deux entités différentes : Le phosphate totale qui désigne la quantité globale du phosphate présente dans le sol et le phosphate assimilable (soluble) représenté par la fraction du phosphate totale susceptible d'être absorbée par les racines des plantes (Pierzynski et al., 2000). Cette dernière représente le plus souvent de 1 à 5% du phosphate total.

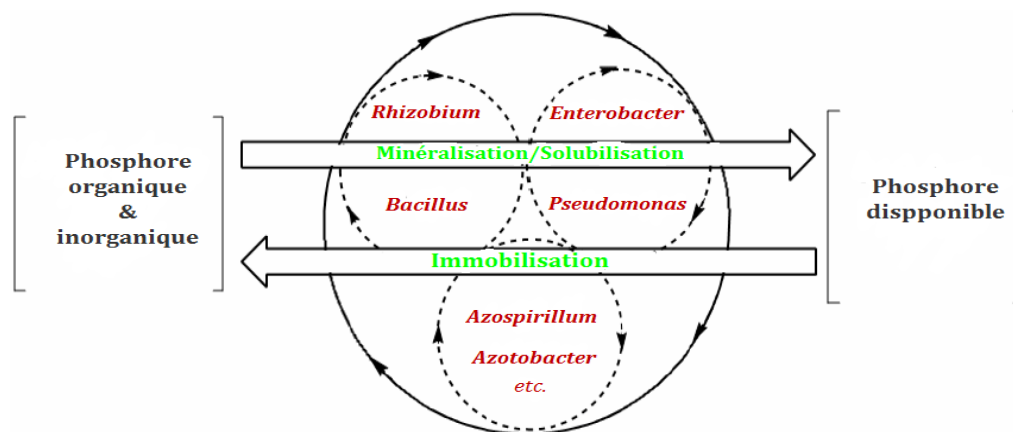
De nos jours, de grande quantité de phosphore sont présentes dans le sol suite à une fertilisation intense par les engrais chimiques pendant de longues périodes. D'autre part une grande part de cet élément se présente sous forme minérale, non assimilable par les plantes (Martínez-Viveros et al., 2010). La disponibilité du phosphore pour une culture est définie comme la quantité totale de P dans le sol susceptible d'aboutir dans la solution du sol sous forme d'ions orthophosphates pendant une période équivalente à la durée de croissance de la culture (Frossard et al, 2004). Dans les sols agricoles la conversion du phosphate minéral insoluble en phosphate soluble (assimilable) est réalisée le plus souvent par les plantes ou à travers l'activité des microorganismes présents dans la rhizosphère des plantes (Arcand et Schneider, 2006).

La preuve de l'origine naturelle des micro-organismes rhizosphériques solubilisant le phosphore (PSM) remonte à 1903 (Khan et al., 2007). Parmi l'ensemble de la population

microbienne du sol, les bactéries solubilisant les phosphates (BSP) constituent 1 à 50% de la flore totale, en plus, ces bactéries sont plus efficaces dans la solubilisation de phosphore que les champignons (Alam *et al.*, 2002). Les souches des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* et *Enterobacter* ainsi que *Penicillium* et *Aspergillus* sont des agents puissants dans la solubilisation de phosphates (Whitelaw, 2000). L'importance et la nature de la population des BSP dépend d'une part des propriétés du sol (propriétés physiques et chimiques, le contenu en matières organiques et P) et d'autre part, des activités agricoles (Kim *et al.*, 2007).

La solubilisation du phosphate se fait à travers différents processus et mécanismes microbiens, y compris la production d'acide organique et d'extrusion de protons liée à l'assimilation du  $\text{NH}_4^+$  (Nahas, 1996; Sagoe *et al.*, 1998). Le P inorganique est solubilisé par l'action des acides organiques et inorganiques sécrétés par les BSP dans lequel les groupes hydroxyles et carboxyles des différents acides chélatent les cations (Al, Fe, Ca) liés au phosphates, ce dernier étant converti en formes solubles et les mêmes acides peuvent aussi provoquer une diminution dans le pH du sol (Stevenson, 2005). La sécrétion par les BSP de phosphatases (Acide ou alcaline) et de phytases peut jouer aussi un rôle dans la solubilisation du phosphate (Aseri *et al.*, 2009, Martínez-Viveros *et al.*, 2010).

La libération des exsudats racinaires tels que des ligands organiques peuvent également modifier la concentration de P dans la solution du sol (Hinsinger, 2001). Le schéma général de solubilisation P dans le sol est illustré par la figure II.4.



**Figure II.4.** Schéma général des voies de mobilisation et immobilisation du phosphore dans le sol par les bactéries (Khan *et al.*, 2009)

### II.2.2. Production des phytohormones

Les phytohormones (auxines) sont des molécules de signal agissent comme des messagers chimiques et jouent un rôle fondamental en tant que régulateurs de la croissance et de développement des plantes. Les phytohormones sont des composés organiques qui en très faibles concentrations influencent les processus biochimiques, physiologiques et morphologiques au sein de la plante, et leur synthèse est étroitement régulés (Fuentes-Ramírez et Caballero-Mellado, 2006). De nombreuses espèces fongiques et bactériennes peuvent produire des phytohormones (Tsavkelova et al., 2006).

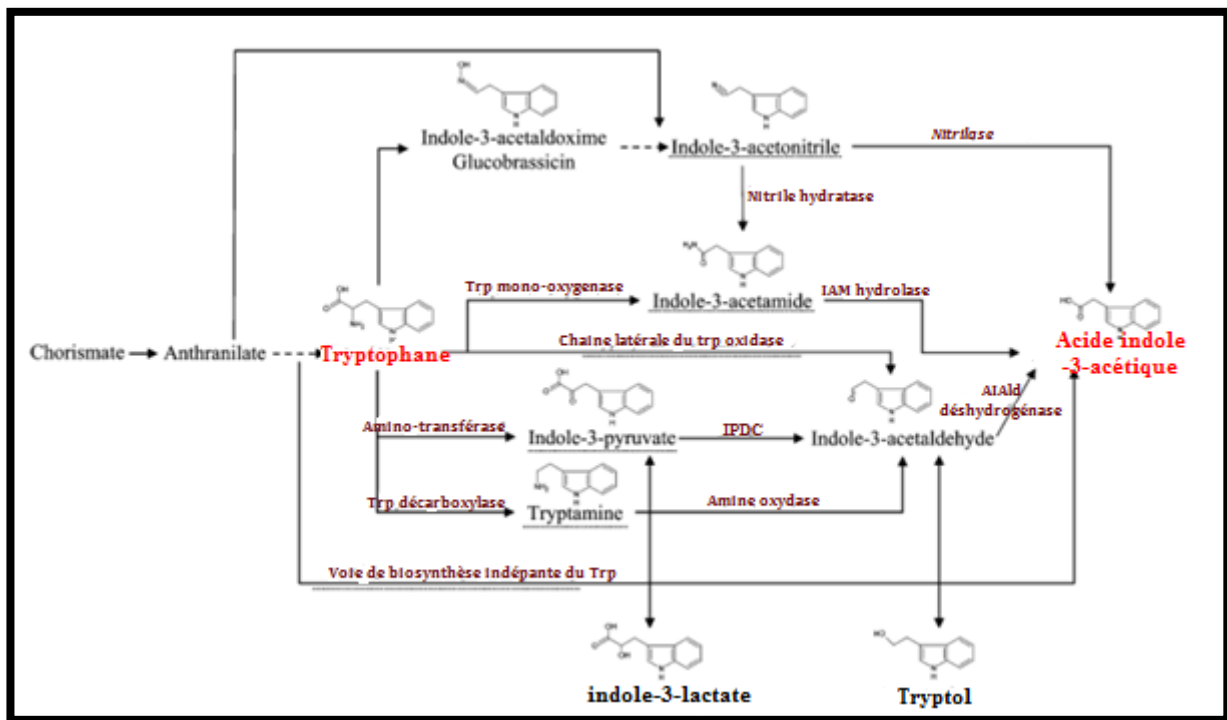
La capacité de production de phytohormones (auxines) est largement distribuée parmi les plantes et bactéries associées aux plantes. Leur production par les bactéries est considérée parmi les mécanismes les plus efficaces par lesquels les rhizobactéries exercent leur effet de promotion de la croissance des plantes (Martínez-Viveros et al., 2010). Des études ont démontré que la PGPR peut stimuler la croissance des plantes par la production d'auxines (acide indole-acétique) (Spaepen et al., 2007), les gibbérellines (Bottini et al., 2004) et les cytokinines (Timmusk et al., 1999), ou en régulant les niveaux élevés de l'éthylène endogène dans la plante (Glick et al., 1998).

#### II.2.2.1. Production de l'acide indole acétique (AIA):

L'AIA est l'auxine principale chez les plantes, il contrôle de nombreux processus physiologiques chez les plantes, y compris l'élargissement et la division cellulaire, la différenciation des tissus et les réponses à la lumière (Teale et al., 2006).

La capacité à synthétiser IAA a été détectée aussi chez de nombreuses rhizobactéries ainsi que dans des espèces bactériennes pathogènes, libres et symbiotiques (Tsavkelova et al., 2006). Il a été rapporté que jusqu'à 8% des microorganismes de la rhizosphère des plantes sont capables de produire les auxines comme métabolites secondaires (Kampert et al. 1975; Loper and Schroth, 1986). Parmi Les rhizobactéries productrices de L'AIA, les espèces du genre *Azospirillum* sont les plus étudiées (Dobbelaere et al., 1999). D'autres bactéries appartenant aussi bien aux genres *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, et *Rhizobium* qu'aux espèces *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Acetobacter diazotrophicus* et *Bradyrhizobium japonicum* sont reconnues aussi pour être des producteurs potentiels de l'AIA (Patten and Glick, 1996). Ces rhizobactéries produisent l'AIA selon plusieurs voies de biosynthèse, on distingue principalement des voies dépendant du tryptophane (voie indole-3-acetonitrile, acide indole-3-pyruvique et la voie tryptamine) et des voies indépendant du tryptophane mais avec la production des concentrations de AIA plus faibles (Fig. IV.5) (Patten et Glick, 2002).

L'inoculation avec des rhizobactéries productrices de l'AIA a été utilisé pour stimuler la germination des graines, afin d'accélérer la croissance des racines et de modifier l'architecture du système racinaire, et d'augmenter la biomasse racinaire. Patten et Glick (2002), ont rapporté le rôle de l'AIA produit par *P. putida*, chez la plante hôte, dans le développement de son système racinaire.



**Figure II.5.** Aperçu des différentes voies de biosynthèse de l'AIA par les bactéries (Les noms de voies sont indiquées par des mots soulignés) (Spaepen et al., 2007).

IAAld: indole-3-acétylaldéhyde; IAM: indole-3-acétamide;

IPDC: indole-3-pyruvate décarboxylase; Trp:tryptophane .

*Chapitre III :*  
*Plante hôte*

### III.1. Historique et Origine de la tomate

La tomate et les espèces qui lui sont apparentées sont originaires de la région des Andes qui inclue la Colombie, l'Equateur, le Pérou, la Bolivie et le Chili (Warnock 1988). La tomate cultivée est issue de la domestication de la forme semi sauvage *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, cette dernière étant un mélange de *S. lycopersicum* et de l'espèce sauvage *S. pimpinellifolium* (Peralta et al. 2008; Ranc et al. 2008). Elle fût introduite en Europe au début du XVI<sup>ème</sup> siècle par les espagnoles, d'abord en Espagne, puis en Italie. La plante de tomate était considérée au début comme une plante ornementale et ses fruits n'étaient considérés comme comestibles. Ce n'est que plus tard durant les premières décennies du siècle précédent qu'elle a été adoptée comme fruit puis elle est devenue le légume vedette du XX<sup>ème</sup> siècle (Blancard, 2009).

En Algérie, elle a été introduite par les cultivateurs espagnols en raison des conditions pédoclimatiques favorable à sa culture en Algérie. Sa consommation a débuté dans le région oranais dès les années 1950 et par la suite elle s'est répandue vers l'est surtout dans le littoral algérois (Latigui, 1984).

### III.2. Etymologie

Parmi les noms communs utilisés pour désigner la tomate, il y a les noms suivant : tomate (Espagnol, Français), tmati (Afrique de l'ouest), tomatil (Nahiatl, langue indigène du Mexique), jitomate (espagnol mexicain), pomodoro (Italien) (Kambale, 2005). Le mot « tomate » dérive du suffixe « tomatl » ou des mots « tomates » ou « miltomates » dans le langage nahuatl (langue de la famille uto-aztèque, les anciens mexicains (Aztèques) à l'époque de la découverte de l'Amérique) (Daunay et al. 2008), « Tomatl » désignait alors la tomate, le Physalis ainsi que d'autres Solanacées. Introduite en Europe au milieu du XVI<sup>ème</sup> siècle, elle porta différents noms comme « mala aurea » en latin, « pomodoro » en italien, « pomme d'amour » en français, « love apple » en anglais et « liebesapfel » en allemand. Longtemps appelée « pomme d'amour » ou « pomme d'or », son nom de tomate n'est entré dans le dictionnaire de l'académie française qu'en 1835. Le nom *lycopersicum* signifie littéralement « pêche de loup », et fait référence au caractère toxique attribué initialement à ce fruit.

### III.3. Classification botanique

La tomate appartient à la famille des solanacées. Cette famille comprend une centaine de genres et de l'ordre de 3000 espèces (Knapp, 2002), dont une moitié appartient au genre *Solanum* (Weese et Bohs, 2007). La famille des *Solanaceae* abritent les principales cultures originaires du Vieux continent (aubergines en provenance d'Asie) et la nouveau monde

(poivre, pomme de terre, le tabac, la tomate d'Amérique du Sud). Le clade *Lycopersicon* contient la tomate domestique (*Solanum lycopersicum*) et ses 12 plus proches parents sauvages (Peralta et Spooner 2005). On distingue parmi cette famille des plantes alimentaires économiquement importantes telles que la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), l'aubergine (*S. melongena* L.), la pomme de terre (*S. tuberosum* L.). Elle comprend aussi le tabac (*Nicotiana tabacum* L.), ainsi que de nombreuses espèces utilisées à des fins pharmaceutiques ou ornementales (Daunay et Lester, 1989). Les espèces appartenant à la famille des *Solanaceae* sont extrêmement diverses (Knapp, 2002), à la fois en termes (1) de vigueur et biologie (des herbes annuelles aux arbres pérennes); (2) d'habitat (du déserts aux forêts tropicales humides); et (3) de morphologie, notamment des fleurs et des fruits (Knapp, 2002). Le centre d'origine et de diversité de la majorité des *Solanaceae* est concentré en Amérique du Sud et Amérique centrale (D'Arcy, 1991).

De point de vue taxonomique, la systématique de la tomate peut être résumée comme suit selon Gaussen et al. (1982).

Régne : Plantea

Sous règne : Trachenobionta

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous classe : *Asteridae*

Ordre : *Solanales*

Famille : *Solanaceae*

Genre : *Solanum*

Espèce : *lycopersicum*

#### III.4. Description botanique

La tomate est une plante herbacée vivace cultivée annuellement, à port rampant, aux tiges ramifiées. Elle est appelée généralement *Lycopersicon esculentum*, appartenant à la famille des solanacées réputées monophylitiques sur la base de la morphologie et des caractères de l'ADN chloroplastiques (Judd et al., 2002). Elle descendrait de la variété *Lycopersicon esculentum* biovar *cerasforme*. Elle se divise en deux sous genres : les *Eulicopersicon* qui produisent des baies rouges comestibles et les *Eriopersicon* qui produisent des baies vertes non comestibles, toxiques due à la présence d'alcaloïdes à effet analgésiques voire anesthésiques (Hamini, 2011).

### III.4.1. L'appareil végétatif

**La racine** : forte et pivotante qui pousse jusqu'à une profondeur de 50cm. La racine principale produit une haute densité de racines latérales et adventices. En sol profond, on peut trouver des racines jusqu'à 1 mètre de profondeur (Chaux et Foury, 1994).

**La tige** : la tige est de forme anguleuse, épaisse aux entre nœud pubescent, de consistance herbacée en début de croissance, se lignifie en vieillissant. Les bourgeons auxiliaires donnent naissance à des ramifications successives alors que les bourgeons terminaux donnent naissance à des fleurs. Les rameaux issus des bourgeons auxiliaires produisent des feuilles à chaque nœud et se terminent par une inflorescence (Chaux et Foury, 1994).

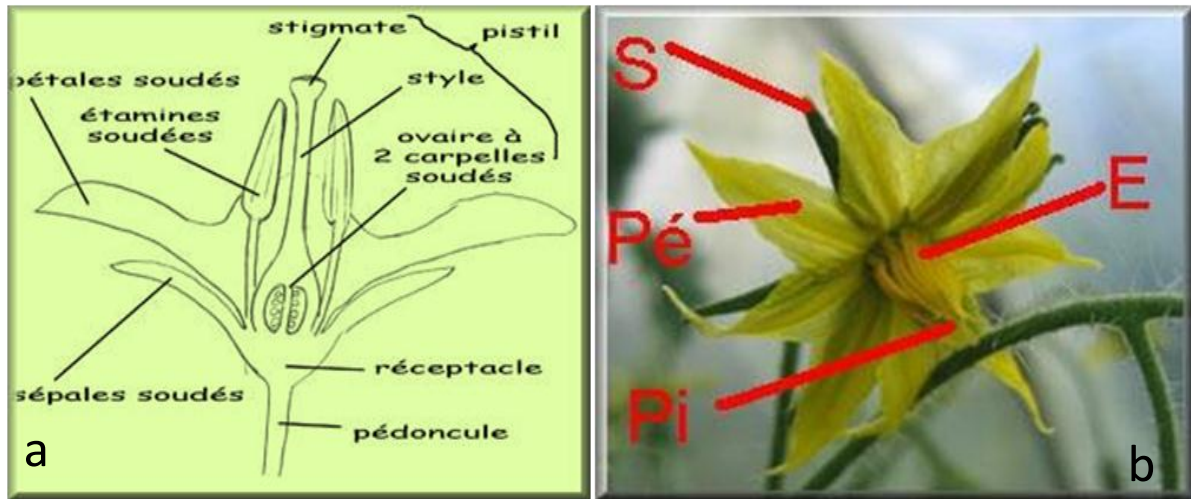
**Le feuillage** : La tomate fait partie de la famille des endicotylédons puisqu'elle présente deux cotylédons suite à la germination des graines. L'ensemble des feuilles est disposé en spiral, 15 à 50 cm de long et 10 à 30 cm de large. Les folioles sont ovées à oblongues, couvertes de poils glandulaires. L'inflorescence est une cyme formée de 6 à 12 fleurs. Le pétiole mesure entre 3 et 6 cm (Chaux et Foury, 1994 ; Naika et al., 2005).

### III.4.2. L'appareil reproducteur de la tomate

**Les Fleurs**: les fleurs sont les organes sexuels de la plante, bisexuées, régulières et mesurent entre 1.5 et 2 cm de diamètre. Elles poussent opposées aux/ou entre les feuilles. Le tube du calice est court et velu, les sépales sont persistants. En général, il y a 6 pétales qui peuvent atteindre une longueur de 1cm, qui sont jaunes et courbées lorsqu'elles sont mures. Il y a 6 étamines et les anthères ont une couleur jaune vif et entourent le style qui a une extrémité stérile allongée (Fig. III.1). En général, la plante est autogame, mais la fécondation croisée peut avoir lieu (Chaux et Foury, 1994 ; Naika et al., 2005).

**Les Fruits** : le fruit de la tomate est une baie charnue, de forme globulaire ou aplatie avec diamètre de 2 à 15 cm. La couleur des fruits murs varie du jaune au rouge en passant par l'orange, selon la variété. En général, les fruits sont ronds et réguliers ou côtelés (Fig. III.8) (Chaux et Foury, 1994 ; Naika et al., 2005).

**Les Graines** : nombreuses, en forme de rein ou de poire, elles sont poilues, beiges, 3 à 5 mm de long, de 2 à 4 mm de large. L'embryon est enroulé dans l'albumen, 1000 graines pèsent approximativement 2.5 à 3.5g, chaque fruit contient un nombre important de graines qui varie entre 80 et 500 graines par fruit (Fig. III.2) (Chaux et Foury, 1994 ; Naika et al., 2005).



**Figure III.1.** Coupe d'une fleur de tomate ([tomodori.com/6artetscience/fleur\\_tomates.htm](http://tomodori.com/6artetscience/fleur_tomates.htm))

(S : sépales ; Pé: pétales ; Pi : pistil ; E : étamine)



**Figure III.2.** Coupe transversale d'un fruit de tomate

([tomodori.com/6artetscience/fleur\\_tomates.htm](http://tomodori.com/6artetscience/fleur_tomates.htm))

### III.5. Culture et importance alimentaire de la tomate

La tomate neutrophile est une plante des climats tempérés et chauds. Sa température idéale de croissance se situe entre 15°C la nuit et 25°C le jour. Elle craint le gel et ne supporte pas les températures inférieures à 2°C. C'est une plante héliophile, elle demande une hygrométrie moyenne, parfois un apport de CO<sub>2</sub> (sous serre verre) est nécessaire. (Polèse, 2007).

Sa période de végétation est assez longue, il faut compter entre cinq et six mois entre le semis et la première récolte. La multiplication se fait par semis, opération qu'il faut faire assez tôt, vers Février-Mars, et donc sous abri en climat tempéré (en serre ou sous châssis vitré). C'est une culture très exigeante qui demande un sol profond et bien fumé et la possibilité d'irrigation (Polèse, 2007).

### III.6. Importance alimentaire et économique de la tomate

Depuis que la tomate a été classée parmi les plantes alimentaires majeures (début 20<sup>ème</sup> siècle), elle est devenue un des légumes les plus populaires et une des plantes fruitières les plus consommées. La place de la tomate dans l'alimentation humaine n'est plus à démontrer. Elle est, par son volume de production, le troisième « légume » au plan mondial, derrière la pomme de terre et la patate douce. Sa composition chimique moyenne indique qu'elle contient suffisamment d'éléments divers indispensables à l'organisme (Tableau III.2) (Kambale, 2005).

#### III.6.1 Valeur nutritionnelle de la tomate

La Tomate est classée aux États-Unis au sommet de tous les fruits et légumes comme source des vitamines et des éléments minéraux (Stevens, 1974). Elle joue un rôle important dans l'alimentation humaine. C'est une excellente source de phosphore, de fer et de la vitamine A, B et C (Tableau III.1) (Cobley et Steele, 1976 ; Varela et al., 2003; Naika et al., 2005).

D'autre part le lycopène, parmi les composants principaux de la tomate et qui apparaît naturellement aussi dans les fruits et légumes, est considéré comme un antioxydant puissant. En tant que tel, ce produit peut réduire le risque de certaines maladies telles que le cancer et les maladies du cœur (Pritts, 2002). Des études ont aussi montré que le lycopène peut réduire le développement du cancer de la prostate, du tractus digestif, du sein, du poumon et col utérin. Il faut aussi rappeler que la tomate fraîche est un antifatigue efficace parce qu'elle accélère la formation de sucre dans le sang et de ce fait nous redonne un grain d'énergie (Pritts, 2002).

**Tableau III.1.** Composition chimique du fruit cru de tomate (moyenne pour 100g de fruit) (Kambale, 2005).

Principaux composés (%)		Vitamines (mg /100g de fruit)		Sels minéraux (mg/100g de fruit)	
Eau	93	Vitamine A1	798	Sodium	6
Hydrate de carbone	5	Vitamine B2	0.05	Potassium	295
Protéines	1	Vitamine B2	0.04	Calcium	13
Lipides	0.2	Vitamine B3	6	Magnesium	20
D'autres substances (mg/100g de fruit)		Vitamine B5	0.3	Fer	0.5
Acide Citrique	440	Vitamine B6	0.1	Cuivre	0.09
Acide Malique	35	Vitamine B9	0.04	Phosphate	25
		Vitamine E	0.8	Manganese	0.1
		Vitamine C	34	Zinc	0.2
		Vitamine K	0.008	Chore	6

### III.6.2. Importance économique de la tomate dans le monde

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) compte parmi les cultures légumières les plus importantes du monde (Naika et al., 2005). Selon le Fond des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), elle occupe la première place dans la production maraîchère après la pomme de terre et elle est cultivée dans plus de 170 pays. En 2009, la production mondiale de tomates s'élevait à plus de 141 millions de tonnes métriques (Mt). Cette production continue d'augmenter tous les ans de plusieurs millions de tonnes, sans tenir compte des stocks issus des cultures vivrières (Viron, 2010).

Selon le tableau III.2, les deux premiers pays producteurs mondiaux sont la Chine avec 25,34 % suivie des Etats-Unis avec 08,84 % avec plus de 10 millions de tonnes de tomates produites chaque année, la Turquie occupe le troisième rang mondial. De nombreux pays tels que l'Egypte, L'Inde, l'Iran, le Brésil, le Maroc et la Grèce produisent également

chaque année plus d'un million de tonnes de tomates. Enfin, des pays comme la France et les Pays-Bas ont une production plus modeste de quelques centaines de milliers de tonnes (Desmas, 2005).

### III.6.3. Importance économique de la tomate en Algérie

La tomate occupe une place privilégiée dans le secteur maraîcher en Algérie. Elle est considérée à juste titre comme une espèce prioritaire comme la pomme de terre, l'ail et l'oignon. La tomate est cultivée en Algérie selon deux modes de production à savoir en culture maraîchère et en culture industrielle. La superficie totale réservée est de 32962 ha représentée par 63,06% pour la tomate maraîchère et 36,93% pour la tomate industrielle. La tomate représente 7,94% de la superficie totale réservée aux cultures maraîchères et industrielles (Fig. III.3) (FAOSTAT, 2011). Pour ce qui est de la production de tomate maraîchère, sa production représente 08,79% par rapport à la production totale des cultures maraîchères et 08,33% par rapport à la production totale des cultures maraîchères et industrielles. Par contre, pour la tomate industrielle, le taux de représentativité est de 95,57% par rapport aux cultures industrielles pratiquées en Algérie et 4,97% par rapport à la production des cultures maraîchères et industrielles (Fig. III.4) (FAOSTAT, 2011).

**Tableau III.2.** Production mondiale de la tomate en 2007 (Senouci, 2010).

Pays	Production (10 <sup>3</sup> tonnes)	(%)	Pays	production (10 <sup>3</sup> tonnes)	(%)
<b>Monde</b>	<b>124 875</b>	<b>100%</b>	<b>Ouzbékistan</b>	1 317	01,05%
<b>Chine</b>	31 644	25,34%	<b>Maroc</b>	1 206	00,96%
<b>USA</b>	11 043	08,84%	<b>Portugal</b>	1 085	00,86%
<b>Turquie</b>	10050	08,04%	<b>Nigeria</b>	1 057	00,84%
<b>Inde</b>	8 586	06,87%	<b>Algérie</b>	1 023	00,81%
<b>Egypte</b>	7 600	06,08%	<b>Syrie</b>	946	00,75%
<b>Italie</b>	7 187	05,75%	<b>Canada</b>	839	00,67%
<b>Iran</b>	4 781	03,82%	<b>Cuba</b>	803	00,64%
<b>Espagne</b>	4 651	03,72%	<b>France</b>	790	00,63%
<b>Brésil</b>	3 453	02,76%	<b>Japon</b>	758	00,60%
<b>Mexique</b>	2 800	02,24%	<b>Argentine</b>	660	00,52%
<b>Fédération Russe</b>	2 296	01,83%	<b>Hollande</b>	660	00,52%
<b>Grèce</b>	1 712	01,37%	<b>Roumanie</b>	627	00,50%
<b>Ukraine</b>	1 472	01,17%	<b>Autres</b>	14869	12,06%
<b>Tunisie</b>	960	00,76%			

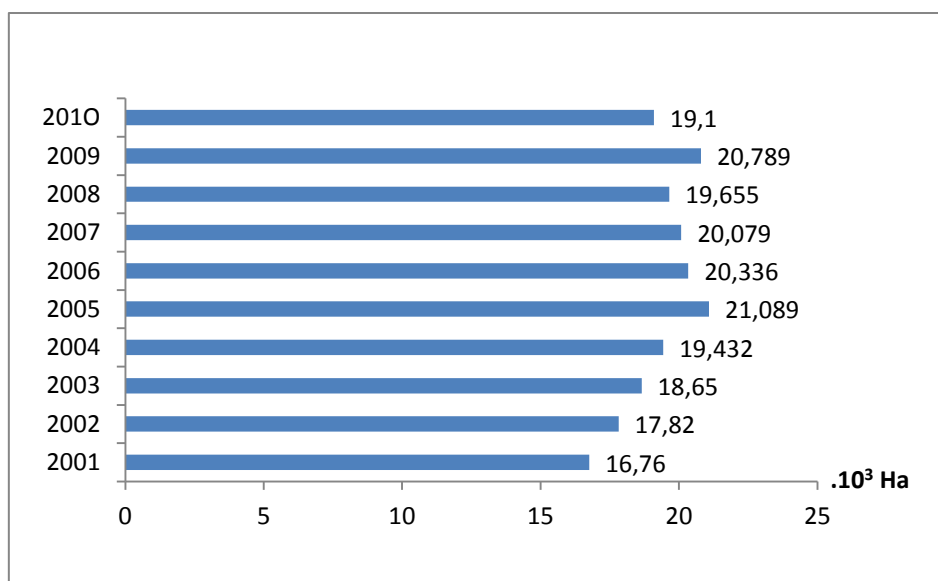


Figure III.3. Evolution de la superficie de culture de la tomate en Algérie de 2001 à 2010 (FAOSTAT, 2011)

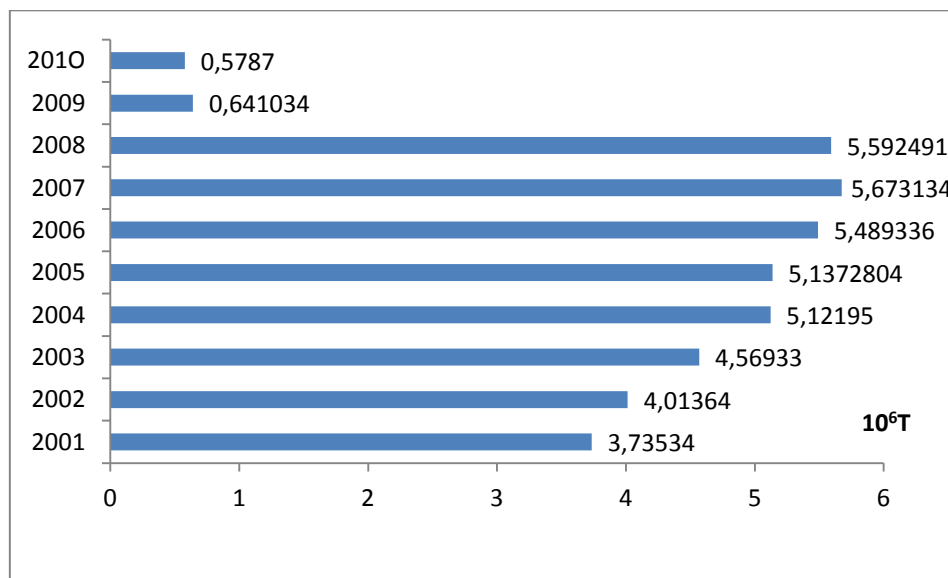


Figure III.4. Evolution de la production de la tomate en Algérie de 2001 à 2010 (FAOSTAT, 2011).

### III.7. Les maladies de la tomate

Les maladies et les ravageurs constituent une menace grandissante pour la culture de la tomate de la levée jusqu'à la récolte et peuvent provoquer des pertes catastrophiques (Jones *al.*, 2001). Elles affectent toutes les parties de la plante et sont causées par des champignons, des bactéries et des virus.

#### III.7.1. Maladies d'origine bactérienne (les bactérioses)

Les bactéries sont la cause de plusieurs types de maladies, les plus importantes étant:

**Moucheture bactérienne:** la moucheture bactérienne est causée par le *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. La maladie se remarque surtout sur les fruits, où elle engendre de nombreuses taches brun foncé, d'un diamètre de 1 à 2 mm (Fig.III.5A). Ces taches pénètrent à peine plus profondément que la peau. Parfois les lésions sont plus étendues et plus irrégulières, ressemblant beaucoup à la tache bactérienne. Sur les feuilles, la moucheture bactérienne donne naissance à des taches qui vont du brun foncé au noir et sont un peu plus grandes que celles qui touchent les fruits (Fig. III.5B) (Jarvis and McKeen, 1991).

**Chancre bactérien :** Le chancre bactérien est une maladie contagieuse et dévastatrice de la tomate. Elle est causée par la bactérie *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* (Smith) Davis et *al.* (syn. *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen). Le premier symptôme visible est habituellement le flétrissement des folioles inférieures qui s'enroulent vers le haut (Richard et Boivin, 1994) (Fig. III.5D). Fréquemment, seules les folioles d'un côté de la feuille sont affectées. Les tissus affectés meurent progressivement de la marge vers l'intérieur et brunissent. Les graines peuvent être aussi infectées (Gilli et Heller, 2007). De petits chancres ocellés (Fig. III. 5C) peuvent aussi se développer sur les fruits si on utilise l'irrigation par aspersion. Au départ, ces chancres apparaissent sous forme de taches d'un blanc neige qui pénètrent à peine en dessous de l'épiderme (Richard et Boivin, 1994).



**Figure III.5.** Symptômes de maladies d'origine bactérienne affectant la tomate

(A : moucheture bactérienne : lésions sur des fruits de tomate, B : la moucheture bactérienne : Lésions sur les feuilles de tomate, C : chancre bactérien : lésions sur une tomate, D : chancre bactérien : lésions des feuilles de tomate) (<http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/facts/05-070.htm>).

### III.7.2. Maladies d'origine virale

Deux maladies importantes de la tomate sont provoquées par des virus : La mosaïque et la déformation des feuilles. La maladie de la mosaïque est facilement transmissible par contact et responsable de taches nécrotiques sur les feuilles et les fruits. Cette maladie a été découverte au Pérou en 1974 sur le pépino (*Solanum muricatum*), un fruit comestible communément appelé « melon-poire ». En 1999, la maladie a été découverte pour la première fois à l'extérieur de l'Amérique du Sud, dans des cultures de tomates de serre aux Pays-Bas. Par la suite, on a signalé sa présence dans des cultures de tomates de serre dans plusieurs autres pays d'Europe ainsi qu'en Amérique du Nord (Fergusson, 2001). Les symptômes sont similaires à ceux du mildiou sur les feuilles mais ce virus provoque un jaunissement rapide du feuillage de la plante. Actuellement, l'Algérie ne dispose pas de substances chimiques permettant de traiter les maladies d'origine virale. Seule la sélection sanitaire, suivie de méthode prophylactique ainsi que l'utilisation des variétés résistantes sont utilisées (Senouci, 2010).

**Tableau III.3.** Différentes maladies virales de la plante de tomate

Maladie	Symptômes
TMV (tomato mosaic virus)	Virus de la mosaïque. Les plantes atteintes affichent un arrêt de croissance au point végétatif, les feuilles peuvent comporter des taches sombres (supérieurs) ou jaunes (inférieurs).
TSWV (tomato spotted wilt virus)	Virus de la maladie bronzée de tomate. Les pieds contaminés sont rabougris avec des feuilles jaunes, les fruits montrent des cercles de couleur rouge caractéristique de la maladie
PVMV (pepper veinal mottle virus)	Provoque des mosaïques surtout sur la tomate, les souches virulentes peuvent provoquer des nécroses des feuilles et des tiges.
TYLCV (tomato yellow leaf curl virus)	Le virus de l'enroulement chlorotique des feuilles fait jaunir les feuilles qui s'enroulent vers le haut ou vers le bas.

### III.7.3. Maladies cryptogamiques

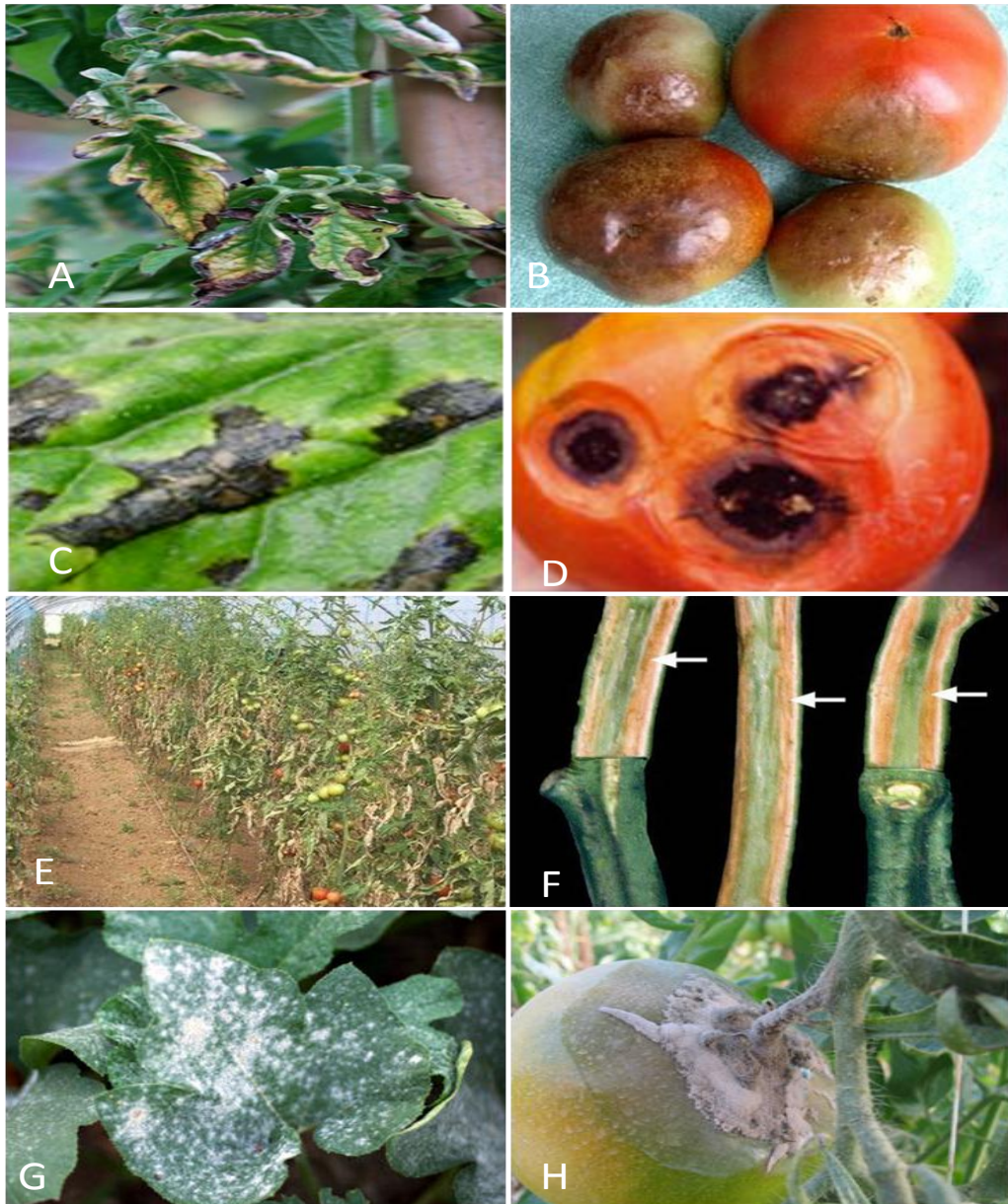
Les maladies fongiques sont très répandues et destructives (Jones *et al.*, 2001), parmi ces maladies. Une infection fongique est fréquemment causée par des spores qui ont pénétré les tissus de la plante à travers les blessures, les stomates et parfois directement à travers la peau de la plantes.

**Mildiou** : plus répandu chez les pommes de terre, le mildiou, causée par *Phytophthora infestans*, attaque aussi les tomates si les conditions du milieu sont propices. Sur la tomate, la maladie cause de graves pertes de feuilles et une pourriture très dommageables aux fruits. Sur les feuilles, des taches d'aspect huileux débutent à l'extrémité ou à la marge des folioles (fig. II.6a). Elles se développent rapidement, se nécrosent et seule leur marge garde un aspect humide. A la face inférieure, un feutrage blanchâtre se développe en atmosphère humide. Sur certaines tiges et quelques pétioles, de grandes taches brunes apparaissent mais ce symptôme étant commun à d'autres maladies, il ne peut à lui seul permettre la détermination de l'origine de la maladie (Legemle, 2008). Les symptômes sur fruits, marbrures brunes souvent bosselées, sont caractéristiques (fig. III.13b). Si l'attaque est plus tardive, les plages marbrées sont plus homogènes. Ces taches sont parfois recouvertes de mycélium. La tomate infectée par le mildiou reste ferme mais des organismes secondaires (bactéries ou champignons) peuvent causer une pourriture molle (Legemle, 2008).

**La verticilliose:** *Verticillium dahliae* est un des champignons responsables de la verticilliose (*Verticillium wilt*) sur plusieurs légumes, dont la tomate. Elle affecte aussi bien les cultures de plein champ que sous abri. Comme pour la fusariose, il existe maintenant de nombreuses variétés résistantes. La maladie est reconnue par un flétrissement des feuilles accompagné d'un jaunissement unilatéral suivi de dessèchement des feuilles de la base (fig. III.6E, F) (Blancard, 2013a).

Pour ce qui est de la PPI, il est recommandé d'utiliser des portes greffes certifiés, des variétés résistantes et de multiplier les plantes saines, lutte contre les insectes vecteurs et pratiquer des rotations afin d'éviter la sélection de souches agressives.

**L'anthracnose :** est une maladie causée par le champignon *collectotrichum coccodes*. Les symptômes de la maladie sont caractérisés par des tâches circulaires de 05 à 10 mm sur les fruits rouges. Ces lésions peuvent évoluer en taches brunâtres et des ponctuations noires qui correspondent aux micro-sclérotés. Plusieurs taches sur les fruits peuvent évoluer et entraîner une pourriture (Blancard, 2013b). Les infections peuvent se déclencher n'importe quand, lorsque la température est comprise entre 10°C et 30°C. Les foyers s'étendent rapidement durant les périodes prolongées d'humectation des feuilles. Bien que les symptômes ne se manifestent que sur les fruits mûrs, l'infection peut débuter sur les fruits verts.



**Figure III.6.** Symptômes de certaines maladies cryptogamiques de la tomate.

- A : Symptômes de mildiou sur des feuilles de tomate B : fruits de tomate atteints de mildiou  
C: Taches noire d'alternariose sur les feuilles de tomate D:taches noires d'alternariose sur des fruits  
E : Symptômes de Verticilliose sur des plantes de tomate F : brunissement des vaisseaux de la tige  
G: Aspect caractéristique du l'oïdium H : fruits de tomate atteints de pourriture grise

**L'alternariose:** L'alternariose, ou maladies des taches brunes, causée par *Alternaria solani*, l'infection provient des fanes des vieilles cultures. Nommée à tort, par certains: tavelure, black-rot, etc., est caractérisée par des taches brun sombre, à surface finement rodée, puis à aspect velouté, surtout, sur la région pédonculaire des fruits (Fig.III.6C, D). Ces taches sont, généralement, précédées par d'autres petites, brun sombre, sur les feuilles des jeunes plants en pépinières, taches qui, regardées attentivement, montrent une série de cercles concentriques (Clément, 1958).

**L'Oïdium (le mal blanc):** L'oïdium est une maladie causée par *oidium nealycopersici*. Cette maladie est caractérisée dès les premiers stades par un feutrage blanc d'aspect farineux sur feuilles (fig. III.13G) Par la suite ces taches peuvent se transformer en lésions marrons ce qui provoque une perte de feuilles chez la plante infectée. L'humidité et les écarts de température importants entre la nuit et le jour favorisent son apparition; d'où une présence accrue en mai et en septembre.

Pour combattre cette maladie, Il est nécessaire d'utiliser des variétés résistantes ou tolérantes, nettoyage des outils de travail, et supprimer rapidement les parties ou sujets atteints afin que la maladie ne se propage pas trop vite.

**La Pourriture grise :** cette maladie est causée par *Botrytis cinerea*. Selon Chaux et Foury (1994), le *B. cinerea* se trouve surtout sur les plantes étiolés et provoque un feutrage gris sur les feuilles et sur les fruits (fig. III.6H). Les mesures préventives veilleront à minimiser les facteurs de risques (Eviter les semis trop denses. Diminuer l'hygrométrie. Eviter les blessures. En culture, Eviter tout excès d'humidité et de condensation sur les feuilles).

**La fusariose des racines et du collet :** La fusariose des racines et du collet est une maladie importante de la tomate causée par le champignon *Fusarium oxysporwn* f. sp. *radicis-Iycopersici* W.R. Jarvis & Shoemaker. Elle affecte principalement la tomate cultivée en serre. Elle sévit également chez les cultures commerciales en sol, dans des substrats comme la laine de roche ou la sciure de bois et dans les cultures sur film nutritif. En pratique, la maladie est limitée à la tomate, mais on a démontré que de nombreuses plantes sont sensibles à l'infection lorsqu'on les contamine artificiellement avec le parasite (Richard et Boivin, 1994). Les plantes infectées se remarquent souvent par l'amincissement marqué du sommet de leur tige. Le flétrissement des plantes débute par les feuilles du haut: on note aussi l'apparition d'une pourriture brun foncé des tissus du cortex à la hauteur de la ligne de terre et les tissus vasculaires prennent une coloration brun rougeâtre. Par la suite, les feuilles inférieures

deviennent brunes fauves en commençant par la pointe, et finissent par mourir (Blancard, 2013b)

#### III.7.4. Stratégies de lutte

La tomate, cultivée aussi bien en plein air que sous abris serres, occupe une place importante dans l'économie du pays tant par les surfaces cultivées que par le volume des productions. Cette culture est attaquée par de nombreux champignons et bactéries à dissémination aérienne et/ou souterraine. Les méthodes de lutte pour diminuer l'impact de ces bio-agresseurs ont beaucoup évolué ces dernières années.

La stratégie de lutte peut consister à mener des mesures indirectes avant que la maladie soit établit ou des mesures directes qui visent à éloigner et combattre l'agent indésirable.

La plus part des moyens utilisés pour lutter contre les différentes maladies des tomates ne sont pas durables. Des mesures culturales peuvent être très efficaces contre certaines maladies, un bon exemple étant les mesures sanitaires et l'élimination de plants anormaux et indésirables utilisés pour lutter contre les maladies de la tomate. Dans d'autres circonstances, cependant, les mesures chimiques ou physiques ou même biologiques peuvent être mieux adaptées. Le Tableau III.4 présente un résumé des différentes stratégies de lutte recommandées pour lutter contre les maladies affectant la culture de la tomate.

**Tableau III.4.** Synthèse des principales stratégies de lutte contre les maladies de la tomate

Maladies	Agent responsable	Stratégie de lutte
<b>Flétrissure fusarienne</b>	<i>F. oxysporum</i> <i>F.sp. lycopersici</i>	Utilisation des substrats et des plants sains, élimination des plants malades en cours de culture, pratique d'un buttage des plants pour l'obtention de l'émission de nouvelles racines.
<b>L'alternariose</b>	<i>Alternaria solani</i>	utilisation des variétés tolérantes, adopter des rotations culturales avec des plantes non hôtes, utiliser des semences saines, à éliminer les restes de cultures et pulvériser régulièrement les plantes avec des produits tels que l'azoxystrobine, le chlorothalonil, le difénoconazole, l'iprodione, le mancozèbe. le propinèbe.
<b>La verticilliose</b>	<i>V. albo-atrum</i> <i>V. dahlia</i>	Il n'existe actuellement aucun traitement curatif contre la verticilliose. La lutte ne peut être que préventive au travers de mesures prophylactiques ou de pratiques culturales adaptées.
<b>Anthracnose</b>	<i>Colletotricum coccodes</i>	-utiliser des variétés résistantes, et d'appliquer un traitement au préalable des semences.
<b>Oïdium (le mal blanc)</b>	<i>Oidium neolycopersici</i>	-utiliser des variétés résistantes ou tolérantes, - nettoyage des outils de travail et suppression rapide des parties ou sujets atteints afin que la maladie ne se propage pas trop vite.
<b>Pourriture grise</b>	<i>Botrytis cinerea</i>	Éviter les condensations d'eau, bonne aération des serres. Elimination des débris végétaux. La lutte chimique ralentit la maladie mais ne permet pas l'élimination du champignon.
<b>Chancre bactérien</b>	<i>Clavobacter michiganensis</i>	- Eviter les terrains infestés Aération convenable des serres Eviter l'apport excessif d'azote Eviter les excès d'eau. -Éliminer les plants malades Appliquer des fongicides à base de cuivre qui ont un effet bactériostatique. -Désinfection des abris-serre avant plantation Utilisation de semences certifiées Traitement de semences. -Variétés résistantes.
<b>Flétrissement bactérien</b>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Aérer au maximum les cultures sous abris, et éviter l'irrigation par l'aspersion, élimination des débris végétaux en cours ou en fin de culture, utilisation de semences désinfectées.



*Chapitre IV :*  
*L'agent*  
*pathogène*

### IV.1. L'agent pathogène: *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*

Le genre *Fusarium* regroupe des espèces au sein desquelles existent de nombreuses formes phytopathogènes. C'est notamment le cas de l'espèce *F. oxysporum* qui comporte des formes capables de provoquer des maladies très importantes, les trachéomycoses, sur un grand nombre de plantes cultivées (réf). *Fusarium oxysporum* Schlecht. Snyder et Hansen (Snyder et Hansen 1940) est l'espèce la plus répandue du genre *Fusarium*. C'est un champignon saprophyte du sol, capable de survivre longtemps sous forme de chlamydospores (Agrios, 2005) Les *F. oxysporum* ont une spécialisation parasitaire très élevée. Certaines souches ne provoquent la maladie que sur un nombre limité d'espèces, voire une seule. Ceci a donné naissance au concept de formes spéciales. Plus de 120 formes spéciales et races ont été ainsi identifiées, basées sur leur spécificité d'hôtes (Tableau IV.1) (Armstrong et Armstrong, 1981). Ces formes spéciales sont elles-mêmes subdivisées en races physiologiques sur la base du pouvoir pathogène sur des cultivars d'une plante-hôte donnée. Dans quelques cas d'interaction hôte-agent pathogène, les études montrent clairement qu'un nombre limité de gènes gouvernent la spécificité de la réaction, les produits de ces gènes sont encore totalement inconnus.

Les *F. oxysporum* présentent aussi une grande variabilité tant au niveau de leur morphologie, qu'au niveau de leur spécificité parasitaire. En effet, au cours de la culture *in vitro*, il n'est pas rare de voir une culture de *Fusarium* changer de morphologie graduellement ou sous forme de secteurs. D'autre part, dans la nature, des changements au niveau de la spécificité parasitaire ont été souvent notés.

**Tableau IV.1.** Quelques exemples de souches de *Fusarium oxysporum* et leurs plantes hôtes spécifiques (Ramírez-Suero, 2009).

Souches	Plantes hôtes	Genre
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomate	<i>Lycopersicon</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Concombre	<i>Cucumis</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	Pois	<i>Pisum</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cicero</i>	Pois chiche	<i>Cicer arietinum</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Melon	<i>Cucumis</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	Haricot	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Banane	<i>Musa</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>coffea</i>	café	<i>Coffea</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i>	Asperge	<i>Asparagus</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	Palmier dattier	<i>Phoenix dactylifera</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	Radis	<i>Raphanus</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepa</i>	Oignon	<i>Allium</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Pastèque	<i>Citrullus</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i>	Patate douce	<i>Ipomoea batatas</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	Chou	<i>Brassica</i> spp.

### IV.1.1. Taxonomie du *Fusarium oxysporum*

Le champignon appartient aux Adéломycètes, au genre *Fusarium* et à l'espèce *Fusarium oxysporum*. Il est très répandu dans le monde et attaque de nombreuses plantes pérennes ou annuelles, causant leur jaunissement et leur flétrissement.

Le genre *Fusarium* appartient au phylum des Deutéromycètes (champignons imparfaits, Fungi imperfecti), car la plupart des espèces étaient d'abord décrites sur la base de caractères morphologiques et une reproduction sexuée qui n'a pas été observée. Ces formes imparfaites (anamorphes) sont caractérisées par un mycélium septé et la production de conidies hyalines généralement unicellulaires sur des conidiophores libres; elles sont classées dans le groupe des Moniliales (Lepoivre, 2003). De plus, *Fusarium* produit des macroconidies composées de 2 à plusieurs cellules. Leur forme recourbée typique avec une cellule apicale plus ou moins pointue est un des critères d'identification des représentants du genre; dans beaucoup d'espèces on observe une cellule basale en forme de pied (Seifert, 2001). La production de métabolites secondaires et notamment de toxines (mycotoxines et

phytotoxines) est courante parmi les *Fusarium*, et le profil de ces composés peut être utilisé pour la classification des espèces (Thrane, 2001).

Des formes sexuées (téléomorphes) ont été maintenant observées pour certaines espèces de *Fusarium*. Elles font toutes partie des Ascomycètes, de l'ordre des *Nectriales* et notamment des genres *Gibberella* et *Nectria* (Seifert, 2001). Sur la base de la structure, les *Fusarium* spp ont la position systématique suivante (Booth, 1971).

**Tableau IV.2.** Position systématique du *Fusarium oxysporum* (Booth, 1971).

<b>Embranchement</b>	Thallophytes
<b>Classe</b>	Deutéromycetes
<b>Ordre</b>	<i>Moniliales</i>
<b>Famille</b>	<i>Tuberculariaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Fusarium</i>
<b>Espèce</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>

### IV.1.2. Biologie de *F. oxysporum*

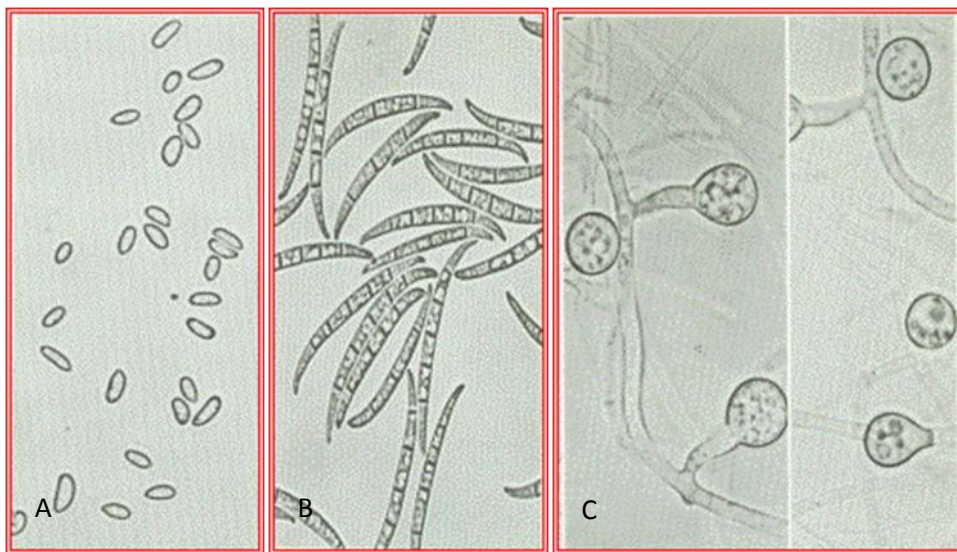
Le *Fusarium oxysporum* se caractérise par un mycélium septé, aérien, blanc coloré de violet, revers violet intense (Booth, 1971), la présence de phialides sont parfois portées par des conidiophores. Les phialides sont de taille variable, solitaires (monophialides) ou ramifiées (polyphialides) (Domsch et al., 1993). Les formes pathogènes et les formes non pathogènes ne sont pas différentes par leur morphologie (Fravel et al., 2003). Le *Fusarium oxysporum* produit trois types de fructifications (spores asexuées): microconidies, macroconidies et chlamydospores.

**Les microconidies** : sont souvent fusiformes à réniformes, uni ou bicellulaires, de forme ovale elliptique, droite ou incurvées parfois disposées en chaînettes présentant de 0 à 2 septa, de petite taille (5-12 X 2,2-3,5µm) (Fig. IV.1A), produites par de petites phialides longeniformes dans le mycélium aérien (Keith, 1996). C'est aussi le type de spore le plus fréquemment observé à l'intérieur des vaisseaux des plantes infectées (Ramirez-Suero, 2009) .

**Les macroconidies** caractéristiques du genre *Fusarium*, sont en forme de fuseau, septées, de trois à cinq cloisons, fusiformes, pointus aux deux extrémités (Fig. IV.1B). Les macroconidies de trois cloisons sont de taille de 27-46 X 3-5µm, alors que les macroconidies de cinq cloisons sont de taille de 35-60 X 3-5µm. Les macroconidies sont portées sur des conidiophores ou sur la surface des sporodochies (Wong, 2003). Ces spores peuvent être

observés dans des sporodochiums à la surface des plantes qui ont été éradiqués par le pathogène (Agrios, 2005).

**Les chlamydospores** sont des spores de résistance, entourées d'une paroi lisse ou rugueuse (Wong, 2003). Les chlamydospores sont des spores rondes d'une ou deux cellules, se différencient à partir d'une cellule située sur le parcours d'un filament ou à son extrémité. Elles sont observées au milieu des hyphes ou en position terminale (chlamydospore terminale ou intercalaire), souvent en forme de paires, quelques fois en triplets et rarement en forme rassemblée (Fig. IV.1C) (Agrios, 2005). On les considère comme des formes de conservation du parasite.



**Figure IV.1.** Les types de fructifications (spores asexuées) rencontrés chez *F. oxysporum* (A : microconidies, B : macroconidies, C : chlamydospores) (Wong, 2003).

([http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Fusarium/Fusarium\\_oxysporum.htm](http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Fusarium/Fusarium_oxysporum.htm))

### IV.1.3. Cycle de vie du champignon *Fusarium oxysporum*

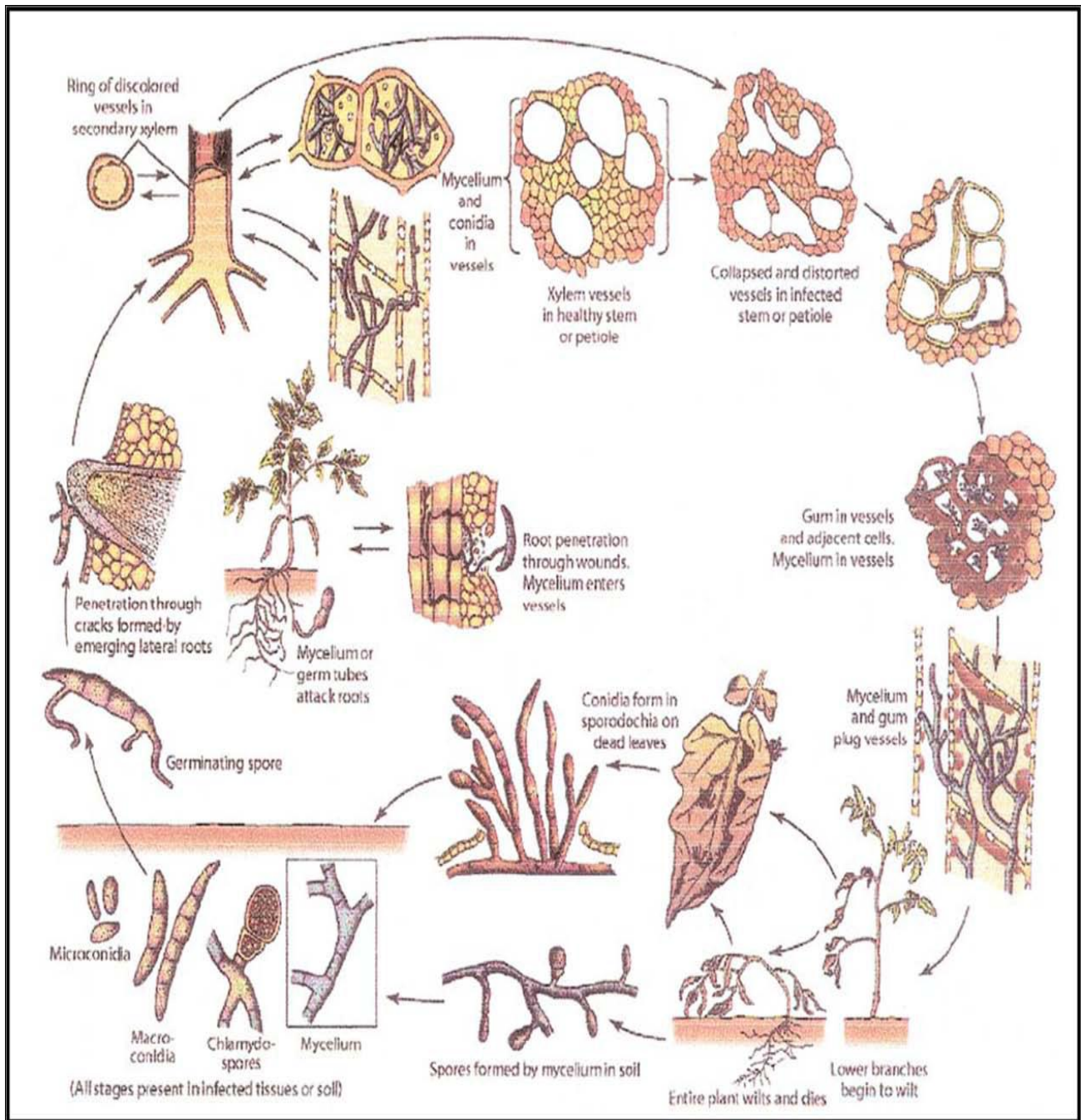
Le champignon se conserve dans le sol sous forme de chlamydospores, que l'on trouve jusqu'à 80 cm de profondeur et qui subsistent au moins 15 ans (Bigre, 1980). Sa résistance à des teneurs élevées en gaz carbonique explique cette conservation dans les couches profondes du sol (Louvet et Bulit, 1964). Le *F. oxysporum* peut également demeurer latent plusieurs mois dans les tissus de l'hôte parasité quand la température ambiante est inférieure à 15°C.

Les *F. oxysporum* ne sont pas des parasites obligatoires, leurs cycles de vie commencent par une phase saprophyte en absence de la plante hôte, ils survivent dans le sol sous forme de chlamydospores. Ces derniers restent en dormance, immobiles dans les résidus des tissus végétaux décomposés jusqu'à la stimulation de la germination en utilisant les

éléments nutritifs nécessaires libérés par les racines des différentes plantes (exsudats racinaires) ou d'autres matières organiques (Greonwalf, 2005). Après la germination, des conidies seront formées à partir d'un thalle en 6 à 8 heures d'incubation et des chlamydospores dans 2 à 3 jours, si les conditions sont favorables. L'invasion des racines est suivie d'une pénétration dans les cellules d'épiderme de l'hôte, le développement d'une maladie vasculaire systémique survient ensuite dans la plante hôte (Fig. IV.2) (Greonwalf, 2005).

Une fois pénétré dans les plantes, le champignon produit quelques substances toxiques pour la plante, comme l'acide fusarique qui entraîne une forte absorption de l'eau et une augmentation de la transpiration induisant les flétrissements. L'inoculum se conserve dans le sol sous forme de débris végétaux ou de spores de résistances (chlamydospores) pendant plusieurs années (Pitt et Hokking, 1997). La dissémination de la maladie s'opère par les boutures, les résidus, le sol, les poussières. Le champignon se retrouve alors dans le sol, où il y a lyse mycélienne sous l'influence de microorganismes, qui secrètent des enzymes extracellulaires, et formation de chlamydospores.

A côté des souches pathogènes, ils existent des isolats non pathogènes qui colonisent les racines des plantes sans induire des symptômes de maladie.



**Figure IV.2.** Cycle de la maladie de flétrissement vasculaire causée par *F.oxysporum* f. sp *lycopersici* chez la tomate (Agrios, 2005)

### IV.1.4. Pathogénie du *Fusarium oxysporum*

Durant les étapes initiales de l'interaction plante-champignon, les champignons pathogènes doivent en premier lieu détecter les stimuli provenant de la plante et de répondre avec changements morphologiques et biochimiques appropriées (Roncero et al. 2003). Le processus de signalisation représente la première étape et la plus critique dans la définition de l'issue de l'infection fongique (Roncero et al. 2003). Griffin (1969) a rapporté que les agents fongiques pathogènes telluriques, y compris *F. oxysporum*, sont capables de détecter la présence de la plante avant même le contact physique, très probablement par des composés présents dans les exsudats racinaires.

La pénétration du mycélium dans les tissus provoque la formation de cavités au niveau du contact xylème-phloème et xylème-moelle. Ces cavités apparaissent après l'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules du parenchyme du xylème, qui provoquent un amincissement des parois cellulaires et enfin une désintégration des cellules.

La pathogénicité du *Fusarium oxysporum* est le résultat des réactions biochimiques entre des substances secrétées par l'agent pathogène et des substances produites ou présentes chez la plante hôte. Pour surmonter les barrières de surfaces, les agents pathogènes sont capables de sécréter un mélange de substances qui sont généralement des enzymes hydrolytiques (chitinases, cellulases, pectinases et protéases). Une fois à l'intérieur, le champignon produit des toxines et hormones qui peuvent modifier le métabolisme de la plante au profit de l'agent fongique (Roncero et al., 2003). Les toxines sont secrétées à différents degrés selon les plantes infectées.

#### IV.1.4.1. Les enzymes

*Fusarium oxysporum* produit plusieurs enzymes qui agissent sur les pectines et la cellulose composant les parois cellulaires de la plante (Agrios, 2005).

**a. Pectinase:** elle catalyse la dégradation des polysaccharides pectique, qui se trouvent dans la lamelle moyenne (de la cellule végétale); cette enzyme est divisée en 3 sous-groupes (Kawano et al., 1999).

**-Pectine méthyl esterase (PME):** La production de la pectine méthyl estérase est une caractéristique générale chez les *Fusarium* du flétrissement vasculaire, elles sont des facteurs biochimiques importants participants à l'apparition des symptômes de la maladie (la fusariose). La dégradation de la pectine par cette enzyme donne naissance à des chaînes de deméthoxylate de pectine et du méthanol (Verlent et al., 2004).

**-Polygalacturonase (PGS):** Ces enzymes sont secrétées par le champignon durant le stade de l'infection et de la colonisation de l'hôte. Cette enzyme dégrade le xylème de la

plante infectée (Roncero *et al.*, 2003). Bien que les enzymes fongiques pectinolytiques contribuent clairement à la dégradation du xylème des plantes infectées, l'activité PGS en soi ne semble pas être nécessaire pour le développement des symptômes de la maladie (Baayen *et al.* 1997).

**-Pectate lyase (PLS):** les pectates lyase catalysent la réaction de trans-élimination des pectates, elles ont été suggérées pour jouer un rôle important dans le développement de fusariose (Beckman 1987). Une PL spécifique (désigné PL1) a été purifiée et caractérisée à partir de *F. oxysporum f.sp. lycopersici*, et a été retrouvée dans des racines de la tomate infectées ainsi que dans les tissus de la tige (Di Pietro et Roncero, 1996). Ces résultats indiquent que la PL peut être un facteur de virulence chez les *Fusarium* (Rogers *et al.* 2000).

**b. Cellulase:** Les cellulases, désignées C1, C2 et Cx, sont nécessaires pour dégrader la cellulose. Les enzymes C1 et C2 agissent sur la cellulose native, insoluble pour produire des chaînes linéaires qui sont attaquées par l'enzyme Cx pour produire la cellobiose et le glucose (MacHardy et Beckman 1981). Husain et Dimond (1960) ont rapporté que l'action de la cellulase produite par l'agent de la flétrissure de tomate *F. oxysporum f.sp. lycopersici* peut être impliquée dans la pathogenèse de trois manières différentes. Premièrement, il est impliqué dans l'induction du flétrissement de la plante. Deuxièmement, les produits d'hydrolyse de l'activité cellulase peuvent fournir au *Fusarium* les glucides nécessaires pour la poursuite de son développement dans les tissus l'hôte, et, troisièmement, il est impliqué dans la migration de l'agent pathogène à partir de tissus vasculaires à des stades avancés de la maladie.

### c. Hemicellulase

Un nombre limité d'études ont été consacrées pour éclaircir le rôle des hémicellulases dans le processus de flétrissement des plantes. Ces enzymes, cependant, pourraient être d'une importance plus significative que les pectinases et les cellulases du fait que la plus grande partie de la matrice amorphe dans laquelle sont intégrées les microfibrilles cellulolytiques est composée essentiellement de matériaux de type hémicellulose, tels que les glucanes, les xylanes et les mannanes (MacHardy et Beckman 1981). Ces enzymes dégradent les polysaccharides pectiques en mono saccharides. Selon les monomères libérés on distingue: les xylanases, galactanases, glucanases, arabinases et manases (Agrios, 2005).

#### IV.1.4.2. Les toxines

Le genre *Fusarium* est connu pour produire une large gamme de toxines (mycotoxines et phytotoxines) dont quelques exemples sont illustrés en Figure IV.3. Chez *F. oxysporum* deux toxines ont été identifiées capables d'induire à elles seules des symptômes. Il s'agit de la

lycomarasmine et de l'acide fusarique. La production de ce dernier *in planta* a été démontrée chez plusieurs plantes infectées, tels le coton, la tomate ou le pois, indiquant qu'il pourrait jouer un rôle dans l'induction de la maladie. Cependant, la production de cette toxine ne peut pas être corrélée systématiquement avec la pathogénie du champignon (Pegg, 1981).

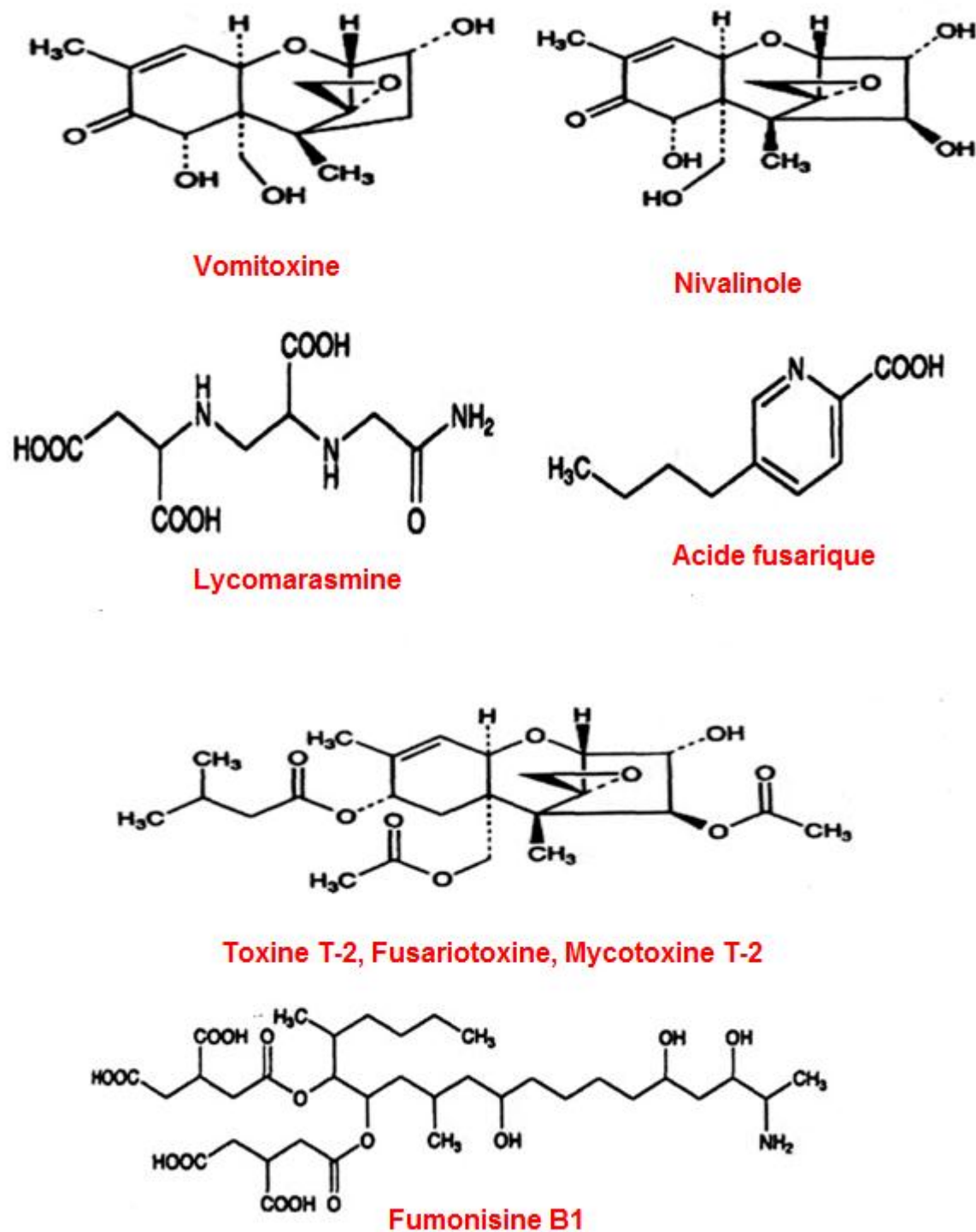


Figure IV.3. Structure chimique de quelques toxines produites par *Fusarium* sp (Haschek *et al.*, 1992).

### IV.2. Maladies causées par *F. oxysporum* chez la plante de tomate

Parmi les maladies causées par *F. oxysporum* on trouve le flétrissement vasculaire aussi appelé fusariose vasculaire (vascular wilt), la pourriture racinaire et du collet (root rot, crown rot) et la pourriture des semis (damping-off).

#### IV.2.1. La fusariose de la tomate

La dénomination fusariose est utilisée de façon moins spécifique et peut indiquer tout syndrome causé par un *Fusarium*. De ces maladies, le flétrissement vasculaire est la maladie qui provoque les plus grandes pertes dans un grand nombre de plantes cultivées, telles que les légumes, les fleurs et les cultures tropicales (Agrios, 2005)

La tomate peut être victime de deux maladies fusariennes différentes: soit la flétrissure fusarienne (*Fusarium wilt*) causée par *Fusarium oxysporum lycopersici* (FOL) ou la pourriture de la racine et du collet (*Fusarium crown and root rot*) causée par *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* (F.O.R.L).

##### IV.2.1.1. Le flétrissement vasculaire de la plante de tomate

Le flétrissement vasculaire est plus sévère dans des conditions chaudes du sol et dans les serres (Agrios, 2005). Les symptômes développés sont le résultat d'un stress sévère d'eau. Ils peuvent être très variables en fonction de la plante et incluent l'éclaircissement de la nervure, l'épinastie des feuilles, la chlorose et le dessèchement (Fig. IV.4). La plupart des plantes flétrissent et meurent, tandis que les plantes qui ont été moins affectées deviennent chétives et peu productives (MacHardy et Beckman, 1981; Agrios 2005). Des symptômes très similaires peuvent être causés par d'autres champignons, comme *Verticillium dahliae* et *V. albo-atrum*. *F. oxysporum* est unique parmi les champignons responsables de flétrissement vasculaire par sa spécificité d'hôte qui a mené à la description d'un grand nombre de formes spéciales (groupement taxonomique appliqué à un parasite fréquemment un champignon adapté à un hôte spécifique) et races sur la base de leur plante hôte et des cultivars au sein d'une espèce qu'elles infectent (Armstrong et Armstrong, 1981).

La fusariose vasculaire de la tomate causée par *F. oxysporum f.sp. lycopersici* est le cas le plus étudié; en ce qui concerne le cycle de la maladie et son développement, il est représentatif du flétrissement vasculaire chez d'autres plantes (Agrios, 2005). La tomate est souvent cultivée en serre où les températures élevées du sol favorisent la maladie. Le flétrissement vasculaire est caractérisé par un envahissement massif des vaisseaux conducteurs dans lesquels le champignon sporule. 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 causer un blocage du transport d'eau dans les vaisseaux et donc des symptômes de flétrissement (Klein et Correll, 2001).



**Figure IV.4.** Symptômes du flétrissement de la tomate causé par *F. oxysporum f. sp lycopersici* (<http://www.missouribotanicalgarden.org>).

### IV.2.1.2. La pourriture de la racine et du collet de la tomate

La pourriture de la racine et du collet est causée par *Fusarium oxysporum radicles-lycopersici* (FORL) (Duval, 1991). La FORL est apparue dans les tomates de serre au début des années 70 (Sato et Araki, 1974). Elle est caractéristique des cultures printanières et s'attaque à la culture en sol ou hors sol. Les spores du champignon sont facilement transportées par l'air et l'eau. On reconnaît la maladie aux symptômes (Tableau IV.3)

**Tableau IV.3.** Symptômes de la pourriture de la racine et du collet causée par *F. oxysporum f. sp radicles-lycopersici*

Organes observés	Symptômes
<b>Folioles et feuilles</b>	Pas de jaunissement et flétrissement unilatéraux des folioles, éventuellement la feuille entière. Feuilles hautes fanent avant les feuilles basses et il y a décoloration jaune ou doré.
<b>Tige</b>	Pas de brunissement des vaisseaux
<b>Racine</b>	Brunissement des racines, de leurs cylindres centraux et des vaisseaux au niveau de pivot et du collet. Présence éventuelle d'un chancre au collet

### IV.3. Méthodes de lutte (Moyens de lutte) contre la fusariose de la tomate

La lutte contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* n'est pas aisée car ce champignon se conserve très longtemps dans les sols et les substrats, et il les recolonise très rapidement lorsque ceux-ci ont été désinfectés. Aussi, pour que la maîtrise du champignon tellurique soit efficace, il conviendra d'associer toute la batterie de mesures et de méthodes, permettant de l'éliminer ou de limiter son développement. Différentes méthodes de lutte ont été préconisées en vue de lutter contre la fusariose.

#### IV.3.1. Moyens de lutte culturaux

La rotation des cultures constitue une bonne prévention contre certaines maladies des plantes notamment celles d'origine telluriques. Ces mesures consistent principalement à éviter les conditions qui favorisent la maladie (Duval, 1991). Le déchaumage, des dates de semis optimales, l'élimination des mauvaises herbes ainsi que le maintien d'un sol riche en élément minéraux constituent des méthodes efficaces dans la diminution de l'incidence de plusieurs maladies cryptogamiques (Booth, 1971 ; Edel et al., 1995).

Les mesures préventives contre la flétrissure fusarienne consistent à éviter les conditions qui favorisent la maladie soit: un sol léger et acide, un manque d'azote et de calcium, des températures élevées - l'optimum pour le développement du FOL est 28°C- et un manque de lumière en intensité et en temps (Anonyme, 1991).

#### IV.3.2. Moyens de lutte chimiques

C'est l'utilisation des produits chimiques pour la désinfection du sol, ces produits sont classés suivant différentes caractéristiques, tel que le spectre d'activité, la capacité de pénétration, l'efficacité, disponibilité et facilité d'usage ainsi que le coût qui reste trop élevé pour les petits exploitants. De plus, l'utilisation de pesticides est remise en cause en raison de ses impacts sur l'environnement et des problèmes de santé humaine qu'elle entraîne (Ploetz et Pegg, 2000). Il n'existe de produits chimiques ou de fongicides particulièrement efficaces contre la fusariose vasculaire. Les fongicides les plus utilisés restent le triazole et ces dérivés qui sont des composés très actifs grâce à leur noyau qui possède une activité pharmacologique, antibactérienne, antifongique et hypoglycémique (Hamoir et al., 2001).

Les méthodes de lutte appliquées pour le contrôle des fusarioses sont généralement limitées, comme c'est le cas pour l'ensemble des maladies parasitaires vasculaires. Il n'existe actuellement aucun moyen réellement efficace pour contrôler totalement ces maladies, les mesures de contrôle demeurent dans leur globalité d'ordre préventif (Rouxel et al., 1979).

### IV.3.3. Moyens de lutte génétiques ou résistance variétale

La résistance des plantes vis-à-vis des bio-agresseurs représente une alternative très prometteuse dans la lutte contre les effets dévastateurs de ces agents sur la culture des plantes. Beaucoup de recherches ont été concernées par la sélection de variétés résistantes, le but des sélectionneurs étant la résistance aux différentes maladies.

Contrairement à la lutte chimique, La résistance génétique des variétés végétales, ne nuit pas à l'environnement et elle est très efficace contre certaines maladies et ravageurs. L'inconvénient de ces méthodes réside dans le fait qu'à côté des variétés améliorées et résistantes obtenues, apparaissent en continu des agents pathogènes plus virulents (Messiaen, 1981) de même que l'obtention des variétés résistantes à un agent quelconque nécessite un travail de longue haleine et des moyens de recherche importants.

### IV.3.4. Lutte physique

La lutte physique en protection des plantes regroupe toutes les techniques de lutte dont le mode d'action primaire ne fait intervenir aucun processus biologique, biochimique ou toxicologique.

Elle consiste le plus souvent à éviter les conditions favorisant la maladie soit un sol léger et acide et un manque de N, Ca<sup>+2</sup> soit des températures élevées et un manque de lumière en intensité et en temps (Barna *et al.*, 1997). Anchisi *et al.* (1985) ont développé un traitement à l'eau chaude pour protéger les plants dans le sol. Cette méthode consiste à traiter les racines avec de l'eau à 48-49°C pendant 30 secondes avant de les transplanter. La stimulation de la croissance des racines amène une protection contre la fusariose.

### IV.3.5. lutte intégrée

La notion de protection intégrée a été initialisée il y a une cinquantaine d'années avec déjà pour objectif de réduire l'utilisation des pesticides afin de minimiser l'impact environnemental et le coût de la lutte tout en maximisant les résultats économiques de l'agriculteur.

En Europe, la lutte intégrée est définie par la directive communautaire 91/414/CEE du 15 juillet 1991, comme suit : « L'application rationnelle d'une combinaison de mesures biologiques, biotechnologiques, chimiques, physiques, culturelles ou intéressant la sélection des végétaux dans laquelle l'emploi de produits chimiques phytopharmaceutiques est limité au strict nécessaire pour maintenir la présence des organismes nuisibles en dessous de seuil à partir duquel apparaissent des dommages ou une perte économiquement inacceptables. »

### IV.6.5. Lutte biologique (« biological control » ou « biocontrol »)

**Définition de l'OILB** (Organisation Internationale de Lutte Biologique): « utilisation d'organismes vivants (à la différence du « **biopesticide** », qui désigne aussi bien des organismes vivants que des substances inertes d'origine biologique, ou encore des produits phytosanitaires dits « biocompatibles », substances actives vivantes ou inertes d'origine biologique ou non, qui peuvent être employées en lutte intégrée) (parasitoïdes, prédateurs, pathogènes, antagonistes ou compétiteurs) pour prévenir ou réduire les dégâts causés aux cultures par des ravageurs ou des maladies ». Il s'agit au fait d'utiliser la biodiversité et les ennemis naturels des espèces nuisibles. La cible est un organisme nuisible à une plante cultivée. Les bio-agresseurs sont pour la plupart des arthropodes ravageurs (aleurodes, chenilles, pucerons, acariens...). Ce peut être également des mauvaises herbes ou des micro-organismes (virus, bactéries, champignons...).

La lutte biologique permet tout d'abord de pallier les inconvénients des pesticides chimiques, à savoir :

- Leur toxicité à la fois pour les cultures et la santé humaine ;
- La pollution des sols et de l'eau ;
- La destruction des animaux utiles, tels les vers, les insectes souterrains..., mais aussi les petits mammifères, les oiseaux insectivores et autres auxiliaires de l'agriculture ;
- La raréfaction des insectes pollinisateurs (guêpes, abeilles...) ;
- Parfois, leur manque d'efficacité ; certains insectes deviennent résistants aux produits utilisés ;
- Les consommateurs attendent des pratiques culturales plus respectueuses de l'environnement et de leur santé, et souhaitent des produits « bio » ou issus de la protection intégrée.

Le caractère épidémique des maladies cryptogamiques particulièrement les maladies vasculaires, ajouté aux fortes potentialités de conservation des agents pathogènes dans le sol, l'inefficacité des méthodes de lutte chimique ainsi que l'absence des géotypes végétaux réellement résistants, imposent la considération d'autres méthodes alternatives, notamment celles qui se basent sur l'exploitation des potentialités microbiennes antagonistes. Parmi les microorganismes expérimentés avec succès, à l'égard des maladies d'origines telluriques, les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont de bons candidats pour la lutte biologique, car elles produisent des endospores tolérantes à un grand nombre de contraintes extérieures (chaleur, dessiccation) et ils sont également connues comme des bactéries produisant un large spectre de molécules antibiotiques (fongistatine, fongocine, bacilline...), impliquées dans le

contrôle de maladies fongiques (Magnin-Robert, 2007). De même que les espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère d'une grande variété de végétaux et possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques sont particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique (Lemanceau et Alabouvette, 1991). L'exploitation l'activité antagoniste de certaines races de *Fusarium oxysporum* non pathogènes contre les agents de la fusariose de différentes plantes est aussi rapportée par un nombre de chercheurs.

Bien que des articles sur la lutte biologique contre la fusariose ait été publiée dans des journaux de renommée internationale, aucun ne donne un réel espoir sur l'efficacité d'une telle méthode. La plupart de ces études ne concernent pas la réduction de la maladie au champ. Elle se focalise plutôt sur l'inhibition *in vitro* du pathogène par des agents microbiens (Thangavelu et al., 2004), ou sur la réduction de la maladie dans des expériences en pots dans des serres (Saravanan et al., 2003). Les résultats des rares études sur le terrain se sont avérés décevants.

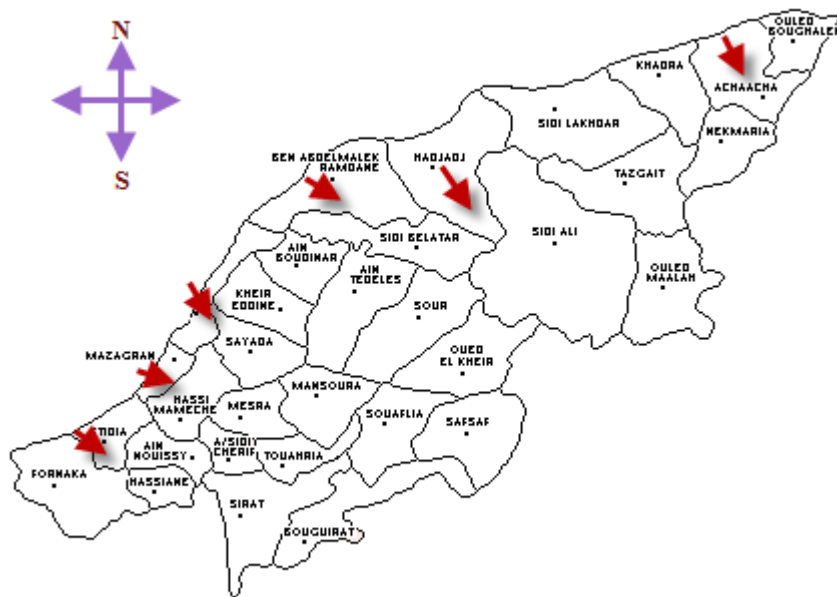
*Chapitre V :*  
*Matériel*  
*Et*  
*Méthodes*

### V.1. Méthodes d'isolement des rhizobactéries libres et endophytes

#### V.1.1. Echantillonnage

Les prélèvements des plantes de tomate et du sol ont été effectués dans différentes régions de la wilaya de Mostaganem à partir des cultures de tomate de différentes variétés hybrides ou fixes sous serre et en plein champs (Fig. V.1). Ces prélèvements ont été réalisés durant une période de quatre années allant de 2006 à 2010.

Les microorganismes recherchés sont isolés à partir de trois zones différentes de la rhizosphère selon les protocoles expérimentaux suivants.



**Figure V.1.** Carte de la localisation géographique des points de prélèvement des échantillons de plantes et de sol dans la wilaya de Mostaganem.

#### V.1.2. Isolements des souches rhizobactériennes à partir de l'ectorhizosphère

La rhizosphère est la partie du sol qui s'étend à partir de la rhizoplane vers la masse du sol entourant la plante (figure I.1). Comme on pouvait s'y attendre en raison de la complexité et la diversité des systèmes racinaires, la rhizosphère n'est pas une région de taille ou de forme bien définie, mais au contraire, se compose d'un gradient de propriétés chimiques, biologiques et physiques qui changent à la fois radialement et longitudinalement tout au long de la racine. La rhizosphère peut être divisée en plusieurs zones distinctes (Lynch, 1987). Ceux-ci comprennent l'endorhizosphère (les tissus racinaires composés de l'endoderme et de couches corticales), la rhizoplane (la surface de la racine), et l'ectorhizosphère (le sol immédiatement

adjacent à la racine). En outre, les plantes qui sont colonisés par des champignons mycorhiziens ont une zone appelée mycorhizosphère (Lindermann, 1988).

L'isolement des bactéries à partir de la rhizosphère a été effectué par la méthode suspensions-dilutions sur deux milieux différents : Luria-bertani (LB) et King B (Annexe I) selon la méthode décrite par Pegnoo *et al.* (2006). 1g du sol broyé puis tamisé de chaque échantillon a été mélangé avec 9ml de milieu PBS (Annexe I) ; les solutions mères sont ensuite diluées jusqu'à  $10^{-6}$ . 100  $\mu$ l de chaque dilution sont ensuite étalées sur la surface du milieu King B pour la sélection des germes appartenant au genre *Pseudomonas*. Pour l'isolement des souches sporulées (*Bacillus* sp), un volume (10 ml) de la solution mère a subi un traitement thermique pendant 10 mn à 80°C (Walker *et al.*, 1998). A partir de la solution ainsi traité des dilutions décimales ( $10^{-6}$ ) seront préparées. 100  $\mu$ l de chaque dilution sont ensuite étalées sur la surface du milieu LB préalablement coulés dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 48h. Pour chaque échantillon de sol et de plante, deux boîtes de Petri ont étéensemencées par dilution et par groupes de bactéries.

### V.1.3. Isolement des souches bactériennes (épiphytes) à partir de rhizoplane

La rhizoplane est la surface des racines des plantes et des particules du sol fortement adhérentes à cette surface (Kennedy, 2005).

Après élimination des particules du sol attachées aux racines des plantes de tomate, ces dernières sont rincées deux fois par une solution de tampon phosphate salin (PBS) stérile. 1g de ces racines est immergé dans 9ml de PBS puis incubé dans un agitateur rotatif à 185 tours/mn pendant 30 minutes. La suspension obtenue est considérée comme solution mère contenant des bactéries de la rhizoplane. Cette dernière solution est ensuite diluée avec le PBS jusqu'à  $10^{-6}$ . 100  $\mu$ l de chaque dilution sont étalés sur le milieu King B et LB préalablement coulés dans des boîtes de Pétri. L'isolement de chaque groupe de bactéries a été effectué selon le même protocole précédemment cité. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 48h.

### V.1.4. Isolement des bactéries endophytes à partir de l'endorhizosphère

Les microorganismes semblent être omniprésents dans les tissus des espèces végétales: des bactéries appartenant à différents genres (82) ont été signalés dans un large éventail de plantes, y compris les plantes ligneuses et les cultures arables. Les genres bactériens *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* et *Agrobacterium* sont les plus fréquemment isolés (Lodewyckx *et al.* 2002; Mastretta *et al.* 2006).

Un micro-organisme est considéré comme endophyte lorsqu'il est isolé d'un organe de la plante dont la surface aura été préalablement stérilisée (Hallmann *et al.*, 1997).

#### V.1.4.1. Stérilisation de la surface des racines

La stérilisation de la partie superficielle des racines est effectuée tout d'abord, par un lavage minutieux d'un lot de racines sous l'eau du robinet pour l'élimination des particules du sol fixées aux racines. 1g de ce lot est ensuite immergé dans 100 ml d'éthanol 75° pendant 3 minutes puis dans une solution d'hypochlorite de sodium (1%) pendant 3 minutes, suivi par un lavage trois fois dans de l'eau distillée stérile (Sang –Woo *et al.*, 2010). Cette opération a pour but d'éliminer tous les microorganismes de la rhizoplane, c'est-à-dire de la surface externe des racines.

#### V.1.4.2. Macération des tissus de racines

La macération est la méthode préférée pour l'isolement des bactéries endophytes à partir des tissus stérilisés (Sieber, 2002). La macération des tissus stérilisés est réalisée par le broyage des racines stérilisées à l'aide d'un mortier stérile dans 50ml de PBS stérile. Une série de dilutions décimales est ensuite préparées à partir de cette suspension racinaire (Sang –Woo *et al.*, 2010).

#### V.1.4.2. Isolement des bactéries endophytes cultivables

100µl de chaque dilution préparée sont étalés sur la surface des deux milieux utilisés : le milieu LB et le milieu King B préalablement coulés dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont ensuite incubées à 27°C pendant 48h. Pour l'isolement spécifique des souches de *Pseudomonas sp*, les boîtes sont incubées à 28°C pendant 24h (Ramesh *et al.*, 2009).

### V.1.5. Purification des isolats bactériens

La purification des souches obtenues après isolement a été réalisée par le transfert successif de colonies bactériennes présentant différents aspects sur des boîtes de Pétri contenant le même milieu (LB ou King B) précédemment utilisé pour l'isolement des espèces bactériennes. Le transfert est effectué à l'aide d'une anse stérile par la méthode des stries. Cette opération a été répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une culture bactérienne pure.

### V.1.6. Caractérisation des isolats par étude des caractères microscopiques et biochimiques

Après isolement et purification des différentes souches microbiennes, une étude microscopique a été réalisée sur chacune des souches obtenues, afin de déterminer la forme et le type de paroi. Cette étude est basée essentiellement sur la coloration de Gram.

L'identification des différents isolats obtenus après purification a été réalisée selon la charte d'identification des bacilles gram négatif selon Bergey's manual of determinative bacteriology (1984) et selon Slepecky et Hemphill (2006) pour les bacilles gram positif.

### V.1.7. Conservation des isolats bactériens

Les souches purifiées sont conservées à une température de 4°C dans des tubes à essais contenant soit le milieu KB incliné pour les souches de *Pseudomonas sp* ou le milieu LB incliné pour le reste des souches. Afin de régénérer les souches, des repiquages sur milieu vierge sont réalisés périodiquement tous les deux mois.

## V.II. Isolement et caractérisation de l'agent pathogène

### V.II.1. Prospection et évaluation de l'importance de la fusariose de la tomate dans la zone d'étude.

Plusieurs prospections ont été réalisées dans les différentes localités de production de tomate de la région de Mostaganem, pendant les campagnes agricoles de 2006 à 2010. Des parcelles cultivées de tomate situées dans chacune des localités suivantes : Mazagran, Benabdelmalek Ramdhan, hadjaj et Achacha ont été inspectées toutes les semaines pendant une période de 2 mois, depuis le mois d'avril jusqu'au mois de juin. L'estimation de l'importance de la fusariose est effectuée en choisissant au hasard et en diagonale les plants infectés.

**Incidence de la maladie:** pourcentage de plants malades par parcelle. Un plant ayant un des organes présentant les symptômes de la fusariose est considéré comme le « seuil minimum » pour juger qu'un plant est atteint de la fusariose.

### V.II.1.2. Collecte des échantillons

Des échantillons ont été prélevés pour être analysés au laboratoire. Il s'agit dans certains cas de prélever des plantes toutes entières présentant des symptômes de la maladie et dans d'autres cas, quelques organes aériens (tiges) de la plante. Des prélèvements de sol de la rhizosphère ont été également effectués. Ils sont mis dans des sachets de plastiques et ramenés dans une glacière.

### V.II.2. Caractérisation de l'agent pathogène

#### V.II.2.1. Isolement de l'agent phytopathogène

Les isolats de *Fusarium* utilisés dans cette étude ont été obtenus à partir des plants de tomate présentant des symptômes de flétrissement dans des régions de willaya de Mostaganem. Une souche de référence de *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* nous a été aimablement fournie par le laboratoire de microbiologie du sol et de l'environnement INRA de Dijon - France.

La technique utilisée est celle décrite par [Rappilly \(1968\)](#) et [Katan et al. \(1991\)](#). Des petits fragments de 5 millimètres de long sont préparés à partir de la tige des plantes de tomate présentant des symptômes de la fusariose. Ces fragments sont superficiellement désinfectés par trempage dans de l'eau de javel à 12 % pendant une minute. Ils sont ensuite lavés avec de l'eau distillée stérile trois fois puis séchés dans du papier filtre stérile. 4 à 5 fragments de tige ou de racine sont placés dans une boîte de Pétri contenant le milieu de culture PDA (Annexe I), additionné de deux antibiotiques (chloramphénicol + streptomycine à raison de 20mg/100ml) pour minimiser la contamination bactérienne. L'incubation des boîtes de Pétri est effectuée à 25°C et à l'obscurité pendant 5 à 7 jours. L'observation est effectuée quotidiennement jusqu'à apparition du mycélium caractéristique de l'agent causal.

#### V.II.2.2. Purification de l'agent pathogène

Après une identification primaire à l'aide d'une observation macroscopique et microscopique, des repiquages successifs à partir des différentes cultures sont réalisés. Ces repiquages seront répétés plusieurs fois dans des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Les cultures ainsi obtenues seront ensuite conservées à 4°C.

#### V.II.2.3. Préparation d'une culture monospore

Un explant de 05 mm de diamètre d'une culture de la souche fongique est prélevé à partir de la périphérie puis introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile. Après agitation au Vortex, des dilutions décimales successives sont préparées. A partir des dernières dilutions ( $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ ), 0,1 ml est étalée sur la surface d'une boîte de Pétri contenant une couche fine de milieu PDA. Après 24 heures d'incubation à 25°C, on procède au repérage et à la délimitation des spores en germination à l'aide d'un microscope binoculaire. Deux à trois conidies seront transférées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu frais de PDA et incubées pendant 5 à 7 jours à 25°C.

### V.II.2.4. Identification macroscopique et microscopique du pathogène

L'identification du champignon est basée essentiellement sur les caractères morphologiques et culturels comme: la vitesse de croissance, l'aspect du mycélium aérien, couleurs de l'envers de la colonie. L'identification microscopique consiste à observer sous microscope optique la présence de mycélium septé, de microconidies et macroconidies et les chlamydospores (Booth , 1971; Nelson et al., 1983; Leslie et Summerell, 2005).

### V.II.3. Estimation du pouvoir pathogène des isolats de *F. oxysporum*

La pathogénie du champignon constitue un trait de caractérisation très important. Il permet de différencier entre les formes pathogènes et non pathogènes chez un certain nombre d'espèces fongiques de même que la détermination du degré d'agressivité de la population étudiée. Le test conduit sur les jeunes plantules présente l'avantage de demander un espace réduit et permet donc de tester simultanément un grand nombre d'isolats

#### V.II.3.1. Evaluation de la pathogénie des isolats de *F. oxysporum in planta*

L'estimation du pouvoir pathogène des différentes souches est réalisée sur des plantules de tomate au stade de quatre vraies feuilles. Les plantules (de deux à trois semaines) sont déterrées et les racines lavées sous l'eau de robinet puis rincées à l'eau distillée stérile. Les racines de 5 plantules par isolat sont trempés dans une suspension de spore, préparée à partir de chacun des isolats, pendant 30 minutes. Les plantules inoculées sont immédiatement remis dans des pots remplis de sol de jardin mélangé à la tourbe stérile (Fig. V.2). Les témoins sont trempés dans l'eau distillée stérile pendant le même temps. L'estimation du pouvoir de pathogénie est ensuite vérifiée par l'estimation des symptômes externes de la fusariose selon le barème de Douira et Lahlou (1989) ci-dessous par le calcul de l'indice d'altération foliaire:

**Tableau V.1.** Echelle d'évaluation de l'altération foliaire selon Douira et Lahlou (1989)

Note	Apparence des feuilles
0	Feuilles d'apparence saines
1	Feuilles cotylédonaires : flétrissement ou jaunissement
2	Feuilles cotylédonaires : chute
3	Feuilles vraies : flétrissement ou jaunissement
4	Feuilles vraies : nécrose
5	Feuilles vraies : chute

Les notes rapportées au nombre de feuilles constituent l'indice d'altération foliaire (IAF), calculé selon la formule ci-dessous. Un indice moyen est ensuite calculé pour chaque lot de plantes.

$$\text{IAF} = \frac{\text{somme totale des notes}}{2 * 2 + 5 * \text{nombre de feuilles vraies}} * 100$$

Afin de vérifier l'incrimination des différents isolats du FOL dans l'infection des plantes de tomates, le ré-isolement de l'espèce fongique est réalisé selon la méthode de [Rappilly et al. \(1968\)](#) décrite précédemment et qui consiste à déposer sur la surface du milieu PDA en boîte de Pétri, de petits fragments de racines, préalablement désinfectés à l'eau de javel à 12%, des plantules de tomate infectées et saines suivi d'une incubation pendant 7 jours. La nature des agents microbiens cultivés est par la suite déterminée.

Le champignon est ensuite conservé dans des tubes à essais à une température de 4°C, pour une utilisation ultérieure. Le repiquage des isolats est répété chaque période de 2 à 3 mois.

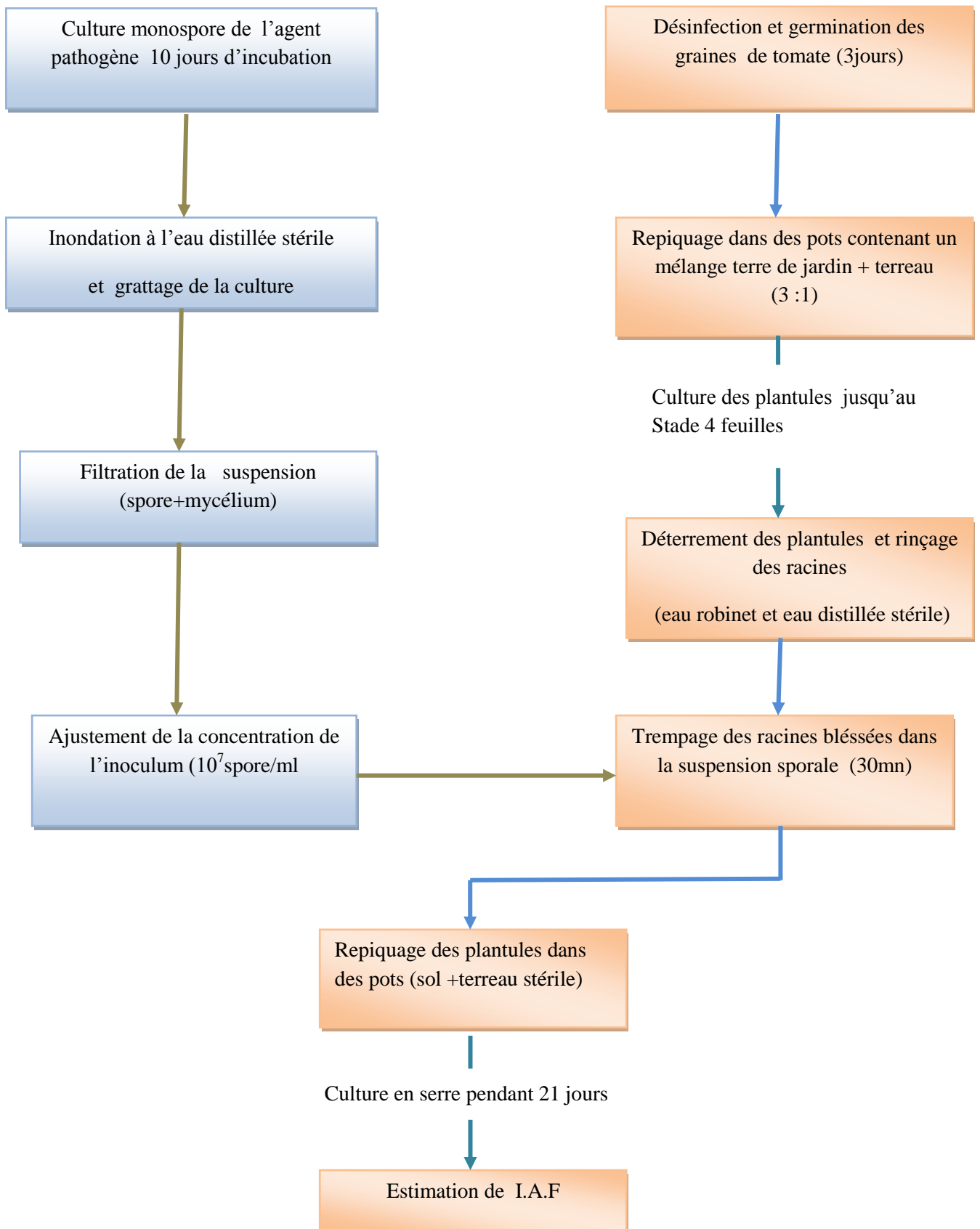


Figure V.2. Dispositif expérimental pour l'étude de la pathogénie des isolats fongiques

### V.3. Etude de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats bactériens vis-à-vis de *F. oxysporum* f. sp *lycopersici*

#### V.3.1. production des substances diffusibles (Antibiose)

La capacité de la totalité des souches bactériennes isolées à inhiber la croissance du champignon pathogène par la production de substances diffusibles a été testée par la méthode de confrontation directe (dual assay) en boîte de Pétri sur le milieu PDA selon la méthode décrite par [Inam-UL-Haq et al. \(2003\)](#). La souche bactérienne est inoculée en trait au bord de la boîte à l'aide d'une anse stérile. Après incubation à 30°C à l'obscurité pendant 48h, une pastille mycélienne de 5 mm de diamètre, prélevée au bord d'une jeune colonie fongique âgée d'une semaine, est déposée au centre de la boîte à environ 2.5 cm de la souche antagoniste testée. L'incubation des boîtes est effectuée à 25°C et à l'obscurité pendant 7 jours (Pour chaque essai, le dispositif expérimental est répété deux fois).

#### Lecture des résultats

Des mesures du rayon des colonies sont effectuées après 7 jours d'incubation. L'inhibition de la croissance fongique a été évaluée par le calcul du pourcentage de réduction de la croissance mycélienne selon la formule suivante ([Whipps, 1987](#)).

$$I\% = (R1-R2) / R1 \times 100$$

**R1** = distance radiale (en mm) de la croissance mycélienne en absence de la souche antagoniste (contrôle)

**R2** = distance (en mm) de la croissance mycélienne en direction de l'inoculation bactérienne.

#### V.3.2. Production des substances volatiles et l'acide cyanhydrique (HCN)

##### V.3.2.1. Test de la production des substances volatile

100 µl d'une suspension de chaque bactérie testée sont déposés au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu LB et KB puis étalés sur la surface, parallèlement, une pastille de 5 mm de diamètre du champignon (*FOL*) est déposée au centre d'une boîte contenant le milieu PDA. Les couvercles des deux boîtes sont enlevés et les deux fonds sont scellés à l'aide d'une bande de Parafilm afin d'éviter les pertes des substances volatiles. L'ensemble est incubé pendant 5 à 7 jours à 28°C. Une boîte de Pétri servant de témoin contenant uniquement le milieu PDA est ensemencée par l'agent pathogène ([Montelegre et al. 2003](#)).

L'inhibition de la croissance mycélienne a été évaluée par le calcul du pourcentage de réduction de la croissance mycélienne selon la formule de [whipps \(1987\)](#).

##### V.3.2.2. Test de la production de l'acide cyanhydrique (HCN) :

La capacité des isolats bactériens pré - sélectionnés à ralentir la croissance de l'agent pathogène par les substances volatiles a été évaluée par la mise en évidence des souches à produire de l'acide cyanhydrique selon la méthode de [Bakker et Schippers \(1987\)](#). Cette dernière consiste à ensemencer chaque souche bactérienne par stries à l'aide d'une anse stérile à la surface du milieu de Bakker et Schippers ([Annexe I](#)). Sur le couvercle de chaque boîte ensemencée est déposé un papier filtre stérile imprégné d'une solution de 0.5% d'acide picrique dans une solution de 20% de carbonate de sodium (de couleur jaunâtre). Les boîtes sont ensuite scellées à l'aide d'un Parafilm et gardées en position normale (non inversée) dans une étuve à 28°C pendant 3 jours. Le changement de couleur du papier filtre du jaune au brun indique la production d'HCN.

### V.3.3. Production des sidérophores

Le protocole de [King et al. \(1954\)](#) a été utilisé pour la mise évidence de la fluorescence. Les différents isolats sont ensemencés par la méthode de stries sur la surface du milieu King B en présence (50µg/L) et en absence de FeCl<sub>3</sub>. La lecture est effectuée après incubation à 28°C pendant 48 h.

Les boîtes sont observées sous lumière UV pour la détection de la fluorescence. Le pigment fluorescent formé est considéré comme indication de la production de sidérophores ([Teintze et al., 1981](#) ; [Yasmin et al., 2009](#)).

### V.3.4. Production d'enzymes hydrolytiques

Des milieux spécifiques ont été utilisés pour la mise en évidence des différentes activités enzymatiques des souches microbiennes sélectionnées. Chaque souche bactérienne est ensemencée par touche sur milieu spécifique et chaque expérience est répétée trois fois.

#### V.3.4.1. Production de l'amylase

Le milieu spécifique utilisé pour déterminer l'activité amylolytique extracellulaire a été préparé par l'ajout de 20 g par litre d'amidon comme seul source de carbone dans un milieu PDA sans dextrose. Les différentes souches antagonistes ont été ensemencées par touches dans des boîtes de Pétri contenant le milieu spécifique (PDA + amidon). Les boîtes sont incubées à 28 °C pendant 3 jours. La mise en évidence de la présence d'amylases extracellulaires est réalisée après inondation de la surface des boîtes par une solution de Lugol. La présence de zones claires entourant les colonies bactériennes est une indication de la présence d'une activité amylolytique ([Norris et Rubans, 1971](#)),

#### V.3.4.2. Production de la protéinase

La recherche de l'activité protéolytique chez les différentes souches antagonistes est déterminée par l'ensemencement par touches des bactéries à la surface du milieu Agar au lait écrémé (Skimmed Milk Agar) (Annexe I) selon le même protocole précédemment cité. Après 2 à 5 jours d'incubation à 28°C. La présence d'une zone claire entourant la croissance bactérienne traduit la présence d'une activité protéolytique (caséinase) dans le milieu de culture (Smibert and Krieg 1994).

### V.3.4. 3. Production de la cellulase

L'activité cellulolytique peut être quantifiée par divers procédés (cités par des références récentes). Étant donné que la cellulose cristalline se dégrade à des taux très faibles, la plupart des méthodes ont été adaptées pour utiliser plus facilement des dérivés de cellulose solubles, dégradables comme la carboxyméthylcellulose (CMC). La recherche de la production de cellulases extracellulaire par les bactéries et les champignons se réalise le plus souvent dans des boîtes de Pétri contenant des milieux gélosés (différents) additionnés de CMC comme seule source de carbone (Johnsen et Krause, 2014). Pour la mise en évidence de la production de la cellulase, les différents isolats ont été ensemencés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu M9 (Annexe I), additionné de 10 g/l de CMC (carboxy-méthyl cellulose) et de 1.2 g/l d'extrait de levure (Cattelan et al., 1999). Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant huit jours. Après 8 jours d'incubation, la présence de la cellulase est recherchée par l'inondation de la surface de la boîte pendant 30 minutes à l'aide d'une solution 0.5% de rouge de Congo. Cette opération est suivie par un lavage avec de l'eau distillée. Un second lavage est ensuite effectué puis répété deux fois par une solution de NaCl 1M. La présence d'un halo jaune clair entourant la colonie bactérienne traduit la présence d'une activité cellulolytique (cellulasique) chez la souche bactérienne testée.

### V.3.4.5. Production de la pectinase

La production des pectinases a été recherchée sur le milieu M9 additionné de 10g/l de pectine et de 1.2g/l d'extrait de levure. La souche microbienne est ensemencée par touche sur le milieu spécifique (M9) à l'aide d'une anse stérile. Après incubation à 28°C pendant 48h, la surface de la culture microbienne est inondée par une solution de bleu de toluidine 0.1%. La présence de zones claires entourant la croissance bactérienne traduit la production de la pectinase par les souches bactériennes (Smibert et Krieg, 1994).

## V.4. Etude des propriétés associées à l'action des isolats sur la promotion de la croissance de la plante tomate

### V.4.1. Solubilisation des phosphates inorganiques

L'étude de la capacité des souches à solubiliser le phosphate a été réalisée selon un test préliminaire. L'ensemble des souches de la collection ont étéensemencé à l'aide d'une anse stérile par touche à raison de quatre bactéries par boîte de Pétri contenant le milieu Pikovskaya (PVK) (Annexe I). Les boîtesensemencées ont été ensuite incubées à 28°C jusqu'à 14 jours. Des observations à l'œil nu des boîtes de Pétri ont été effectuées à partir du 3<sup>ème</sup> jour. La présence d'un halo de clarification autour des colonies indique la production de substances dissolvant le phosphate (Sagervanshi, 2012).

A la suite du premier test, les isolats présentant des activités de solubilisation de phosphates ont été testés individuellement (une souche par boîte) selon le protocole expérimental précédent. L'importance de l'activité de solubilisation est appréciée par la détermination d'un paramètre appelé: index de solubilisation (ISP) calculé selon la formule suivante (Premono et al., 1996):

$$\text{index de solubilisation (ISP)} = \frac{\text{diamètre total (colonie + halo de solubilisation)}}{\text{diamètre de de la colonie}}$$

L'index de solubilisation a été calculée, après repiquages des souches performantes sur le même milieu PKV (quatre répétition par souche) et incubation pendant 14 jours à 28°C.

### V. Effet du temps d'incubation sur l'index de solubilisation du phosphate (ISP)

L'effet du temps d'incubation sur la capacité des souches à solubiliser le phosphate a été déterminé par le suivi de la variation de l'index de solubilisation du phosphate de chacune des isolats testés pendant 14 jours à 28°C.

### V.4.2. Production d'acide indole acétique (AIA)

L'acide indole acétique (AIA) appartient à la classe des phytohormones qui sont impliqués dans la régulation de la croissance et du développement des plantes tout au long de leur cycle de vie. Il est bien établi que plusieurs microorganismes du sol sont activement impliqués dans la synthèse des auxines en culture pure ainsi que dans le sol (Biswas et al., 2000). L'isolement de rhizobactéries capables de produire des auxines peut être un moyen utile dans la sélection de souches efficaces en vue d'une application dans la promotion de la croissance des plantes (Asghar et al., 2004).

La production de l'acide indole-acétique (AIA) a été recherchée selon la méthode décrite par Brick et al. (1991). Cette méthode consiste, après réactivation des isolats bactériens sur leurs milieux spécifiques (King B ou LB), àensemencer des cultures microbiennes jeunes dans des fioles contenant 50 ml de milieu LB ou King B, additionné de

tryptophane (10 mg/ml) puis incubées à 28°C pendant 48 h. Au terme de 48 h, les cultures subissent une centrifugation à 6000 rpm pendant 30 min. 2 ml du surnageant de chaque culture ont été ensuite mélangé avec 4 ml du réactif de Salkowski préparé préalablement (50 ml d'acide perchlorique 35% et 1 ml FeCl<sub>3</sub> 0.5 M) avec deux gouttes d'acide orthophosphorique. Le mélange est laissé à l'air libre et en obscurité pendant 20 min. Le développement d'une couleur rose témoigne de la production de l'acide indole acétique. La concentration de l'acide indole acétique produit est dosée par lecture au spectrophotomètre de la densité optique à 530 nm. La concentration d'AIA est obtenue par extrapolation des valeurs des densités optiques par rapport à une courbe standard, établie à partir d'une série de dilutions d'AIA.

### Préparation de la courbe étalon de l'AIA

Différentes solutions de concentration variables d'AIA sont préparées allant de 10 µg/ml à 100 µg/ml, 1 ml de chaque solution est mélangé avec deux gouttes d'acide orthophosphorique et 2 ml du réactif de Salkowski. La lecture de la densité optique de chaque solution réactionnelle est réalisée après 20 minutes d'incubation dans l'obscurité à l'air libre par un spectrophotomètre UV-Visible SECOMAM à une longueur d'onde de 530 nm. La courbe standard est ensuite préparée en traçant la concentration de l'IAA en µg/ml Vs densité optique (Annexe III).

#### V.4.2.1. Effet de la concentration du tryptophane sur la production de l'acide indole acétique (AIA)

L'étude de l'effet de la concentration du tryptophane est réalisée par la culture des différentes souches productrices dans 50 ml du milieu LB ou King B contenant des concentrations variables du tryptophane (1mg/ml jusqu'à 10 mg/ml). Le dosage de l'AIA est effectué selon le protocole décrit précédemment après incubation des cultures à 28°C pendant 48h.

#### V.4.3. Production de l'ammoniaque (NH<sub>3</sub>)

Le test de production de NH<sub>3</sub> est étudié selon le protocole expérimental suivant : à l'aide d'une anse stérile, des tubes d'eau peptonée exempt d'indole sont inoculés par des souches bactériennes. Les tubes sont ensuite incubés à 30 °C pendant 48h. La présence d'indole est indiquée par l'apparition d'un anneau de couleur jaune au brun dans la phase alcoolique après addition du réactif de Nessler à raison de 0,5 ml par tube ([Cappucino and Sherman, 1992](#)).

### **V.5. Evaluation *in vivo* de la capacité des souches microbiennes pré-sélectionnées pour la promotion de la croissance de plants de tomate**

L'évaluation *in vivo* de la capacité des souches microbiennes pour la promotion de la croissance de la plante a toujours constitué une étape essentielle dans les programmes de sélection des agents de bio-contrôle. Ces programmes se sont longtemps basés sur l'introduction de micro-organismes provenant essentiellement de la rhizosphère de différentes espèces végétales. L'évolution rapide des souches microbiennes ayant cette propriété au cours des années rend ces programmes de sélection d'une importance primordiale pour faire face aux bio- agresseurs.

La technique la plus fiable pour évaluer la capacité des souches microbiennes est généralement celle conduite en plein champ dans des conditions naturelles. Cependant, le déroulement et le suivi de cette méthode se heurte à différentes contraintes et par la suite nécessite l'intégration d'un nombre élevé de paramètres qui peuvent avoir une influence sur le résultat final: composition du sol, présence de germes compétiteurs, instabilité des facteurs atmosphériques, etc: .... Par conséquent, les tests de screening conduit au laboratoire ou sous serre permettront une évaluation rapide et tolérable des souches bactériennes.

#### **V.5.1. Protocole de désinfection des graines de tomate**

Les graines de tomate d'une variété (Saint Pierre) sont désinfectées par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium (15% w/v) pendant 2 minutes, elles sont ensuite trempées dans de l'éthanol à 70% pendant 1 minute, puis rincées dans trois bains d'eau distillée stérile. Les graines sont séchées dans des conditions d'asepsie en les déposant sur un papier filtre stérile avant d'être utilisées dans les différents protocoles expérimentaux. Un lot de 5 graines désinfectées seront placé dans une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive, puis incubé à 28°C pendant 24h, afin de vérifier l'efficacité du processus de désinfection.

#### **V.5.2. Préparation de l'inoculum bactérien (antagoniste)**

Chacune des souches présélectionnées a été ensemencées en stries à l'aide d'une anse stérile à la surface d'un milieu gélosé (L.B). Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C et à l'obscurité pendant 24h. La surface de chaque culture microbienne est inondée par cinq millilitres d'eau physiologique stérile. Elle est ensuite grattée à l'aide d'une spatule stérile et la suspension microbienne obtenue est récupérée dans un tube stérile. La suspension obtenue pour chaque souche bactérienne testée est ajustée à  $10^6$  germes/ml.

### V.5.3. Préparation du sol

La terre utilisée dans ce test provient d'un sol, de type sableux – argileux. Cette terre est prélevée à une profondeur de 35 cm, d'une parcelle cultivée de tomate de la région de Mostaganem. Le sol est d'abord séché à l'air libre pendant 10 jours, ensuite broyé et tamisé à travers un tamis N°2 (5mm), il est ensuite mélangé au fumure à raison de 3 :1 (w:w). Le mélange est ensuite stérilisé par autoclavage à 121°C pendant une heure trois fois de suite (Hernandez *et al.*, 1995). Après refroidissement, le substrat est mis dans des pots de 20 x 30 cm puis maintenu à 25°C jusqu'à son utilisation.

### V.5.4. Détermination du taux de germination et l'index de vigueur

La germination directe ou indirecte des graines constitue un stade très important dans le cycle de vie des espèces végétales. Ce caractère permet de renseigner sur le pouvoir germinatif ainsi que la prédisposition de germination de l'espèce végétale en fonction de différents paramètres biotiques et abiotiques.

L'étude de l'effet des rhizo-bactéries sélectionnées sur le taux de germination des graines de tomate et l'index de vigueur correspondant a été effectuée sur 100 graines de la variété de tomate Saint Pierre, répartis en quatre lots (25 graines/lot), pour chaque souche microbienne testée. Chaque lot de graines est choisi au hasard et stérilisé selon la méthode décrite en § V.1.1. Les graines ainsi préparées sont trempées dans 10 ml d'une suspension bactérienne ajustée à une concentration de  $10^7$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Un lot de 100 graines traitées à l'eau distillée stérile est considéré comme un témoin négatif. Les différents lots de traitement sont placés dans une étuve agitée pendant 12h.

Au bout de 12 heures d'incubation, les graines traitées et les graines témoins sont semées dans des plaques-alvéoles en polystyrène remplie chacune par du sable stérilisé selon la méthode de Hernandez *et al.* (1995). Le dispositif expérimental est laissé au laboratoire et à température ambiante pendant 8 jours. Les semences sont arrosées régulièrement jusqu'à la fin de l'expérience. L'expérience a été réalisée avec quatre répétitions de 25 graines chacune.

### Lecture des résultats

Au bout d'une semaine, le nombre de graines de tomate ayant germé par souche bactérienne est noté et le pourcentage de germination est ainsi calculé. Une graine germée est celle qui parvient à émettre une radicule et les deux cotylédons.

L'index de vigueur correspondant est calculé selon la méthode d'Abdul-Baki et Anderson (1973) selon la formule suivante :

$$I.V = P.G *(L.R + L.C)$$

**I.V** : index de vigueur

**P.G** : pourcentage de germination

**L.R** : longueur de la racine (radicule)

**L.C** : longueur du cotylédon

### V.5.5. Evaluation de l'effet de l'inoculation par les isolats bactériens sur la promotion de la croissance des plants de tomate

Le test d'évaluation de l'effet des isolats bactériens sur la promotion de la croissance des plants de tomate a été effectué dans des pots de 10 x12 cm contenant de la terre de jardin d'un sol maraîcher mélangée à la fumure à raison de (3:1) respectivement. Le substrat est tout d'abord séché à l'air libre pendant 10 jours puis tamisé et stérilisé deux fois pendant 20 min à 121°C à 24h d'intervalle. Le substrat stérile est réparti dans les pots à raison de (500g/pot), les pots sont ensuite laissés à température ambiante pendant 24h (Snissi *et al.*, 2006). Les graines de tomate, variété Saint Pierre désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5%, afin d'éliminer toute trace de contamination superficielle préexistante puis rincées dans trois bains d'eau distillée stérile, sont semées à raison de cinq graines par pot et laissées à température ambiante. Les pots sont maintenus pendant 4 à 5 jours dans une chambre de culture à une température de 22°C, arrosés régulièrement avec de l'eau distillée stérile jusqu'à l'émergence de la première pousse.

Au bout de cinq jours de culture, 30 ml d'une suspension bactérienne provenant de chacune des souches testées, préalablement préparées et ajustées à une concentration avoisinant  $10^8$  à  $10^9$  ufc/ml, sont déposés à la base de la tige de chaque plantule. Une deuxième application de l'inoculum bactérien est effectuée une semaine plus tard, la densité des plantes a été ajustée à plantes par pots (Ahmed idriss, 2007). Des arrosages réguliers à l'eau distillée stérile ont été appliqués jusqu'à la fin de l'expérience.

L'expérience a été réalisée en bloc aléatoire complet avec trois pots par essai et trois répétitions pour chaque souche testée.

Les plantes ont été récoltées 35 jours après la plantation et 30 jours après l'inoculation. La capacité de promouvoir la croissance des isolats bactériens a été déterminée sur la base des données recueillies sur la longueur et le poids frais et sec des tiges des racines et les pourcentages de promotion de la croissance des racines et des tiges par rapport au témoin.

### **V.6. Evaluation de l'effet protecteur des plants de tomate par des isolats bactériens vis-à-vis de l'agent pathogène (*F. oxysporum* f. sp *lycopersici*)**

#### **V.6.1. Préparation de l'inoculum fongique (agent pathogène) :**

Un explant de 5 mm de diamètre d'une culture mycélienne de *F. oxysporum* est prélevé d'une culture du champignon âgée d'une semaine puis déposé dans une boîte de Pétri contenant du milieu PDA. Les boîtes sont incubées dans une chambre de culture à 20°C pendant 7 jours. Une suspension sporale est préparée par inondation de la surface gélosée par 5ml d'eau distillée stérile. La culture fongique est ensuite grattée à l'aide d'une spatule stérile. La suspension conidienne obtenue est agitée pendant 30 secondes puis filtrée sur papier Watman N°1 pour éliminer les débris mycéliens. La concentration des spores est ajustée à  $1.10^6$  spores.ml<sup>-1</sup> à l'aide d'une cellule de Malassez (El-rifai et al., 2003).

#### **V.6.2. Préparation du sol infecté avec *F.oxysporum* f. sp *lycopersici***

Le sol utilisé durant cette expérience est un sol de jardin prélevé dans un champ où les tomates sont cultivées mélangé au fumier (3 :1). Le sol est tamisé à travers un tamis N°2 et par la suite séché. Des quantités (400g par sac plastique stérilisable) de ce mélange sont stérilisées à l'autoclave à 120°C pendant une heure deux fois pendant deux jours et répartis dans des pots à raison de 400g/pot.

Pour la préparation du sol infecté, les différents pots contenant le sol stérile ont été infectés par inoculation par une solution de spore ( $10^6$  spore/ml) de l'agent pathogène à raison de 5% du poids totale du pot (Osuinde et al., 2002).

#### **V.6.3. inoculation des plantules de tomate**

Des plantules de tomate, variété Saint Pierre, sensibles à *F.oxysporum* f.sp. *Lycopersici* et âgées de quatre semaines ont été utilisées durant cette étude. Les plantules ont été préparées à partir de graines semées dans des plaques alvéoles en plastique contenant de la terre de jardin mélangé au fumier animal (3 :1) (Figure V.1) .

Avant l'inoculation, les jeunes plantules sont déterrées et leurs racines sont soigneusement lavées à l'eau distillée stérile pour éliminer le sol adhérent sans détériorations des racines. Le système racinaire des plants est ensuite trempé pendant 20 minutes dans une

suspension microbienne obtenue à partir de chacun des agents antagonistes. Les plantules ainsi traitées sont transplantées dans des pots en plastique contenant environ 400g de terre de jardin mélangé au fumier (3 :1) infecté par F.O.L selon la méthode décrite précédemment. Les lots témoins sont constitués d'une série de plantules traitées à l'eau distillée stérile et une série de plantules cultivée dans un sol non infecté (stérile). Pour permettre une meilleure contamination, des arrosages réguliers sont effectués afin de conserver un taux d'humidité favorable à la croissance de l'agent phytopathogène.



**Figure V.3.** Culture des plantules de tomate dans des plaques alvéoles

### V.6.4. Lecture des résultats

Des notations sont effectuées sur la croissance et le développement des plantes de tomate ainsi que sur la sensibilité à la fusariose.

- **Le développement des plantes :** est apprécié en mesurant différents paramètres de croissance des plantes : Poids frais des racines et de la tige ainsi que la longueur de la racine et la tige des différents par rapport aux témoins (Perveen *et al.*, 2007).
- **L'incidence de la maladie :** l'incidence de la maladie est déterminée par le calcul des pourcentages d'infection I(%) selon la formule suivante:

$$I (\%) = (\text{Nombre de plantes infectées} / \text{Nombre totale des plantes}) * 100$$

### V.7. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été analysés statistiquement par le test de comparaison de moyennes (Newman et Keuls) et analyse de la variance (ANOVA) par l'utilisation de deux logiciels informatiques Minitab 16 (Free trial) et Statbox. Les moyennes et les écart-types et les figures ont été réalisés par le logiciel Excel 2007 (Microsoft office).

*Chapitre VI :*

*Résultats*

*Et*

*Discussions*

### **VI.1. Isolement des rhizobactéries libres et endophytes à partir de la rhizosphère des plantes de tomate**

La rhizosphère est la partie du sol entourant les racines et sous l'effet des différentes activités métaboliques de ces racines. Les bactéries présentes dans cette partie du sol présentent un groupe hautement hétérogène et pouvant coloniser la rhizosphère, la surface des racines et même dans certains groupes les tissus internes des racines.

La rhizosphère de la tomate et d'autres plantes de la famille des *solanaceae* a été la source principale des souches microbiennes utilisées tout au long de cette étude. Les échantillons de sol ont été prélevés à partir des différents lieux de culture (sous serre et plein champs) de la tomate dans la wilaya de Mostaganem (Algérie) (Fig.V.1). Pour chaque prélèvement trois niveaux de la rhizosphère des plantes ont été explorés: l'ectorhizosphère, la rhizoplane (surface des racines) et l'endorhizosphère (les tissus internes des racines).

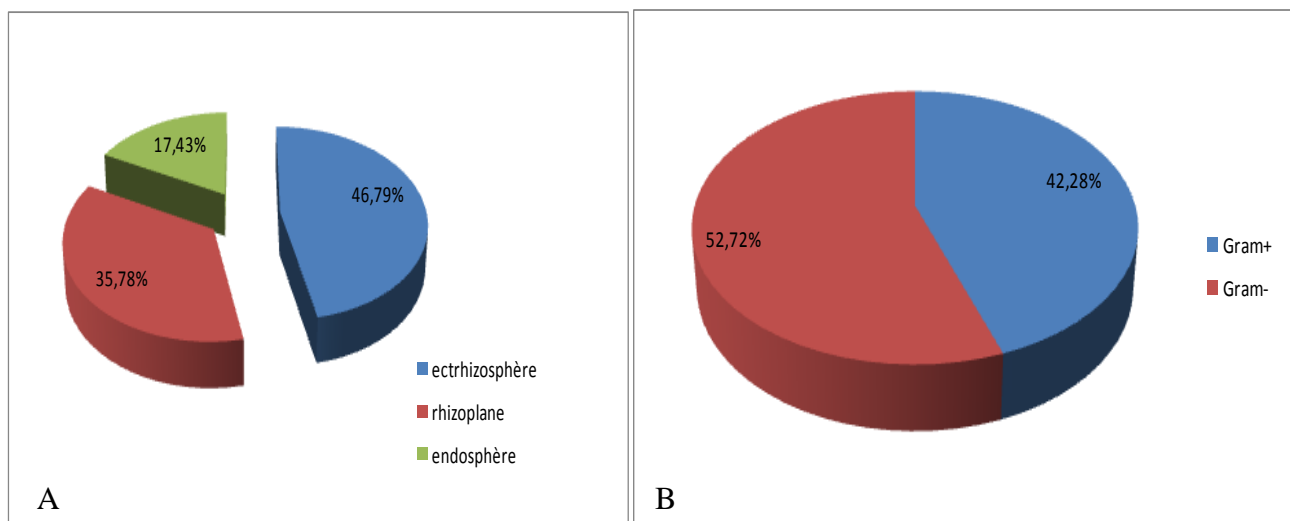
Après ensemencement sur deux milieux différents (Lb et King B), les différentes souches ont été purifiées puis distinguées les unes des autres par étalement en conditions d'asepsie sur des milieux gélosés en boîte de Petri. Ces manipulations ont permis la purification de différentes souches et le regroupement des isolats identiques grâce aux caractères morphologiques des colonies. 109 bactéries ont ainsi été dénombrées, parmi lesquelles 46.79 % à partir de l'ectorhizosphère, 35.78% de la rhizoplane et 17.43 % de l'endorhizosphère (Fig. VI.1a).

L'étude microscopique après coloration de Gram des cellules a montré que la grande majorité des cellules présentent une forme bacillaire à l'exception de quelques isolats qui étaient d'une forme sphérique. Parmi les cellules de forme bacillaires, 53 % sont des cellules à coloration Gram négatif tandis que 42 % étaient des cellules à coloration Gram positif (Fig. VI.1b). La répartition des différents isolats en fonction de leur réaction vis-à-vis de la coloration de Gram au sein des différents niveaux de la rhizosphère a montré une majorité relative de souches à Gram positif parmi les souches rhizosphériques alors que les bactéries à Gram négatif sont plus abondantes au contact des racines (la rhizoplane). A l'intérieur des tissus racinaires, les bactéries à Gram négatif se retrouvent relativement avec un nombre égal que les souches microbiennes à Gram négatif (Fig. VI. 2).

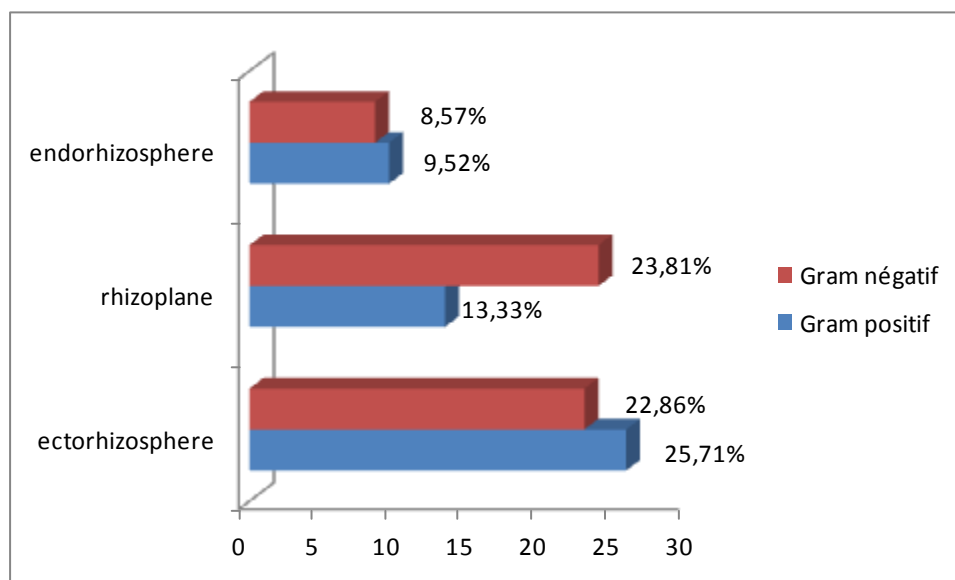
L'identification physiologique et biochimique des souches bacilles à Gram positif sporulées a permis de caractériser 44 souches appartenant au genre *Bacillus* parmi lesquelles 21% des souches présentent les caractéristique de l'espèce *B. subtilus* et *B. stearothermophilus* suivis de *B. sphaerecus* et *B. mycoides* représentant respectivement 13% et 8% des souches respectivement (Fig. VI.3).

La présence d'autres espèces telles que *B. laterosperos*, *B. macerans*, *B. mycoides* et *B. licheniformis* ont été également identifiées mais en nombre réduit par rapport aux espèces précédentes (Fig. VI.3). D'autre part, il est à noter que 13% des souches n'ont pas été identifiées jusqu'au niveau de l'espèce et de ce fait sont considérées comme des *Bacillus* sp (Annexe II).

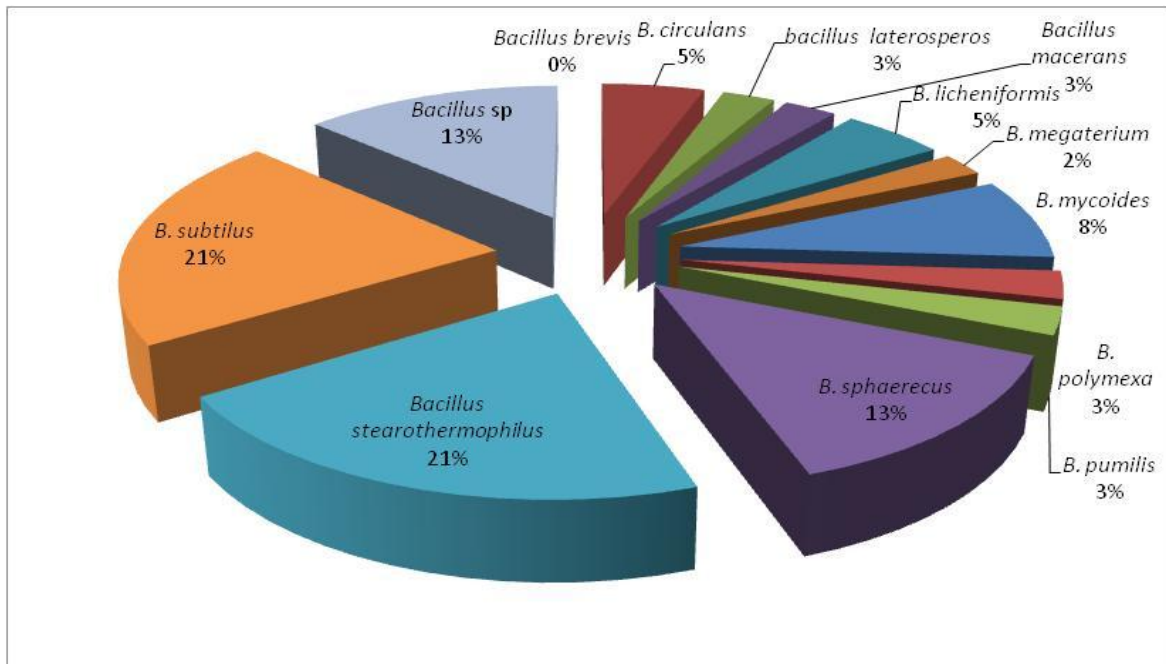
Parmi les souches bacilles Gram négatif, isolées sur le milieu King B, 45 souches présentent les caractéristiques morphologiques et biochimiques des espèces bactériennes appartenant au genre *Pseudomonas*, parmi lesquelles les espèces *P. fluorescens* et *P. putida* représentent respectivement chacune 25% et 15% des souches isolées. Les souches appartenant à *Pseudomonas* ont été isolées principalement à partir de la rhizoplane et à un degré moins à partir de l'ectorhizosphère pour *P. fluorescens*. D'autres souches appartiennent à des espèces différentes ont été aussi détectées parmi lesquelles, l'espèce *P. aerogenosa* (10%) et *P. chloraraphis* et *P. oryzihabitans* représentant chacune respectivement 7% et 8% de la population totale des isolats. La caractérisation d'environ 25% de souches bactériennes n'a pas été aboutit jusqu'au niveau de l'espèce malgré que leur appartenance au genre de *Pseudomonas* est bien établi (Fig. VI.4) (Annexe II).



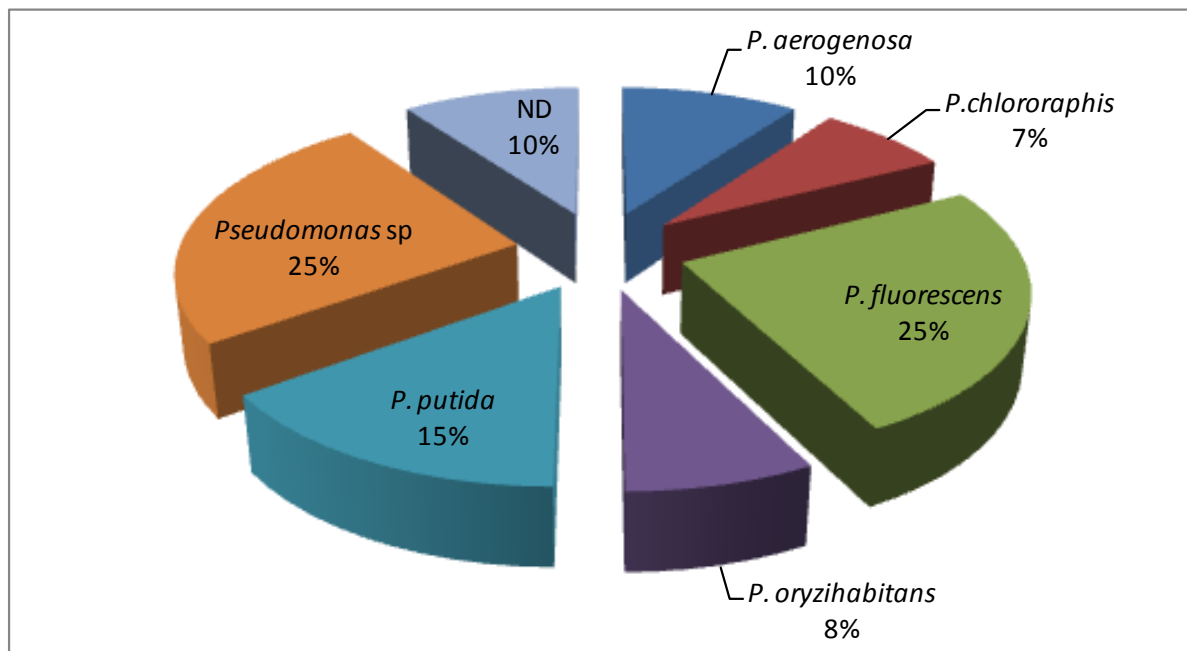
**Figure VI. 1.** Répartition des différents groupes de microorganismes isolés en fonction de :  
A: source d'isolement ; B: coloration de Gram



**Figure VI. 2.** Répartition des différents isolats en fonction du type de paroi parmi les trois sites d'isolement.



**Figure VI.3.** Répartition et identification des espèces microbiennes appartenant au groupe des bacilles Gram positif isolées à partir de la rhizosphère.



**Figure VI.4.** Répartition et identification des espèces microbiennes appartenant au groupe des bacilles gram négatif isolées à partir de la rhizosphère.

### VI.1.1. Discussion

En raison de son rôle crucial pour la croissance des plantes et de la fertilité des sols, la rhizosphère a souvent été utilisée comme un environnement modèle pour cribler les agents putatifs de lutte biologique et de stimulateurs de croissance. La rhizosphère des plantes est connue pour être une niche écologique de choix pour divers microorganismes. Ces bactéries colonisent la rhizosphère des plantes (rhizobactéries), la phyllosphère, la rhizoplane (épiphytes) ainsi que l'intérieur des tissus interne de la plante (endophytes). La structure de cette communauté microbienne est connue pour être influencée par la plante (Bergsma-Vlami *et al.*, 2005), le stade de croissance (Picard *et al.*, 2000) et par le type de sol et les conditions climatiques (Coelho *et al.*, 2008).

Durant cette étude, la rhizosphère de la tomate a été choisie pour être un lieu d'isolement de rhizobactéries libres ou endophytes en vue d'une éventuelle sélection de souches capables de promouvoir et protection de la croissance de la plante. La majorité de nos isolats ont été obtenues à partir de l'ectorrhizosphère soit (46.79%) tandis que, 35.78% et 17.43% de nos isolats ont été isolés respectivement à partir de la rhizoplane et de l'endorrhizosphère.

Cette différence est probablement due à la disponibilité d'éléments nutritifs au niveau de la zone rhizosphérique (rhizoplane + sol brut) composant les exsudats libérés par les racines des plantes. En effet, selon Foster et Rovira (1978), la densité des bactéries est souvent plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines: il s'agit de l'effet rhizosphère. A l'inverse, la partie interne (tissus) des racines est moins riche en nombre de bactéries (17.43%) que les autres parties de la rhizosphère, cela est peut être due à la spécificité des lieux de colonisation à l'intérieur des tissus des plantes qui sont probablement moins favorables que l'extérieur des racines .

Les résultats obtenus montrent une diversité de microorganismes présents dans les différents niveaux de la rhizosphère de la plante de tomate. Le test de coloration de Gram révèle la présence d'isolats à Gram positif ou/et à Gram négatif. La répartition des groupes microbiens isolés selon leur réaction vis-à-vis de la coloration de Gram montre que les deux types de bactéries, Gram positif ou Gram négatif se répartissent différemment selon le site d'isolement. Les bactéries à Gram positif sont plus abondantes dans l'ectorrhizosphère et l'endorrhizosphère, ceci est dû probablement aux conditions d'environnement qui caractérisent surtout le sol, loin de l'effet des exsudats racinaires. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par Smalla *et al.* (2001), Zinniel *et al.* (2002) et Srivastva *et al.* (2014). Ces derniers rapportent que les bactéries Gram positif sont plus abondantes dans la rhizosphère de

plusieurs plantes. En revanche, ces résultats sont en contradiction avec ceux de [Soderberg et al. \(2004\)](#) et qui préconisent que les bactéries Gram négatif sont plus abondantes dans la zone en contact directe avec les plantes, le plus souvent riche en éléments nutritifs; alors que, dans les zones éloignées on rencontre plutôt des bactéries plus résistantes telles que les bactéries sporulées Gram positif. Cette répartition n'est pas constante et peut varier même en fonction du stade de croissance de la plante ([Czaban et al., 2007](#)).

Sur la base des caractères morphologiques et biochimiques un total de 109 souches ont été identifiées comme étant des souches appartenant aux deux principaux genres microbiens recherchés (*Bacillus* et *Pseudomonas*). La présence de ces microorganismes dans la rhizosphère des différentes espèces végétales est bien reconnue. Leur faculté de croître et de se multiplier facilement sur des milieux variables et leur pouvoir antagonistes vis-à-vis des autres microorganismes leur confère une prédominance sur les autres communautés microbiennes présentes dans le sol ([Jophef et al., 2007](#) ; [Manikanda et al., 2010](#)). De plus, la capacité de formation des spores chez les bactéries membres du genre *Bacillus* leur accorde d'une part, un niveau de résistance élevée à la sécheresse et aux conditions défavorables et d'autre part, des meilleurs candidats pour le développement de produits biopesticides efficaces ([Ongena et Jacques, 2008](#)).

Le genre *Pseudomonas*, de son côté, a une énorme importance en raison, de sa large diffusion dans le sol, de sa capacité à coloniser la rhizosphère des plantes hôtes et de sa capacité à produire un grand nombre de composés ayant une action antagoniste (inhibitrice) vis-à-vis de divers agents pathogènes ([Rangarajan et al. 2001](#)).

Dans le sol en contact directe avec les racines on peut ainsi détecter différentes espèces de *Bacillus* et de *Pseudomonas*. La nature des espèces rencontrées dépend essentiellement de la plante qui détermine à son tour la nature des substrats composant les exsudats racinaires ainsi que le type de sol. Il a été même rapporté que plusieurs espèces bactériennes présentent une relation spécifique très étroite avec une espèce végétale donnée ou une variété d'espèces ([Zeller et al. 2007](#)). En conséquence, le lieu d'isolement pour la recherche d'agents promoteur de la croissance des plantes présente une grande importance du fait qu'il permet d'isoler des souches déjà adaptées à l'environnement dans lequel elles vont être introduites. Dans notre étude, plusieurs espèces appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* ont été détectées. Chez le groupe des bacilles Gram positif, l'espèce *B. subtilis* et *B. stearothermophilus* (actuellement dénommé *Geobacillus stearthermophilus*) représentent à eux seules 42% de la population totale du genre *Bacillus*. Des résultats similaires rapportés par [Govidasamy et al. \(2010\)](#) montrent que l'espèce *B. subtilis* et *B.*

*megaterium* sont parmi les espèces des bactéries sporulés qui se trouvent en abondance dans le sol et la rhizosphère des plantes. D'autres espèces du même genre (*B. mycoides*, *B. licheniformis* et *B. circulans*) ont été aussi détectées mais avec un degré moins important. La présence des ces espèces dans la rhizosphère des différentes plantes a été signalée par différents auteurs (Garcia et al., 2004 ; Sood et al., 2007) .

La variabilité des espèces présentes dans la rhizosphère a été également enregistrée dans le cas des isolats appartenant au genre *Pseudomonas*. Ces germes sont parmi les espèces microbiennes les plus abondantes dans les sols agricoles et la rhizosphère des différentes plantes, principalement les espèces appartenant à *Pseudomonas* fluorescents (Couillerot et al., 2008 ; Saharan et Negra, 2011 ). La prédominance des espèces de *P. fluorescens*, *P. putida* a été aussi rapporté par différentes recherches consacrées à l'étude de l'écologie microbienne comme étant des colonisateurs majeurs du sol et de la rhizosphère soit comme agent libre ou agent endophyte (Clays-Josserand et al., 1995; Latour et al., 1996 ; Coelho et al., 2008). La présence également d'un certain nombre de souches présentant les caractères de *P. oryzihabitans* et *P. chlororaphis* a été signalé par d'autres que ce soit parmi les *Pseudomonas* de la rhizosphère de la tomate ou d'autres cultures (Costa et al., 2006). D'ailleurs, certains auteurs ont signalé l'utilisation de ces deux espèces dans le contrôle biologique de différentes maladies des plantes ce qui démontre leur capacité à coloniser la rhizosphère des plantes (Hokeberg et al., 1998; Kapsalis et al., 2008).

## **VI.2. Agent pathogène**

### **VI.2.1. Résultats des prospections et importance de la maladie :**

Les symptômes provoqués par *F. oxysporum f.sp lycopersici* s'observent de moins en moins chaque année dans les régions du nord ouest d'Algérie. Les prospections effectuées dans les différentes parcelles de culture dans la région de Mostaganem (nord ouest d'Algérie) ont permis d'observer des symptômes caractéristiques de la fusariose dans plusieurs lieux de culture de tomate principalement sous serre. La maladie est solidement installée et seule l'importance de l'épidémie varie d'une année à l'autre et d'une région à une autre. Il semble que l'impact de l'utilisation de variété de tomate hybride résistante à cet agent à contribuer dans la diminution de l'importance des dégâts provoqués par cet agent pathogène.

### **VI.2.2. Symptomatologie de la maladie :**

Les symptômes de la maladie se traduisent par des flétrissements caractéristiques soit généralisés, soit unilatéraux. Dans certains cas, on a observé, sur les feuilles, des jaunissements suivis de flétrissement.

On a observé également sur les tiges des stries longitudinales brunes qui exsudent le plus souvent une gomme. Les symptômes étaient assez caractéristiques, mais il ne faut pas les confondre avec d'autres champignons pouvant également être vasculaires comme *Verticillium dahliae*. D'après la littérature, les symptômes de flétrissement sont plus graves entre 18 et 25°C et assez rares à 30°C (Duval, 1991). Concernant l'état des systèmes racinaires, de nombreux échantillons ont révélé des dégradations racinaires importantes. La qualité d'enracinement s'est notamment montrée déficiente. Cette mauvaise qualité se présente sous forme d'un nombre restreint de départ de racines, pouvant avoir une orientation uni ou pluridirectionnelle. Ce mauvais enracinement peut être un facteur favorisant des problèmes fongiques rencontrés ultérieurement dans la culture.

### **VI.2.3. Caractérisation morphologique et identification de l'agent pathogène**

#### **VI.2.3.1. L'identification macroscopique**

La majorité des différents échantillons utilisés dans cette étude présentaient des symptômes de flétrissement caractéristiques des maladies liées aux *Fusarium oxysporum*. Sur la base de ces résultats, un premier diagnostic a été entrepris puis complété par une analyse des échantillons au laboratoire. La réalisation d'une coupe longitudinale dans la tige a permis l'observation d'un brunissement des cylindres centraux typique de la forme spéciale *lycopersici*.

L'étude des caractères culturels des isolats de *F. oxysporum* a été réalisée après culture sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Pour chaque isolat, l'ensemencement a été

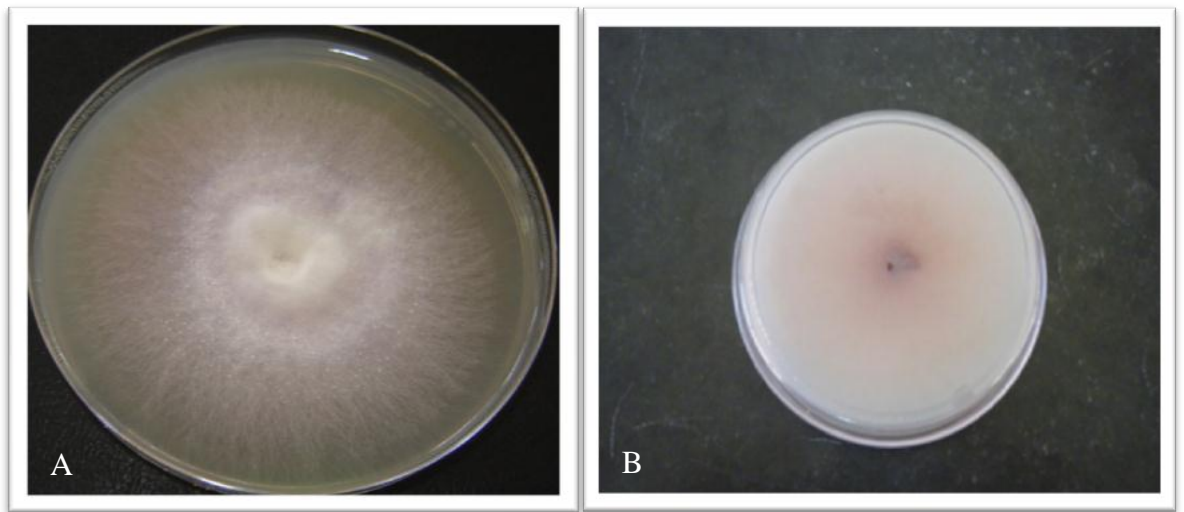
effectué au moyen d'un disque de 0.8cm de diamètre, prélevé aseptiquement à partir d'une culture âgée de 07 jours et déposé sur le milieu PDA. Les cultures ont été incubées à une température de 25°C .La disposition des boites a été modifié toutes les 24 heures de manière aléatoire afin de réduire les variations dues à l'emplacement des cultures dans l'étuve. Les critères étudiés sont : la couleur des colonies, l'aspect du mycélium. L'étude macroscopique des isolats purifiés a permis de détecter deux morphotypes avec une prédominance du morphotype cotonneux et le morphotype ras et muqueux. La couleur des colonies varie entre le blanc et violet avec parfois un rouge brique (Fig. VI.5). Il est à noter que la morphologie et la pigmentation des colonies des isolats de *Fusarium* ont souvent été instables durant les différentes manipulations.

**Tableau VI.1.** Origine et caractères macroscopiques des isolats de *F. oxysporum* sur milieu PDA

Isolats	organe	Pigmentation	Morphotype	Origine
FO1	tige	rose	Mycélium rasant muqueux	B. ramdane
FO2	tige	rose	Mycélium rasant	Mazagran
FO3	tige	blanche	Mycélium cotonneux	Achaacha
FO4	tige	blanche	Mycélium cotonneux dense	S. lakhdar
FO5	sol	Blanche rosâtre	Mycélium rasant épars	Stidia
FO6	sol	blanche	Mycélium cotonneux dense	Achaacha
FOL	-	Blanche rosâtre	Mycélium rasant muqueux	INRA, Dijon
FO7	collet	blanche	Mycélium cotonneux	Mazagran
F08	collet	blanche	Mycélium cotonneux	S, lakhdar

### VI.2.3.2. L'identification microscopique

L'observation microscopique d'une préparation des différents isolats sur lame a révélé la présence d'un mycélium septé accompagné par des microconidies, droites ou légèrement incurvées de petites tailles uni ou bicellulaire et une prédominance de leur nombre par rapport aux macroconidies (Fig. VI.6) et des macroconidies en forme de cellules cloisonnées (2 à 3 cloisons) et de grande taille en forme de croissant (Fig. VI.6). Ces spores sont produites en nombre variable selon la morphotype des souches.



**Figure VI.5.** Aspect macroscopique des colonies de *Fusarium oxysporum* sur milieu PDA  
(A : partie supérieure, B : revers de la boîte)



**Figure VI.6.** Macroconidies et microconidies observés au microscope optique (x400)

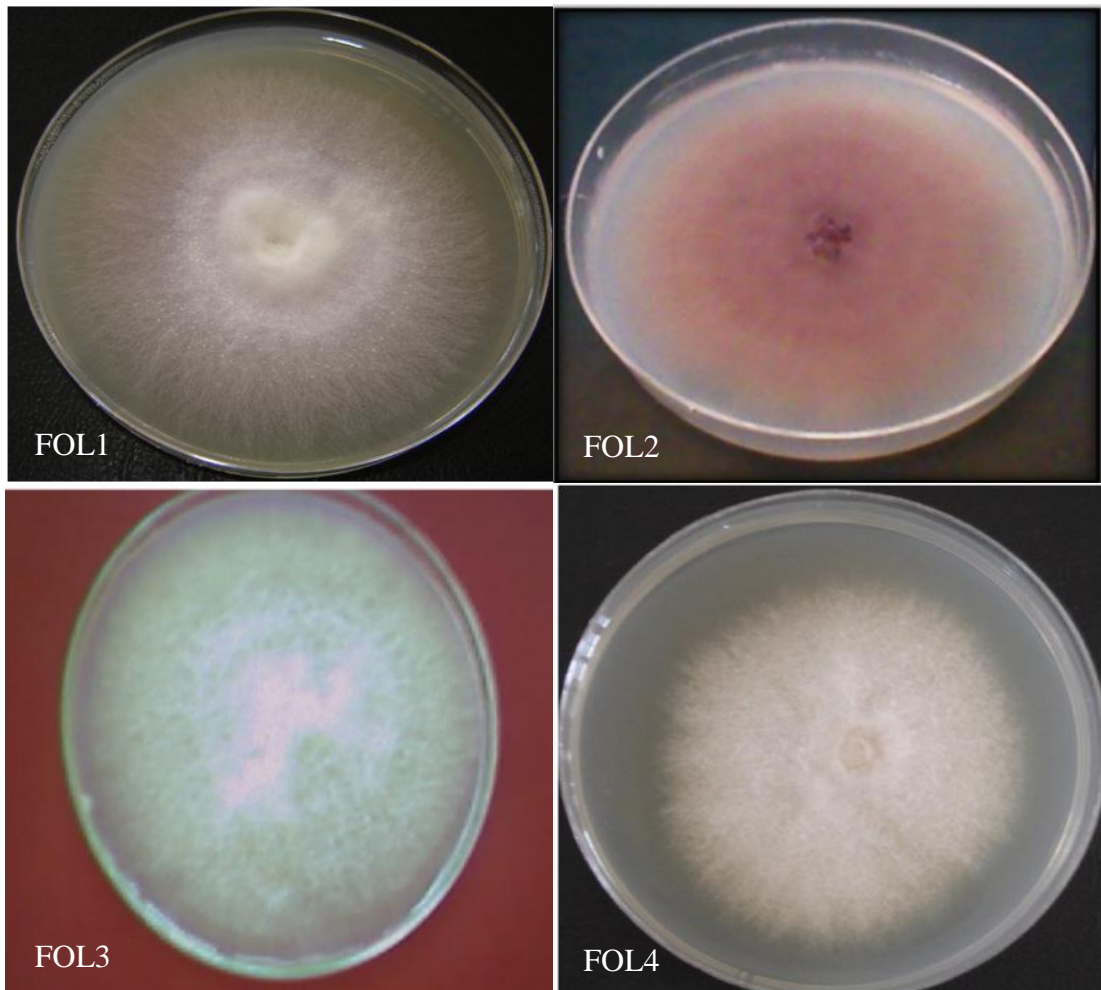
### VI.2.3.3. Détermination des morphotypes

La détermination des différents morphotypes a été étudiée par la culture des différents isolats, issus d'une culture monospore, sur le milieu PDA pendant 7 à 10 jours. Au bout du temps d'incubation, il a été noté que le champignon colonise la totalité de la boîte de Petri. Les observations effectuées sur la couleur et l'aspect mycélien sur le milieu PDA ont montré certaines variations dans la densité et la pigmentation du thalle. Ainsi, deux morphotypes principales ont pu être distingués parmi les différentes cultures:

Un morphotype cotonneux : caractérisé par la présence d'un mycélium aérien très abondant dense avec une couleur blanche à blanche rosée avec une prédominance du morphotype cotonneux de couleur blanche (FOL4 et FOL3) (Fig. VI.7).

Morphotype ras et muqueux : caractérisé par une absence du mycélium qui donne à la culture un aspect muqueux (FOL2) (Fig. VI.7)

La morphologie des colonies *Fusarium oxysporum* est souvent instable. Ce phénomène d'instabilité s'observe après trois à quatre repiquages successifs. D'ailleurs, cette diversité morphologique a été rapportée par plusieurs auteurs (Henni *et al.*, 1994).



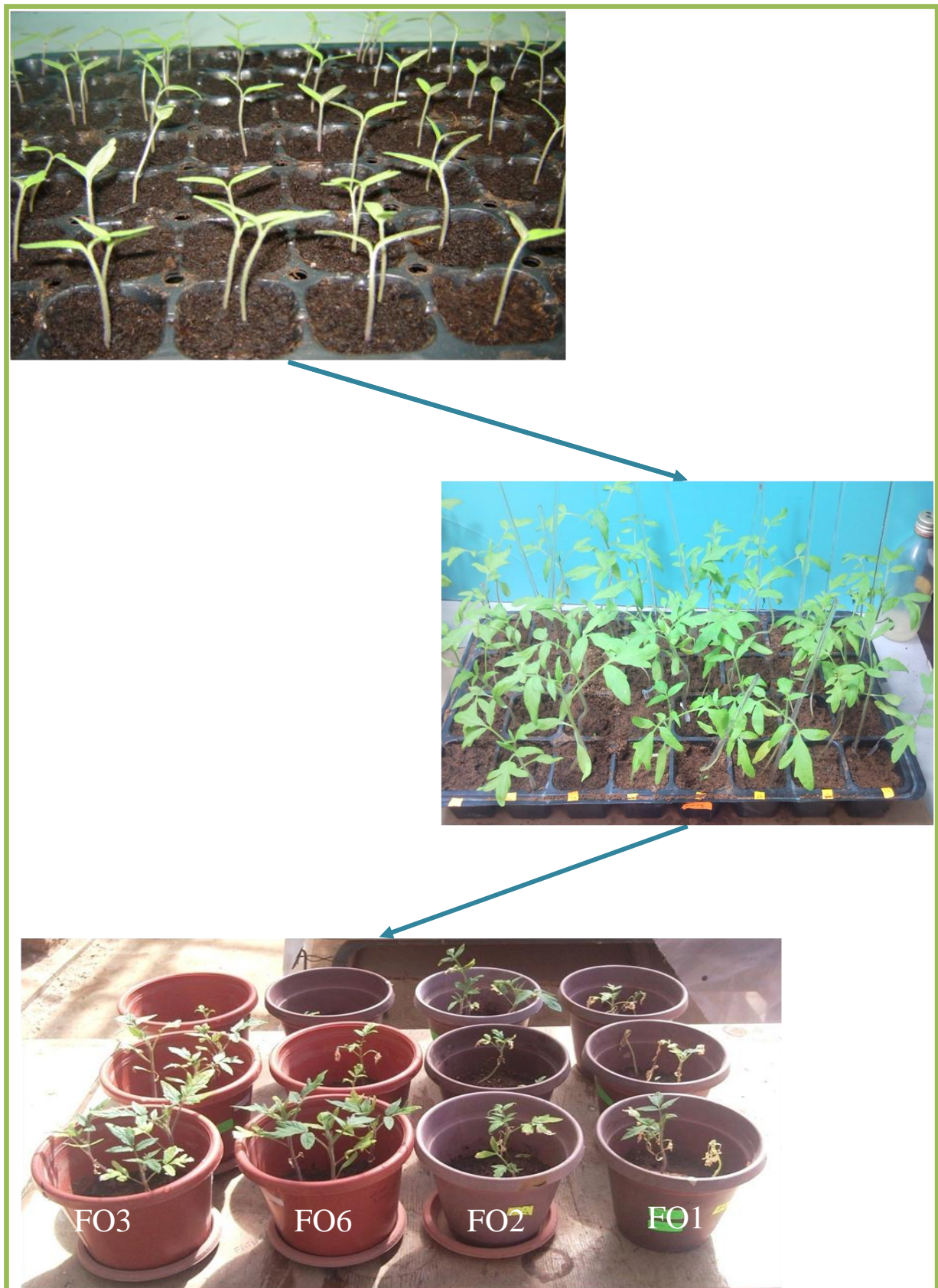
**Figure VI.7.** Les différents morphotypes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* sur milieu PDA

#### VI.2.4. Test du pouvoir pathogène des isolats de *F. oxysporum*

L'étude du pouvoir pathogène par la détermination de l'indice d'altérations foliaire a permis de montrer que les différents isolats sélectionnés exercent un effet variable sur la croissance des plantules de tomate. Deux groupes d'isolats peuvent être ainsi distingués. Le premier groupe est composé de trois agents dont l'IAF est supérieure à 50% parmi lesquels la souche de référence et les isolats FO1 et FO2. Ces agents sont capables de provoquer l'apparition des symptômes d'altération des feuilles spécifiques au FOL (Tableau VI.2). Ces champignons sont majoritairement isolés à partir de la tige de plantes présentant les symptômes du flétrissement fusarienne (Fig. VI.8). Le deuxième groupe est composé de souches présentant des IAF faibles (<50%) en comparaison avec la souche de référence. Les plantes attaquées par ces agents présentent des symptômes de flétrissement surtout dans la partie inférieure de la plante, les feuilles supérieures ne présentent presque aucun symptôme de la maladie (Fig. VI.8). La plupart de ces souches ont été isolées à partir du sol ou du collet des plantes de tomates.

**Tableau VI.2** : Indice d'altération foliaire des isolats de F.O.L

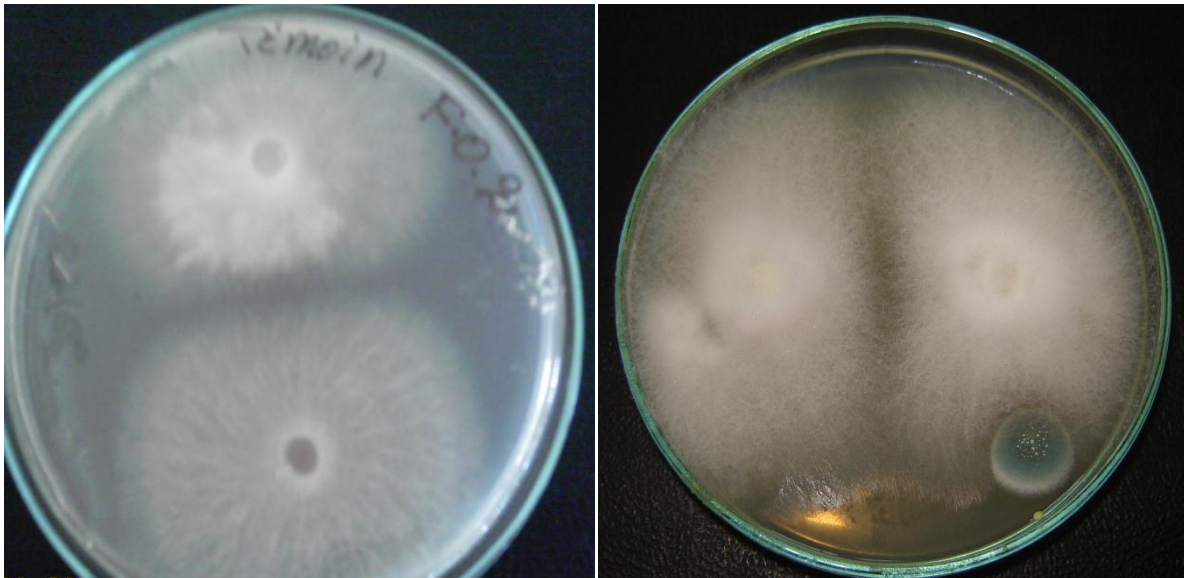
Isolat	IAF (%)
<i>FO1</i>	78.4
<i>FO2</i>	64.3
<i>FO3</i>	31.3
<i>FO4</i>	3.2
<i>FO5</i>	1.3
<i>FO6</i>	32
<i>FO7</i>	5.6
<i>FO8</i>	12.5
<i>FOL</i>	89.7



**Figure VI.8.** Schéma général montrant les différentes étapes pour la détermination de l'indice de l'altération foliaire

### VI.2.5. Ré-isolement de l'agent pathogène

Le test de Koch a été réalisé pour les deux isolats dont l'IAF est supérieure à 50% (FO1 et FO2). Des plantules de tomate au stade de trois vraies feuilles ont été contaminées par les deux isolats FO1 et FO2 et cultivées dans un sol stérile pendant trois semaines. Les tests de ré-isolement du champignon à partir des différentes parties de la plante ont révélé la présence du pathogène dans les échantillons de 76,66 % des plants et sa migration jusqu'au niveau de l'hypocotyle des plants alors que dans la majorité des plantes témoins le pathogène n'a pas été détecté. L'aspect macroscopique des colonies ressemble à celles isolées à partir des plantes atteintes par la fusariose (Fig. VI.9).



**Figure VI.9.** Aspect macroscopique de certains agents pathogènes après ré-isolement sur milieu PDA

### VI.2.6. Discussion

*Le Fusarium oxysporum* est un agent phytopathogène ubiquiste qui provoque le pourrissement des racines, le flétrissement vasculaire ainsi que la fonte de semis chez une multitude de plantes hôtes (Vurro and Gressel, 2006)..

*Le Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* (SACC.) est l'une des maladies les plus destructrices des cultures de la tomate en serre ou en plein champs dans les pays à climat tempéré (Beckman, 1987). Il envahit la plante par les blessures sur les racines. Les plantes ainsi infectées deviennent rabougries, chlorotiques et flétrissent. Décrit pour la première fois en Europe à la fin du XIXe siècle, il est maintenant présent dans plusieurs dizaines de pays (32) répartis sur tous les continents (Jones et al., 1991). Sa présence en Algérie a été rapporté. par plusieurs auteurs (Henni et al., 1994 ; Benchaabane et al., 2000, Haminni, 2011). Ces dernières années plusieurs moyens de lutte ont été appliqués pour réduire l'impact de cette maladie sur la culture de la tomate. Ces pratiques ont conduit à une réduction importante de la maladie au niveau des parcelles de culture. Les prospections réalisées durant cette étude ont montré la présence encore de cette maladie dans différents lieux de la wilaya de Mostaganem à une fréquence est plus ou moins faible. Elle ne dépasse pas le plus souvent les 5%. La persistance de cette maladie malgré les moyens de lutte mis en œuvre pourrait être expliquée par l'utilisation par certains agriculteurs des variétés de tomate sensibles à la maladie ou bien l'apparition chez l'agent pathogène de races très virulentes même pour les variétés de tomate résistante à certaines races de *Fusarium*. En effet le FOL est connu pour avoir plusieurs races (Race 1, race2 et race 3) qui sont capables d'exercer un pouvoir pathogène variable (Hibar et al., 2007). La majorité des formes spéciales du FOL appartiennent à la race 1 et race 2 auxquels plusieurs variétés de tomate résistante ont été sélectionnées, la race 3 est moins réponsus mais elle cause des dégâts considérables même chez les variétés résistantes. La différenciation entre les différentes races est très difficile et elle est basée surtout sur des études moléculaires (Kolak et Bicici, 2013). L'existence de nouvelles espèces de *Fusarium* qui provoquent les mêmes symptômes est possible. Hamini-kadar et al. (2010) ont isolé deux especes de *Fusarium* (*F.commune* et *F. redolens*) à partir de plantes de tomates qui présentent les symptômes de la fusariose de *F. oxysporum*. En plus la différenciation entre même les deux formes spéciales *lycopersici* et *radicis-lycopersici* est complexe et pose un problème dans le choix des méthodes de contrôle de cette maladie (Katan et al., 1997 et Gale et al., 2003).

Les étapes d'isolement dans le laboratoire ont permet d'isoler le champignon à partir de différentes parties de la plantes. La majorité des isolats caractéristiques ont été obtenus à

partir de la tige des plantes de tomates présentant des symptômes de flétrissement spécifiques à la fusariose. L'analyse de l'aspect morphologique des colonies a permis de montrer la présence de deux morphotypes principaux : un morphotype cotonneux à mycélium dense et un morphotype ras muqueux, la couleur est variable entre blanche et rose violacée. Cette diversité morphologique locale a été signalée par différents chercheurs. [Henni et al., \(1994\)](#) a signalé la présence de quatre morphotypes différents chez des *Fusarium oxysporum* isolées à partir des échantillons de tomates cultivées en Algérie. Ces mêmes résultats ont été confirmés plus tard par [Hamini \(2011\)](#) sur des prélèvements de tomate du pourtour méditerranéen. La pigmentation, blanche au rose, produite par les différents isolats est généralement spécifique des formes spéciales espèces du *F. oxysporum* ([Nelson et al. 1983](#), [Hibar et al., 2006](#)).

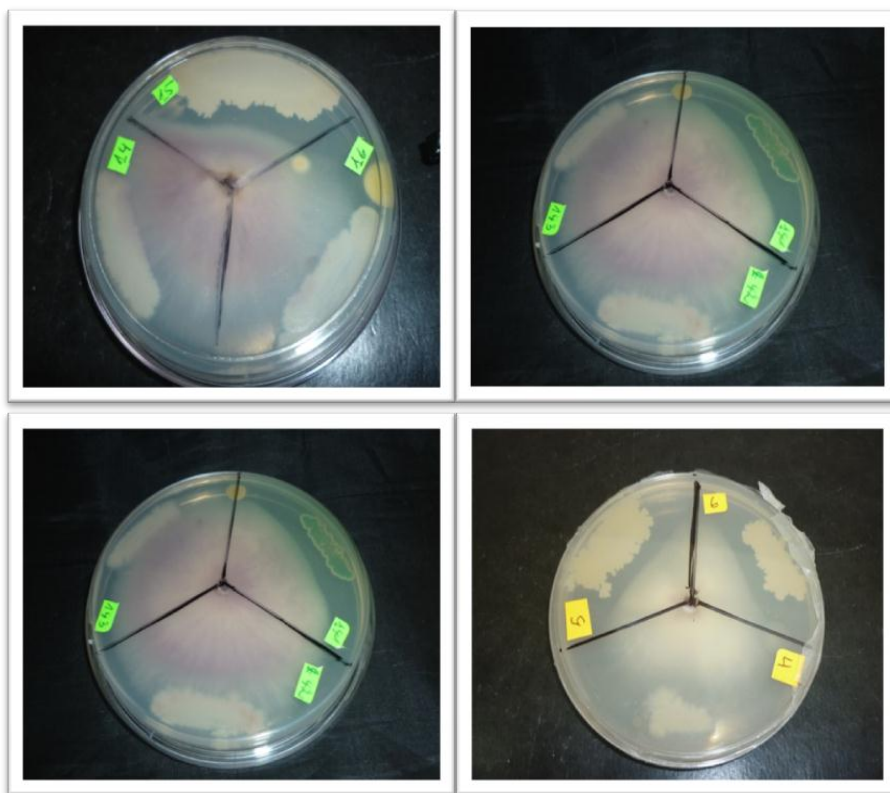
Les observations microscopiques ont permis de mettre en évidence la présence d'un mycélium cloisonné avec la présence de deux catégories de conidies : des microconidies en nombre plus ou moins supérieure à des macroconidies. La présence de ces deux types de spore est considérée le plus souvent parmi les caractéristiques principales pour l'identification des *F. oxysporum* ([Rozlianah et Sariah, 2006](#) ; [Ignjatov et al., 2012](#)). La présence ou l'absence des chlamydospores peut être un moyen de plus dans l'identification des espèces des *Fusarium oxysporum* mais ils restent moins déterminants que les critères précédents, [Henni et al. \(1994\)](#) rapportent que certains morphotypes de F.O.L sont caractérisés par l'absence de la capacité de former des chlamydospores ou parfois par une formation tardive de ces structures.

Le FOL est champignon anamorphe qui comprend des souches pathogènes et des souches non pathogènes. La différenciation entre les deux formes par l'étude des caractéristiques morphologiques et microscopiques des colonies est difficile ([Bao et al., 2002](#), [Rozlianah et al., 2006](#)). Les essais de la pathogénie sur la plante spécifique (principe de Koch) reste le seul moyen pour évaluer l'action nocive des souches. L'activité pathogène des souches isolées a été évaluée par la détermination de l'indice d'altération foliaire, la majorité des isolats ont montré des IAF plus ou moins faibles en comparaison à l'activité de la souche de référence, seuls les souches FO1 et FO2 ont montré des IAF plus ou moins élevés. Cette différence dans la virulence pourrait être expliquée aussi bien par la différence de la sensibilité de la variété de la plante aux différents isolats ([Edel et al., 1997](#)) ainsi que la présence d'une virulence variable entre les races qui composent généralement le FOL. Selon [Armstrong et Armstrong \(1981\)](#), les formes spéciales du FOL sont subdivisées en races sur la base de leur virulence vis-à-vis des cultivars hôtes.

### VI.3. Etude de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats bactériens vis-à-vis de *F. oxysporum f. sp lycopersici*

L'ensemble des isolats obtenus à partir des différents échantillons (109 isolats) ont été testés pour leur capacité à réduire la croissance mycélienne de *F. oxysporum f. sp lycopersici* (FOL). Une confrontation multiple avec l'agent pathogène (3 isolats bactériens / boîte) a été réalisée (Fig. VI.10). Les résultats obtenus dévoilent que 54,12 % (soit 59 isolats/109) ont montré une activité antagoniste variable vis-à-vis de l'agent pathogène parmi lesquelles, 23.85% sont des bactéries isolées à partir de l'ectorrhizosphère, 16.51% et 13.76% des isolats appartiennent respectivement aux groupes des endophytes et des épiphytes. L'étude de l'effet du milieu d'isolement sur l'activité inhibitrice n'a montré aucune influence sur la variabilité de l'activité antagoniste des différents isolats.

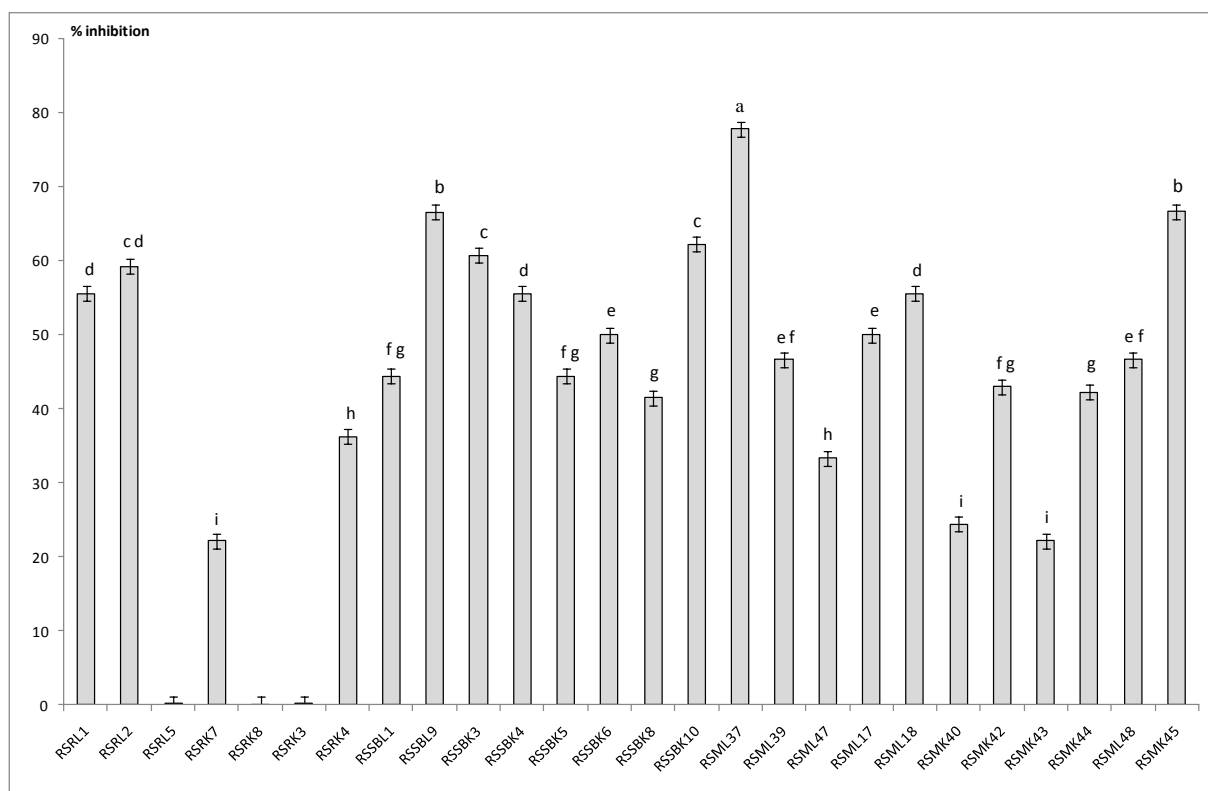
A la suite de ces résultats, une estimation individuelle de la capacité des souches à inhiber la croissance de l'agent pathogène a été entreprise par la culture de chacun des isolats séparément en confrontation avec l'agent pathogène.



**Figure VI.10.** Résultats des tests de confrontation directs préliminaire pour la sélection des isolats inhibiteurs de la croissance de *FOL* (trois isolats bactériens différents par boîte).

### VI.3.1. Activité antagoniste des rhizobactéries isolées à partir de l'ectorrhizosphère

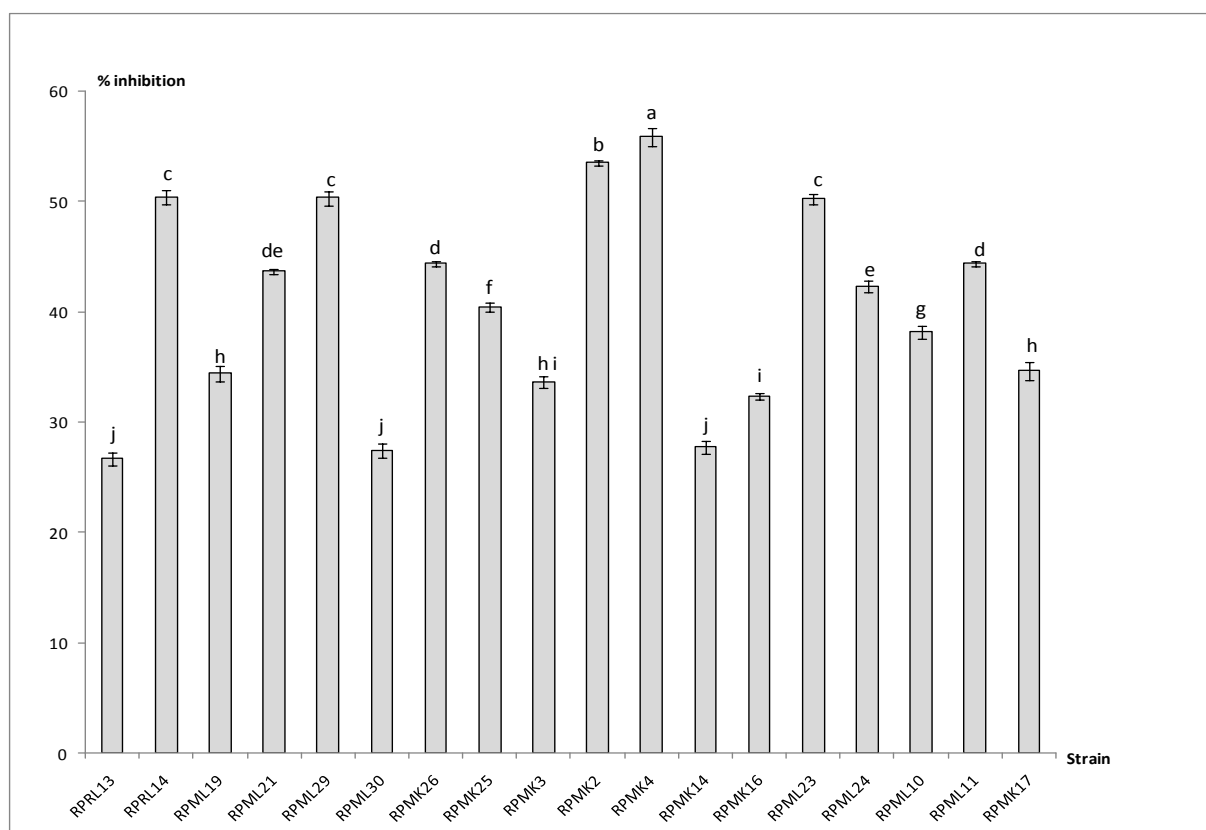
Le test de confrontation directe entre les différents isolats et l'agent pathogène (*Fusarium oxysporum* fsp *lycopersici*) a montré que 51% des souches isolées de l'ectorrhizosphère sont en mesure de réduire la croissance de l'agent pathogène. Cette réduction est traduite par la formation de zones d'inhibition variable en fonction des différentes souches. L'analyse statistique des résultats par le test ANOVA (Annexe III, Tableau VI.1) confirme que la nature de la souche a un effet hautement significatif ( $p < 0,05$ ) sur l'activité antagoniste vis-à-vis de *F. oxysporum* f.sp *lycopersici*. Les résultats présentés par la figure VI.11 montrent que la majorité des souches ont réduit la croissance radiale de *FOL* avec des taux supérieures à 30%. Le taux le plus élevé (77,78%) a été enregistré en présence de la souche RSML37, par contre, les souches RSMK45, RSSBL1 et RSSBK3 ont montré des activités moins importantes de l'ordre de 66,67%, 66,67% et 66,56% respectivement. En revanche, trois souches, RSRK3, RSRL5 et RSRK8 ont montré des activités négligeables de l'ordre de 10%, 0,23% et 0,1% respectivement malgré que, ces dernières ont manifesté des zones d'inhibition importantes dans le test préliminaire.



**Figure VI.11.** Pourcentages d'inhibition de la croissance de *FOL* par les isolats bactériens isolés à partir de l'ectorrhizosphère.

### VI.3.2. Activité antagoniste des rhizobactéries isolées à partir de la rhizoplane

La figure VI.12 présente les effets antagonistes des souches sélectionnées parmi les isolats de la rhizoplane. Il ressort que la majorité des souches présentent des pourcentages d'inhibition plus ou moins élevés (>30%). Les souches RPMK4 et RPMK3 présentent des taux d'inhibition les plus élevés soit 55,89% et 53,56% respectivement. Les souches RPRL13, RPML30 et RPMK14 exercent des effets antagonistes moins marqués que les deux souches pré-citées avec des taux d'inhibition de 26,67%, 27,78% et 27,78% respectivement. Le milieu d'isolement (LB ou King B) semble ne pas avoir d'influence sur la performance des souches sélectionnées; si les deux souches les plus performantes (RPMK3 et RPMK4) ont été isolées sur le milieu King B, une majorité de souches montrant une activité antagoniste a été isolé sur le milieu LB (10 souches parmi 18 souches). L'analyse statistique (ANOVA) ([Annexe III, Tableau VI.2](#)) des résultats obtenus montre que la nature de la souche a un effet hautement significatif ( $p < 0.05$ ) sur le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale du *F.O.L.*

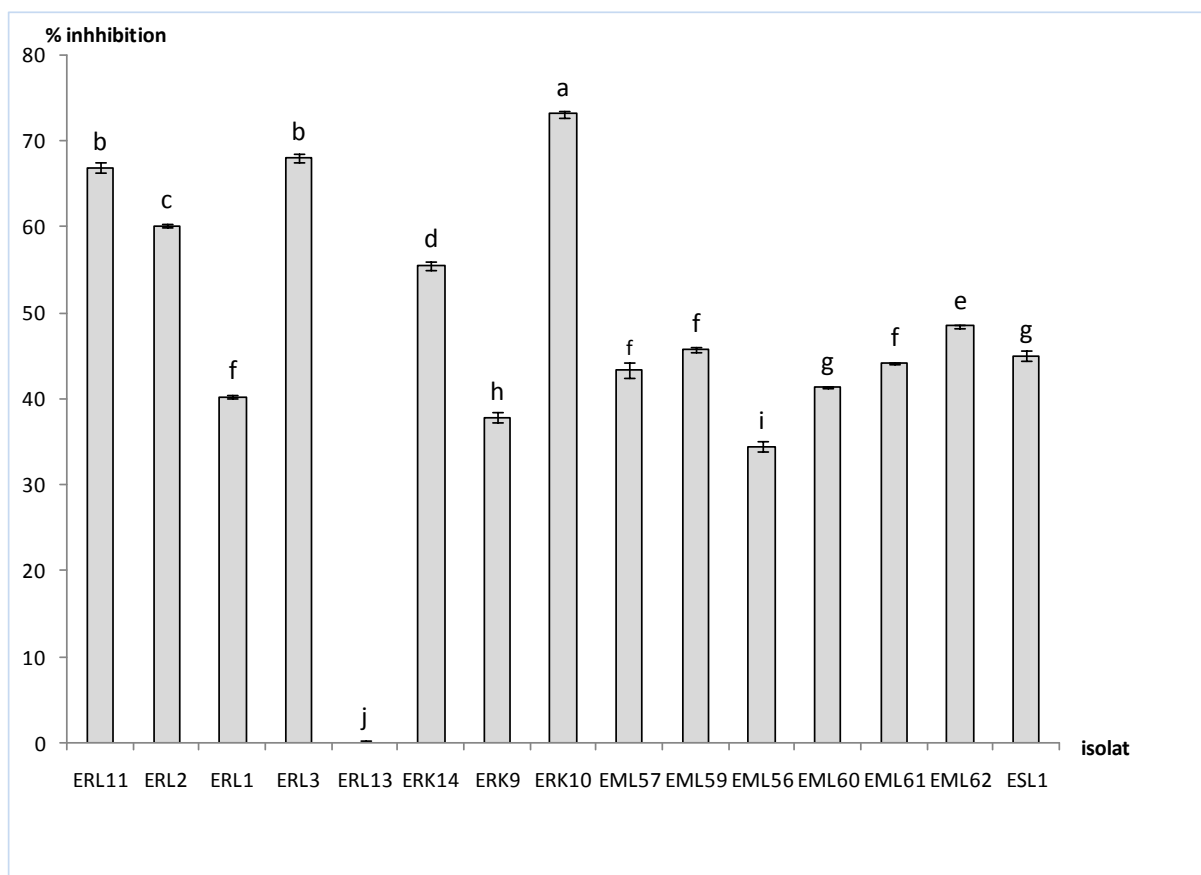


**Figure VI.12.** Pourcentages d'inhibition de la croissance de *FOL* par des isolats bactériens isolés à partir de la rhizoplane.

### VI.3.3. Activité antagoniste des rhizobactéries (endophytes) isolées à partir des tissus internes des racines

Les résultats des taux d'inhibition de la croissance de *FOL* par les souches rhizobactériennes endophytes sont illustrés par la figure VI.13.

L'analyse de ces résultats montre que plus de 78% des isolats (soit 15 souches /19) sont capables de réduire la croissance radiale de l'agent pathogène avec des taux variables d'une souche à l'autre. L'analyse statistique de ces résultats démontre que ces taux d'inhibition sont dépendants de la nature de la souche ( $P < 0.05$ ) (Annexe III, Tableau VI.3). Un taux maximal d'inhibition de 73.11% a été enregistré par la souche endophyte ERK10 isolée sur milieu LB, suivi par des taux inhibition équivalents à 68.89 % et 68% obtenus par les isolats ERL3 et ERL11 (Fig. VI.13). La majorité des souches performantes (17/19) sont des bactéries à coloration Gram positif isolées sur milieu LB appartenant fort probablement au genre *Bacillus*. La souche ERL13 est la seule, qui a manifesté un taux d'inhibition faible malgré que, dans la première étape de sélection, elle était parmi les souches performantes.

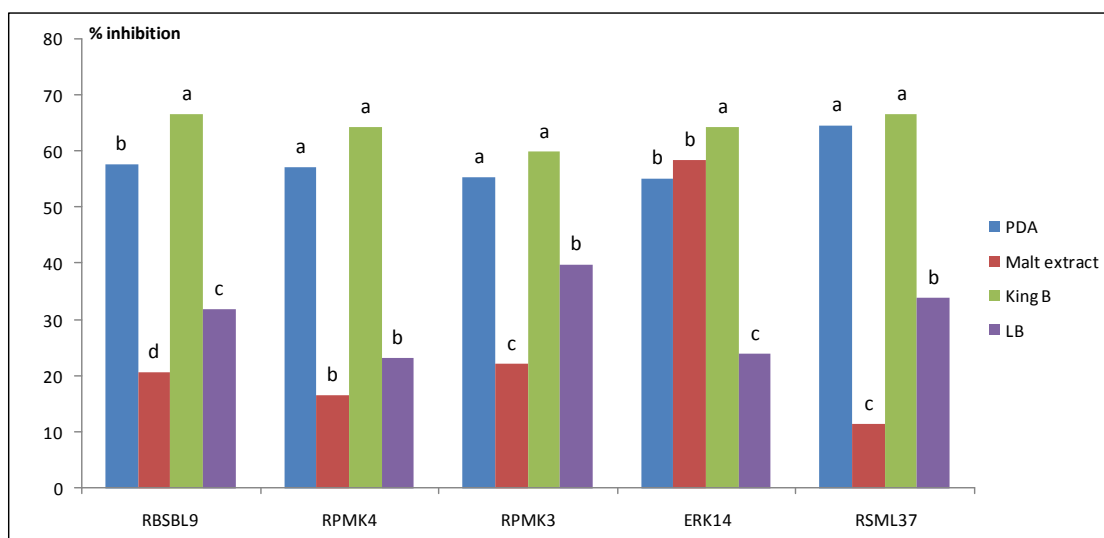


**Figure VI.13.** Pourcentages d'inhibition de la croissance de *FOL* par les isolats bactériens endophytes isolés à partir des tissus internes des racines

### VI.3.4. Effet du milieu de culture sur l'activité antagoniste

Pour déterminer l'effet du milieu de culture sur l'activité antagoniste des isolats microbiens, quatre milieux de culture (LB, King B, PDA et Gélose nutritive à base d'extrait de malt) ont été testés par des tests de confrontation directe. Cinq souches choisies au hasard ont été cultivé simultanément avec l'agent pathogène *FOL* sur les quatre milieux. Les résultats présentés dans la figure VI.14 indiquent que l'activité antagoniste de chacune des souches varie d'un milieu à l'autre et que la culture simultanée de l'agent antagoniste et l'agent pathogène sur le milieu de culture King B attribue les taux d'inhibition de croissance les plus élevés par rapport à l'ensemble des milieux testés, suivi par le milieu PDA. L'analyse statistique des ces résultats indique qu'il n'existe aucune différence significative entre le milieu de culture King B et le PDA pour la majorité des isolats (3/5) (Fig. VI.14).

Le milieu à base d'extrait de malt s'est montré le moins favorable avec des taux d'inhibition plus ou moins faibles.

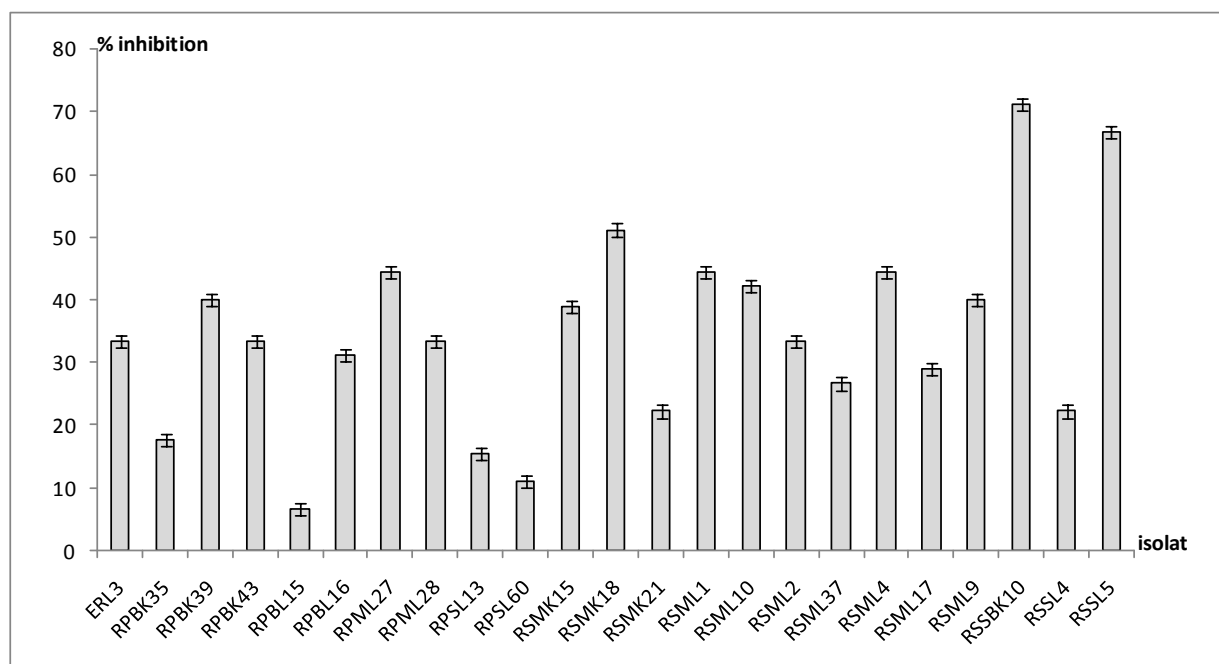


**Figure VI.14.** Effet du milieu de culture sur l'activité antagoniste des isolats bactériens vis-à-vis du *FOL*.

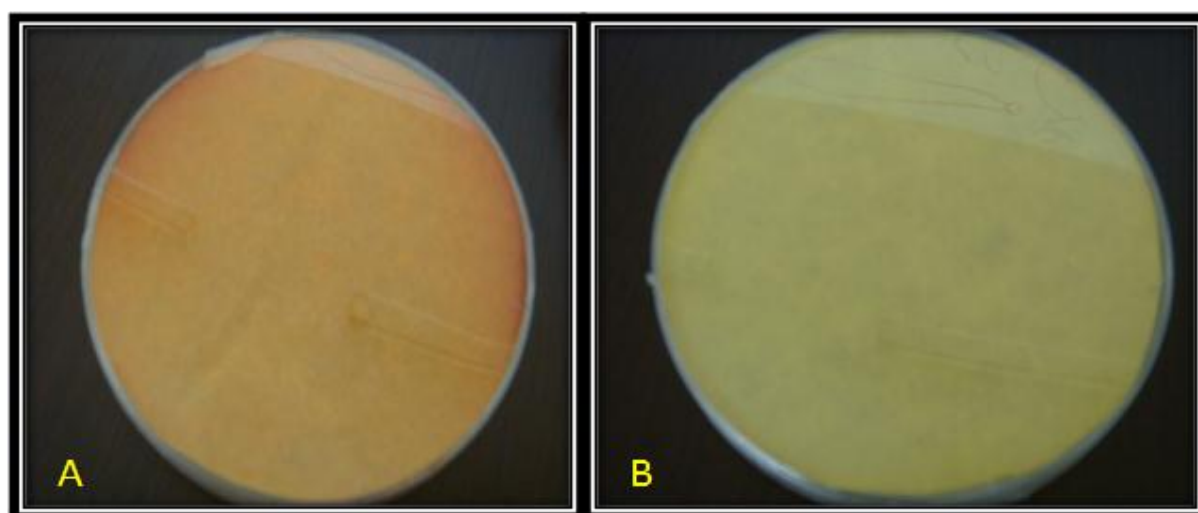
### **VI.3.5. Inhibition par les substances volatiles et production de l'acide cyanidrique (HCN)**

L'activité antagoniste des bactéries du sol peut être expliquée soit par la capacité de ces microorganismes à produire des substances diffusibles dans le milieu naturel ou artificiel ou par la production de substances volatiles à pouvoir inhibiteur. La recherche d'une activité antagoniste due à la production de substances volatiles a été entreprise dans cette partie. La figure VI.15 présente les résultats de l'activité inhibitrice des différentes souches bactériennes par la production de substances volatiles. Cette activité a été enregistrée chez 38.98% des isolats antagonistes testés, soit (21 souches sur 59) dont 56.52% proviennent de la partie ecto-rhizosphériques, 39.13% des bactéries obtenues à partir de la surface des racines et 4.35% isolées à partir de l'endosphère. Un taux d'inhibition variable en fonction de la nature de la souche a été détecté. La souche RSSK10 et la souche RSSL5 ont présenté un taux maximal d'inhibition avoisinant les 71.11% et 66.66% respectivement tandis que, la souche RMSK18 a montré un taux d'inhibition moins important par rapport aux autres isolats (51.11%).

La nature des substances volatiles est variable et l'acide cyanhydrique est considéré comme un agent principal dans l'inhibition de la croissance des microorganismes par la voie des substances volatiles. Le virement de la couleur jaune de l'acide picrique vers le brun (Fig. VI.16), synonyme de la présence de l'acide cyanhydrique, a été observé chez 9 souches dont, une (01) appartient au groupe des endophytes, 06 isolats rhizosphériques et deux souches isolées de la rhizoplane. L'intensité de la couleur est variable, elle varie entre la couleur jaune jusqu'au rouge brique en passant par l'orange. Cette variation témoigne de la quantité de l'acide cyanidrique produite par chacune des cellules microbiennes testées.



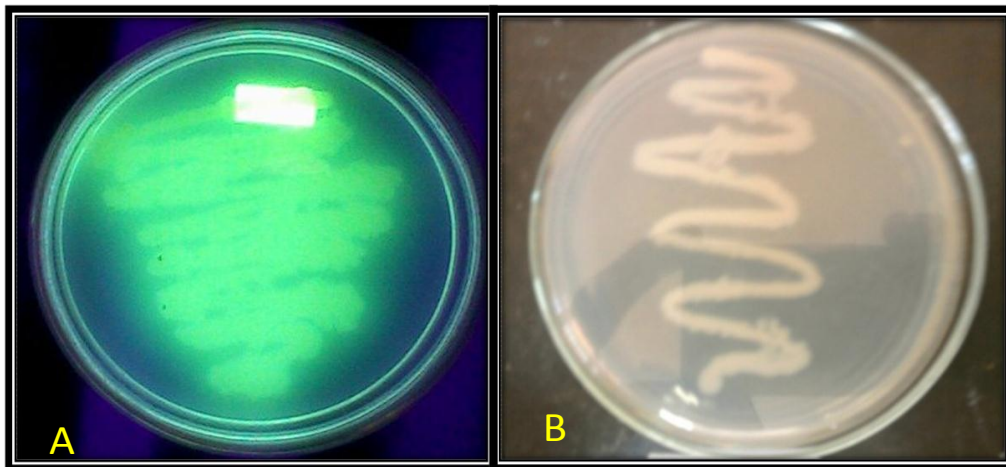
**Figure VI.15.** Effet des substances volatiles produites par les isolats inhibiteurs de la croissance de *FOL*.



**Figure VI.16.** Mise en évidence de la production de l'acide cyanidrique (HCN)  
(A : production positive B : boîte témoin (Production négative))

### VI.3.6. Production des sidérophores (Pyoverdines)

Les sidérophores sont des molécules à faibles poids moléculaires ayant une grande affinité pour le fer. La production de ces métabolites par certains microorganismes de la rhizosphère leur confère un grand pouvoir de compétition par rapport aux microorganismes non producteurs. La Pyoverdine, un pigment fluorescent jaune-verdâtre, est un composant majeur des différents types de sidérophores, il est parfois utilisé pour la mise en évidence de la capacité de production des sidérophores en général chez les microorganismes (Teintze et al., 1981; Yasmina et al., 2009 ; Alemu, 2013) (Fig. VI.17). La production de ces pigments jaunes verdâtres a été détectée chez 22 % des souches testées, parmi lesquelles 12 souches ont été isolées à partir de zone externe de la rhizosphère (ectorhizosphère), 10 souches parmi les isolats épiphytes et une seule souche appartenant aux groupes des endophytes. La pigmentation est apparue plutôt sur les milieux séquestrés de fer que sur les milieux enrichis par le fer. Selon les tests d'identification réalisées dans la première partie de cette étude, il s'est avéré que l'ensemble des isolats producteurs de pyoverdine appartiennent au groupe des *Pseudomonas*.



**Figure VI.17.** Production de la pyoverdine (sidérophore) par les différents isolats  
(A : croissance en absence de  $\text{FeCl}_3$  ; B : Croissance en présence de  $\text{FeCl}_3$ )

### VI.3.7. Activités enzymatiques lytiques des isolats rhizobactériens

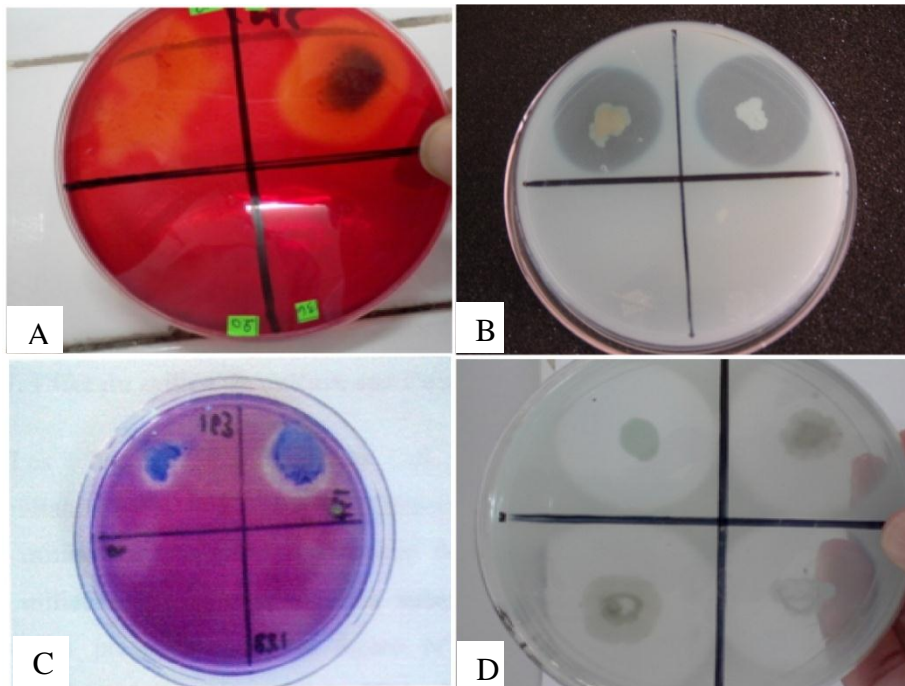
L'activité antagoniste des rhizobactéries peut également être due à la production d'enzymes dégradant la paroi cellulaire des autres microorganismes comme la cellulase, la pectinase, la chitinase ou la protéase. D'autres activités enzymatiques peuvent être présentes mais qui sont plutôt impliqués dans la dégradation de molécules complexes telle que la protéase et les lipases.

Dans le de notre étude, différentes activités enzymatiques ont été détectées chez les souches antagonistes. Des activités protéolytiques et lipolytiques (Fig. 18 B et C) ont été détectées chez une grande partie des isolats (Fig. VI.19). La protéase a été détectée chez 68% des souches antagonistes testées suivi par l'activité lipolytique chez 58% des isolats testés. La répartition de ces activités parmi les trois catégories de bactéries est plus ou moins identique avec une légère prédominance de la protéase chez les bactéries isolées à partir des tissus internes des plantes (Fig. VI.19).

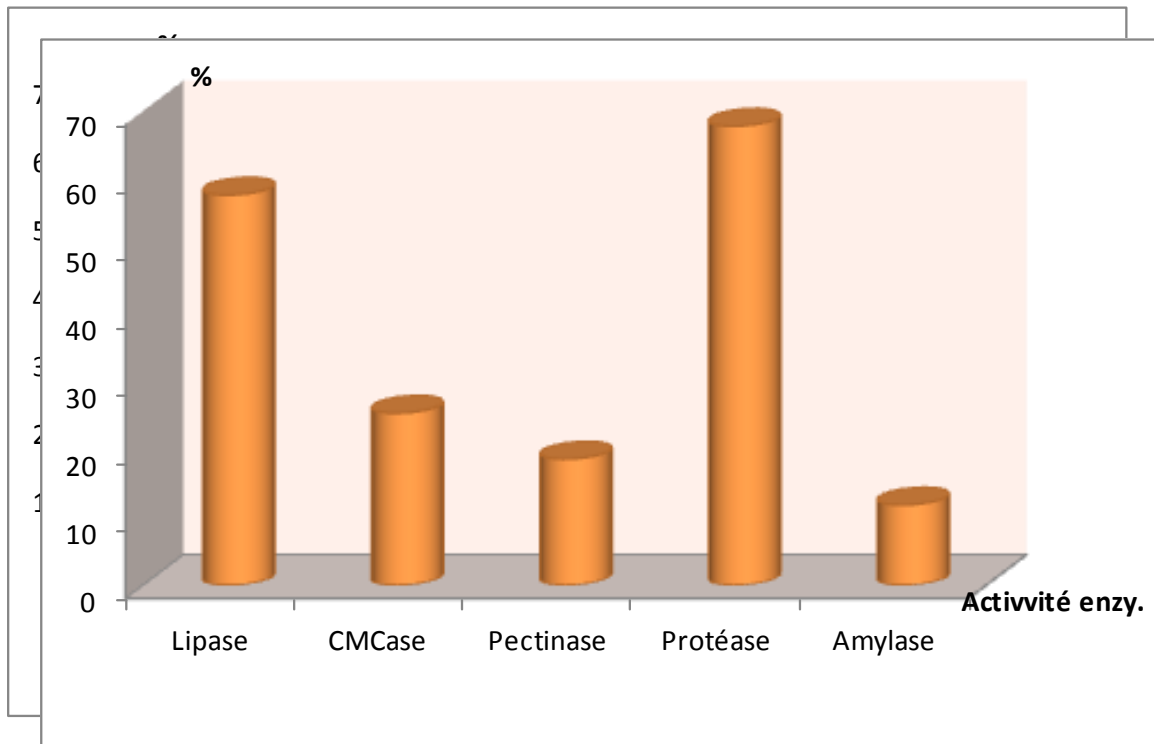
La CMCase La pectinase (Fig. 18 A et B) et l'amylase sont moins présentes chez les différentes souches microbiennes. La CMCase a été détectée seulement chez 25% des isolats alors que la pectinase et l'amylase n'ont été mis en évidence que seulement chez 19 et 12% des isolats. La CMCase et la pectinase sont dominantes chez les bactéries isolées à partir de la rhizoplane, tandis que l'amylase était beaucoup plus présente chez les bactéries isolées du sol rhizosphériques (Fig. VI.20).

La concordance entre l'importance des activités enzymatiques et les taux d'inhibition est plus ou moins faible. Les tableaux VI.3, 4 et 5 indiquent qu'aucune des enzymes n'est privilégiée pour expliquer le taux d'inhibition d'une souche donnée. Néanmoins, Il a été parfois noté qu'un nombre de souches sont capables d'une part de produire plusieurs enzymes à la fois et en même temps ils présentent un taux d'inhibition élevé, le cas des RSSBK3, RPMK26, RPMK4 et ERK9 (Tableau VI.6, VI.7 et VI.8). D'autres souches n'ont montré qu'une faible activité enzymatique par la production d'un nombre réduit d'enzymes malgré qu'elles ont exhibé une activité inhibitrice élevée vis-à-vis de la croissance du *FOL*.

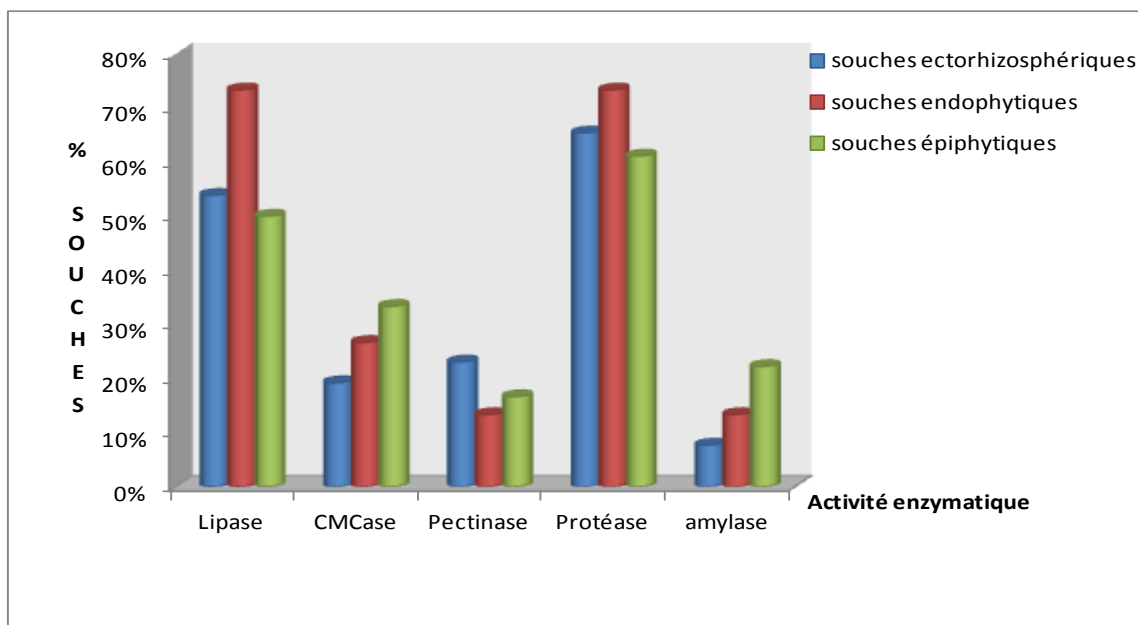
Ces résultats confirment bien que le pouvoir d'inhibition de l'agent pathogène *FOL* n'est pas concrètement corrélé avec l'augmentation de l'activité enzymatique globale. Ce qui laisse à supposer que cette activité inhibitrice peut être dû soit à l'effet synergique de plusieurs substances produites par l'agent pathogènes ou même parfois à une seule substance douée d'une activité anti - microbienne ou activité hydrolytique importante.



**Figure VI.18.** Mise en évidence de l'activité enzymatique chez les différents isolats après culture sur milieux gélosés spécifiques (A : CMCCase ; B : Protéase ; C : Pectinase : D : Lipase).



**Figure VI.19.** Répartition des activités enzymatiques parmi les souches microbiennes isolées à partir de différents sites de la rhizosphère des plantes de tomates.



**Figure VI.20.** Répartition des différentes activités enzymatiques par rapport aux origines des souches microbiennes.

**Tableau VI.3.** Concordance entre l'Activité hydrolytiques et l'activité inhibitrice des différentes souches microbiennes isolées à partir de l'ectorhizosphere des racines de tomates.

Isolat	Lipase	CMCase	Pectinase	Protéase	amylase	%
RSRL1	-	-	+	-	+	55,56
RSRL2	+	-	+	++	-	44,44
RSRL5						0,00
RSRK7	+	+	-	++	-	44,44
RSRK8	+	+		++	-	0,00
RSRK3	+	-	-	+++	-	0,00
RSRK4	+	-	+	+++	-	44,44
RSSBL1	+	-	+	-	-	44,44
RSSBL9	-	-	-	-	-	66,67
RSSBK3	-	-	+	++++	+	66,67
RSSBK4	+	-	-	++++	-	55,56
RSSBK5						44,44
RSSBK6	-	+	-	+++	-	50,00
RSSBK8	+	+	-	+++	-	44,44
RSSBK10	+	-	-	++++	-	62,22
RSML37	+	-	-	++	-	77,78
RSML39	+	-	+	+++	-	46,67
RSML47	-	-	-	-	-	33,33
RSML17	-	-	+	++	-	50,00
RSML18	+	+	-	+	-	55,56
RSMK40	+	-	-	++	-	24,44
RSMK42	-	-	-	++++	-	44,44
RSMK43	+	-	-	+++	-	44,44
RSMK44	-	-	-	-	-	42,22
RSML48	-	-	-	-	-	46,67
RSMK45	-	-	-	-	-	66,67

**Tableau VI.4.** Concordance entre l'activité hydrolytiques et l'activité inhibitrices des différentes souches microbiennes isolées à partir de la rhizoplane des racines de tomates.

isolat	Lipase	CMCase	Pectinase	Protéase	amylase	%
RPRL13	+	+	-	++	-	26,67
RPRL14	+	-	-	+	-	51,11
RPML19	-	+	-	-	-	44,44
RPML21	-	-	-	+	-	44,44
RPML29	+	-	-	+	-	50,00
RPML30	-	+	+	+	-	27,78
RPMK26	+	+	+	++	+	44,44
RPMK25	-	-	-	-	-	44,44
RPMK2	+	-	-	++++	-	55,56
RPMK3	-	-	-	-	-	33,33
RPMK4	+	+	-	++++	+	55,56
RPMK14	+	+	+	+++	-	27,78
RPMK16	-	-	-	-	-	33,33
RPML23	-	-	-	-	-	49,93
RPML24	-	-	-	+++	+	43,33
RPML10	+	-	-	+++	+	38,89
RPML11	+	-	-	-	-	44,44
RPMK17	-	-	-	-	-	33,33

**Tableau VI.5.**Concordance entre l'activité enzymatiques hydrolytiques et l'activité inhibitrices des différentes souches microbiennes isolées à partir de l'endorhizosphère des racines de tomates.

Isolat	Lipase	CMCase	Pectinase	Protéase	Amylase	%
ERL11	-	-	-	-	-	66,67
ERL2	+	-	-	++++	+	60,33
ERL1						40,44
ERL3	+	-	+	++++	+	67,44
ERL13	+	+	-	+++	-	0,15
ERK14	-	-	-	+++	-	55,33
ERK9	+	+	+	+++	-	38,22
ERK10	+	-	-	+++	-	73,33
EML57	+	-	-	+++	-	44,44
EML59	-	-	-	-	-	45,33
EML56	+	-	-	++	-	34,44
EML60	+	-	-	+++	-	41,44
EML61	+	+	-	-	-	44,24
EML62	+	+	-	+++	-	48,67
ESL1	+	-	-	++	-	45,18

### VI. 3.8. Discussion

Les rhizobactéries promotrices de la croissance de plantes (PGPR), tels que les espèces du *Pseudomonas* et *Bacillus*, sont les principaux colonisateurs des racines de différentes espèces végétales (Joseph et al, 2007 ; Manikanda et al, 2010). Leur rôle dans la lutte biologique contre les maladies cryptogamiques a été rapporté par plusieurs recherches (Amkraz et al., 2010 ; Dalal et Kulkarni, 2013 ). Différents mécanismes ont été signalés pour expliquer leur performance. La production d'antibiotiques, des sidérophore, des substances volatiles tel que le cyanure d'hydrogène, l'induction de résistance systémique chez les plantes et l'inactivation des agents pathogènes par la production d'enzymes lytiques sont autant de mécanismes impliqués dans l'activité antagonistes de ces rhizobactéries (Liu et al., 1995; Sadfi et al. 2001, Ruchi et al., 2012).

Durant cette étude, 109 souches ont été isolées à partir des échantillons du sol et des racines des plantes prélevés de différents champs de culture de tomate dans la wilaya de Mostaganem (Nord-Ouest, Algérie). La mise en évidence de leur activité antagoniste contre l'agent de la fusariose de la tomate (FOL) a été réalisé *in vitro* par la technique de confrontation directe (dual assay) dans des boites de Petri contenant un milieu gélosé (PDA).

Plus de 54% (59/109) des souches testées se sont apparues séparées de la colonie fongique par une zone claire de diamètre plus ou moins variable selon la souche testée. La présence de ces zones claires autour des colonies bactériennes traduit la capacité des agents antagonistes à la production de substances diffusibles qui limitent la croissance mycélienne de l'agent pathogène. Selon Nourozian et al. (2006), la formation de zones d'inhibition entre l'agent pathogène et la bactérie antagoniste dans le test de confrontation est du vraisemblablement à la production et à la diffusion dans le milieu de culture de substances douées d'une activité antimicrobienne produites par les agents antagonistes. De plus, l'utilisation de milieux riches en éléments nutritifs (PDA dans notre cas) exclut la possibilité de l'apparition de cette zone dû à un phénomène de compétition pour les nutriments (Ahmed Idriss et al., 2007).

Le taux d'inhibition de la croissance de l'agent pathogène a été calculé pour l'ensemble des bactéries par rapport à une culture témoin de l'agent pathogène (FOL) selon la méthode décrite par whipps (1987). Les résultats obtenus montrent que le taux d'inhibition varie de 31% à 78%. Cette variabilité est due probablement aussi bien à la concentration de la substance diffusible produite de l'isolat antagoniste (Landa et al., 1997) qu'à la nature de cette substance (Williams et Asher, 1996). En effet la production d'antibiotiques est largement répandue chez les bactéries de la rhizosphère des plantes (Raaijmakers et al . 2002). Les

bactéries appartenant principalement aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont capables de produire une multitude d'antibiotiques inhibant ainsi différents types de microorganismes (Weller, 1988 ; Whipps, 2001).

La position du site de prélèvement par rapport aux racines de la plante ne semble pas avoir un effet déterminant dans l'importance du taux d'inhibition exercé par les agents antagonistes. Des taux d'inhibition élevés ont été obtenus aussi bien par des souches isolées à partir de l'ectorrhizosphère qu'à partir de souches isolées de la rhizoplane ou des tissus internes des racines (Fig. VI. 2,3 et 4). Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux accomplis sur des souches microbiennes appartenant à des sites différents de la rhizosphère. Muleta *et al.*, (2013) rapportent que des taux d'inhibition variant de 37.5% à 73.6 ont été obtenus par des souches isolées de la rhizosphère du café testées vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*. De même, des souches de *Bacillus* isolées à partir de la rhizosphère de tomate ont présenté une activité inhibitrice équivalente à 51.16% (Karimi *et al.*, 2012). Lahlali *et al.* (2007) rapportent aussi que des bactéries endophytes appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* étaient capables de réduire *in vitro* la croissance de *Rhizoctonia solani* avec un taux équivalent à 71.66%.

En plus de l'antibiose, il existe d'autres mécanismes par lesquels les rhizobactéries sont capables de réduire la croissance des agents pathogènes. La production de substances de nature volatiles peut être considérée parmi ces mécanismes (Voisard *et al.*, 1989). Selon Kai *et al.* (2007) plus de 200 composées organiques volatiles, produits par les bactéries et les moisissures ont été identifiés. La majorité de ces molécules sont impliquées dans des interactions multiples et exercent un effet antimicrobien ou modulateur sur la croissance des microorganismes et des plantes. Cette activité a été détectée chez plus de 39% des isolats testés, avec des taux d'inhibition de l'agent pathogène variant entre 7% et 71%.

Une mise en évidence de la nature des substances volatiles impliquées dans l'inhibition du *FOL* a été entreprise par la recherche de la production de l'acide cyanidrique (HCN). La production de cette substance a été enregistré chez 15% des isolats antagonistes testés. Cette valeur est inférieure à celui rapporté par d'autres recherches puisqu'il est souvent rapporté que la production de HCN est présente chez un grand nombre (>50%) de bactéries de la rhizosphère (Bakker *et schippers*, 1987; Défago *et al.* 1990). L'absence de HCN chez les bactéries promotrices de la croissance des plantes peut être un caractère positif du fait de son effet négatif sur la croissance des plantes. Malgré que ce caractère est considérée par plusieurs auteurs comme un composant principal du groupe des substances volatiles responsables du contrôle de la croissance de plusieurs agents phytopathogènes (Blummer *et*

Haas, 2000 ; Ramette et al. 2003), d'autres avancent que des espèces de *Pseudomonas* peuvent ralentir la croissance des racines de pommes de terre à travers la production de HCN (Bakker et al., 1989; Agrawal et Agrawal, 2013).

Même si le rôle de la compétition pour l'espace ne peut être complètement exclu comme un mécanisme d'antagonisme chez les rhizobactéries, l'essentiel des travaux relatifs à la compétition porte sur la compétition trophique et, en particulier, sur la compétition pour le fer (Lemanceau, 1992). En raison de la faible biodisponibilité du fer dans l'environnement, les micro-organismes ont développé des stratégies d'absorption spécifiques comme la production de sidérophores. Les sidérophores sont des agents chélateurs de métaux ayant des masses moléculaires faibles (200-2000Da) produites par des micro-organismes et des plantes, en particulier dans des conditions de limitation du Fer (Schwyn et Neilands, 1987). L'implication de ces substances dans les mécanismes de contrôle biologique est largement rapporté (Ramyasmruthi et al. 2012; Bhakthavatchalu et al., 2013 ). Leur production a été détectée chez 22% de nos isolats testés. Leur présence a été enregistrée plutôt chez les souches qui colonisent la partie externe des racines de la plante (rhizoplane et ectorhizoplane). L'identification biochimique primaire des isolats producteurs a montré l'appartenance exclusive de ces isolats au genre *Pseudomonas*. Ces résultats sont en accord avec ceux de Mayor et Abdellah (1978) qui rapportent que les *Pseudomonas* fluorescents sont caractérisés par la production des pigments fluorescents sous les radiations UV considérés comme des sidérophores. Le non détection de germes producteurs de sidérophores parmi les bacilles gram positif pourrait s'expliquer par la spécificité de la méthode de recherche utilisée. D'ailleurs, la méthode adaptée pour nos essais est celle de Teintze et al. (1981) et Yasmin et al. (2009) basée sur la mise en évidence uniquement d'un seul type de sidérophores (les pyoverdines). Contrairement à nos résultats, plusieurs chercheurs confirment la capacité des bacilles à coloration Gram positif à produire les sidérophores par leur mise en évidence par des modifications de la technique de chromazurol (CAS) (Hu et Xu, 2011).

L'activité enzymatique des souches antagonistes a été également explorée pour déterminer une éventuelle corrélation entre le pouvoir inhibiteur des isolats et la nature des enzymes produits. Les activités protéolytiques et lipolytiques ont été détectées respectivement chez plus de 67% et 57% des isolats. Une légère prévalence de ces deux activités a été mise en évidence chez les isolats endophytes. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont montré que ces deux activités sont largement répandues chez les bactéries de la rhizosphère (Bakthavatchalu et al., 2012 ; Ruch et al., 2012)

L'importance de ces enzymes pour les souches productrices est appréciée différemment selon certains auteurs. [Yandri et al. \(2008\)](#) mentionne que la protéase est une enzyme qui dégrade les peptides en acides aminés de sorte qu'ils seront ensuite facilement utilisés par les microorganismes antagonistes. Selon [O'sullivan et al. \(1991\)](#), la présence de la protéase chez les microorganismes rhizosphériques contribue à l'amélioration de leur pouvoir de colonisation ainsi qu'à leur pouvoir antagoniste contre les agents pathogènes. Certaines protéases comme les élastases, les subtilisines et les pronases possèdent même des activités antimicrobiennes contre différentes bactéries à coloration Gram positif et Gram négatif ([Kaur et al., 1989](#)). Les lipases des bactéries promotrices de la croissance sont moins recherchées. Leur absence chez certaines *Pseudomonas* fluorescents est parfois liée à l'incapacité de ces germes à accumuler le polyhydroxybutirate ([Arwiyanto et al. 2007](#)). Les pectinases et les cellulases sont des enzymes qui sont impliqués directement dans la dégradation de certains composants de la paroi cellulaire des plantes et même de certaines moisissures comme les oomycètes ([Djuric et al., 2011](#)). Le parasitisme et/ou la lyse des champignons par les bactéries du sol peut être aussi facilité par la présence de ces deux enzymes. Les tests de la mise en évidence de la production de ces deux enzymes ont montré que 25% des isolats bactériens possèdent les cellulases et seulement 18% de la collection bactérienne testée produisent des pectinases. Une corrélation étroite entre la présence des enzymes lytiques et l'activité antagoniste par la voie de substances diffusibles des différents isolats n'a pas pu être démontré à partir des résultats de nos différentes expériences. Cela peut être expliqué par le fait que les mécanismes de contrôle chez les rhizobactéries ne sont pas dépendants l'un de l'autre et qu'un agent de bio contrôle peut agir par plus d'un mécanisme à la fois ([Alabouvette et al. 1993](#)).

## **VI.4. Etude des propriétés associées à l'action des isolats sur la promotion de la croissance de la plante tomate**

### **VI.4.1. Solubilisation des phosphates inorganiques**

Le phosphore est le deuxième élément important pour la croissance de la plante, il se trouve dans la nature sous forme organique ou inorganique. Sa disponibilité pour la plante est relativement faible à cause de sa fixation sous une forme insoluble par les éléments minéraux tels que le fer, le calcium ou l'aluminium. L'approvisionnement du sol par des formes solubles de phosphates à travers des moyens biologiques par la voie des bactéries ou champignons solubilisant le phosphate a été rapporté par plusieurs auteurs ([Whitelaw, 2000](#); [Khan et al., 2010](#)).

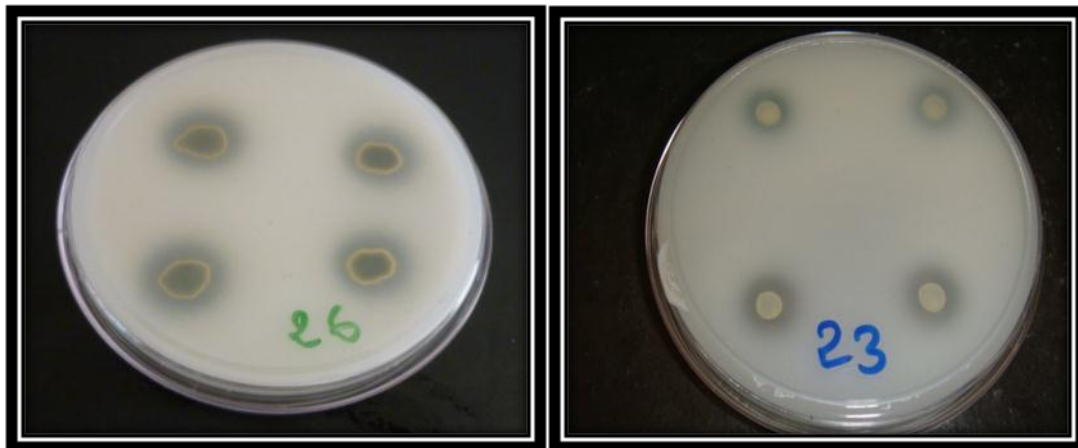
La mise en évidence de la solubilisation du phosphate inorganique par les souches isolées a été réalisée par détection visuelle sur le milieu gélosé PVK (Fig. VI.21). L'apparition d'une zone de solubilisation autour des colonies a été observée chez 41% des souches testées. Le diamètre de ces zones varie d'une souche à l'autre. Un paramètre appelé index de solubilisation a été retenu pour évaluer l'importance de cette solubilisation. Il mesure le rapport entre la zone de solubilisation et le diamètre de croissance de la colonie. Les résultats présentés dans les figures VI.22, 23 et 24 montrent que l'index de solubilisation des souches testées varie entre 0.43 et 3.44. Chez les souches isolées à partir de la rhizosphère, la majorité de ces dernières (11 sur 17) ont montré un index de solubilisation supérieure à 2.05 (Fig. VI.22). En revanche, une activité maximale équivalente à 3.34 a été obtenue par la souche RSML17, suivi par les souches RSPK7 et RSSBK3 avec des valeurs d'ISP égales à 3.31 et 3.19 respectivement. Alors qu'une valeur minimale d'ISP de 0.43 a été enregistrée par la souche RSML18.

De leur part, les souches isolées de la rhizoplane ont démontré une activité de solubilisation du phosphate tricalcium (PTC) moins importante que les souches rhizosphériques. C'est ainsi que 53% des ces souches présentent un index de solubilisation variant entre 1.93 à 2.99 avec un seul ISP maximal correspondant à 3.44 obtenu par la souche RPMK2 (Fig. VI.23). Des valeurs d'ISP plus ou moins faibles (< 1.22) ont été obtenues par 37% des souches. La souche RPML23 a produit une valeur d'ISP minimale de 0.73.

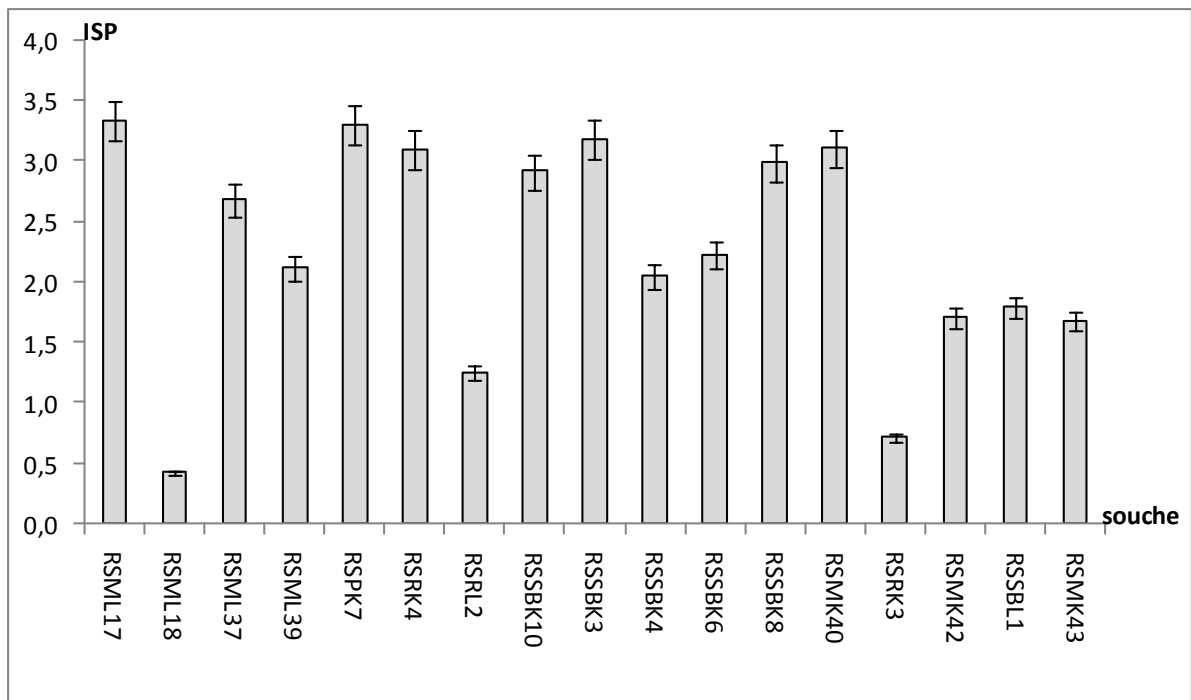
Dans la catégorie des isolats endophytes, l'activité de solubilisation des phosphates a été moins présente en nombre de souches par rapport aux deux autres catégories de souches. Seules 10 souches parmi le lot ont été capables d'utiliser le phosphate tricalcium (PTC) comme source de phosphate. Les valeurs d'ISP sont aussi plus ou moins inférieures aux précédentes valeurs des souches rhizosphériques et épiphytes vu que la majorité des souches

ont des valeurs d'ISP inférieures à 2.10 malgré que la souche ERK10 ait démontré une valeur d'ISP maximale de 3.44 (Fig. VI.24).

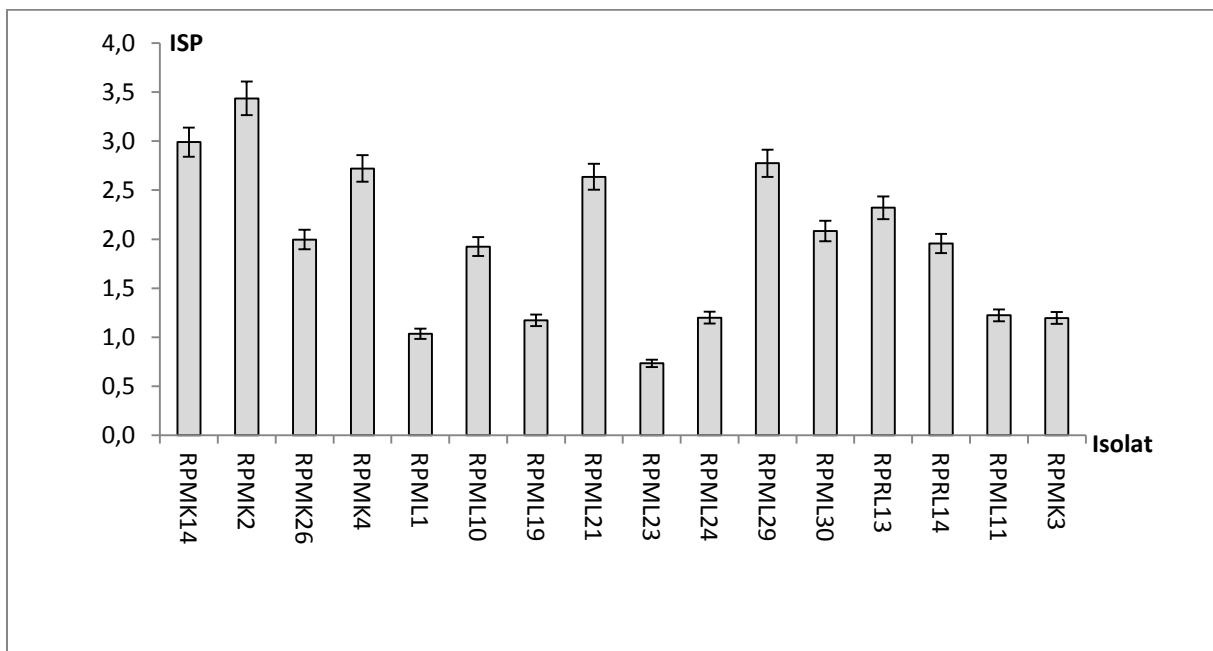
Plusieurs études rapportent que l'activité de solubilisation des phosphates est souvent variable en fonction du temps. Ce constat a été démontré par les tests réalisés *in vitro* par l'utilisation de durées d'incubation variables chez différents isolats de notre collection. Les résultats présentés dans la figure VI.25 montrent que l'ensemble des souches dévoilent une évolution positive par rapport à leur ISP en fonction du temps d'incubation. Une valeur maximale d'ISP de 2.71 a été obtenue par la souche RSMK43 au bout de 14 jours d'incubation suivie par la souche RPKM26 avec un ISP de 2.69 pour une durée équivalente d'incubation. Il est à noter que la souche RSSBK3 est la seule et l'unique souche qui a présenté une activité maximale (IS=2.49) au bout de 12 jours d'incubation.



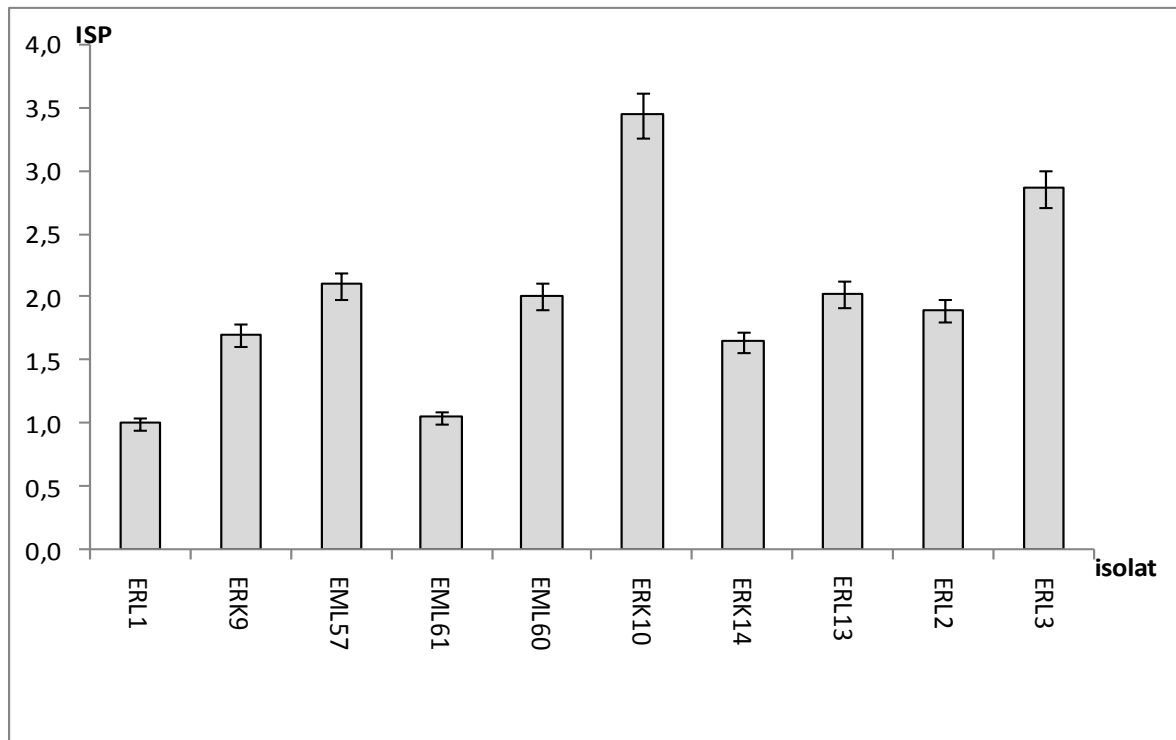
**Figure VI.21.** Halos de solubilisation du phosphate inorganique sur milieu PVK.



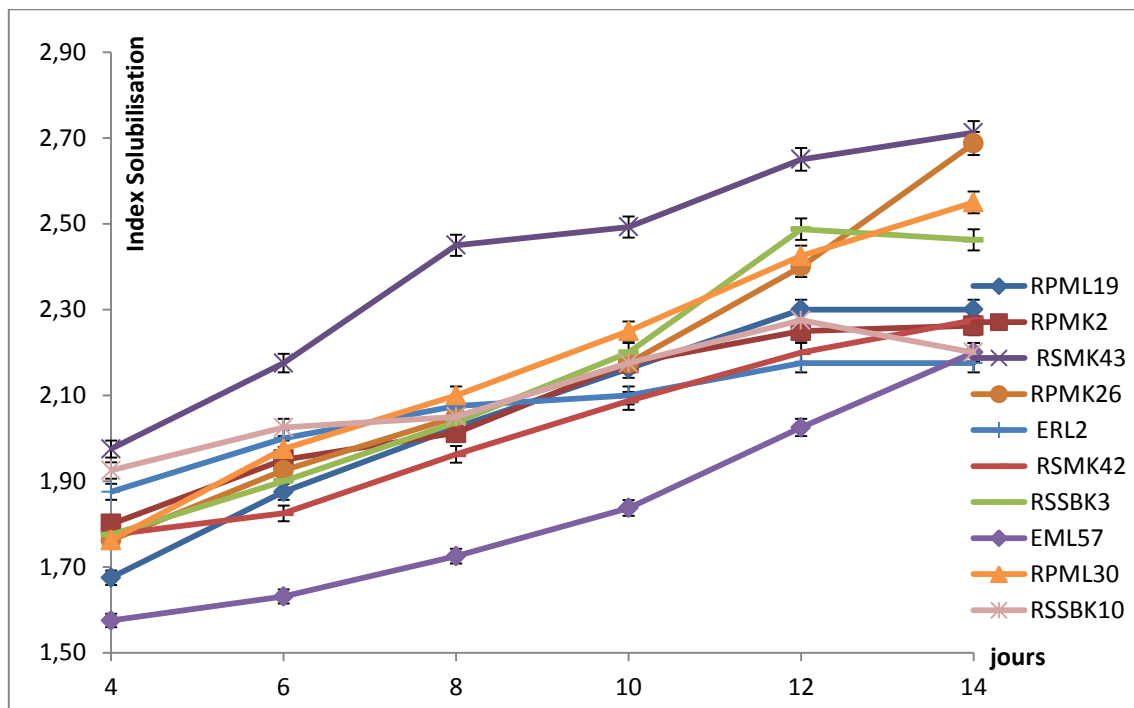
**Figure VI.22.** Index de solubilisation du phosphate chez les rhizobactéries isolées à partir de l'ectorrhizosphère.



**Figure VI.23.** Index de solubilisation du phosphate chez les rhizobactéries isolées à partir de la rhizoplane.



**Figure VI.24.** Index de solubilisation du phosphate chez les rhizobactéries isolées à partir de l'endorhizosphère.



**Figure VI.25.** Evolution de l'index de solubilisation chez certains isolats en fonction du temps d'incubation.

#### VI.4.2. Production d'acide indole acétique (AIA)

La mise en évidence de la production d'AIA a été réalisée chez les trois groupes de bactéries précédemment sélectionnées (appartenant aux trois sites différents de la rhizosphère des plantes de tomate) et présentant une activité antagoniste *in vitro* contre le *Fusarium oxysporum lycopersici* (FOL). Les tests ont montré que plus de 69% des souches testées sont capables de produire l'acide indole acétique en présence de tryptophane (10mg/ml). Parmi les souches productrices, 39% sont d'origine ectorhizosphérique, 36% proviennent de la rhizoplane alors que seulement 25% font partie de l'endorhizosphère. La quantité produite est variable d'un isolat à l'autre. La majorité des isolats ont ainsi produit des concentrations d'AIA supérieure à 20 µg/ml (Tableau VI.6). Chez les bactéries épiphytes (de la rhizoplane) les concentrations de l'AIA produit varient entre 19.67 µg/ml et 95.44 µg/ml. Les souches RPMK26 et RPML 24 ont produits des concentrations maximales équivalentes à 95,44 µg/ml et 94,5 µg/ml respectivement. La plus faible concentration (19,67µg/ml) a été synthétisée par la souche RPML10 (Tableau VI.6). Les quantités de l'AIA produites par les rhizosphériques sont globalement moins importantes que les isolats de la rhizoplane. Ces concentrations varient entre 19.79µg/ml produite par RSMK43 et 70.5µg/ml produite par RSSBK8 (Tableau VI.6). Contrairement aux deux catégories d'isolats précédentes, plus de 66% des isolats endophytes ont produit des quantités d'AIA ne dépassant pas 40µg/ml. Seule trois ont produit des concentrations supérieures à 50µg/ml. Une concentration maximale de 62.28µg/ml a été obtenue par la souche ERK10 (Tableau VI.6).

L'étude de la nature des isolats producteurs de l'AIA nous a permis de constater que l'importance des concentrations de l'acide indole acétique produites n'est pas dépendant de la nature taxonomique de l'agent producteur. C'est ainsi que des valeurs maximales d'AIA ont été obtenues à partir de souches microbiennes appartenant aussi bien au genre *Bacillus* qu'au genre *Pseudomonas*. La souche RPMK26 identifiée comme appartenant à l'espèce *B. circulans* a produit des concentrations d'AIA équivalente à 95.44 µg/ml de même que la souche RPML24 identifiée comme *Pseudomonas* sp a produit de même des concentrations égales à 94.5µg/ml (Tableau VI.6). Par contre, l'appartenance à un site d'isolement donné de la rhizosphère semble avoir une grande influence sur les quantités d'acide produites. Ceci est essentiellement traduit dans ce travail par les concentrations de l'AIA produites par les différentes souches isolées à partir de la surface des racines. Cette partie de la rhizosphère est caractérisée par des échanges intenses entre les microorganismes et les exsudats racinaires riches en éléments nutritifs qui favorisent les différentes voies métaboliques chez aussi bien la plante que les microorganismes.

La synthèse de l'AIA par les microorganismes est obtenue à travers plusieurs voies métaboliques. Certaines de ces voies sont dites voies dépendantes du tryptophane, d'autres sont non dépendantes du tryptophane (Patten et Glick, 1996). L'étude de la dépendance de la synthèse de l'AIA chez nos différents isolats a été réalisée par l'étude *in vitro* de l'effet de la concentration du tryptophane sur la production de l'AIA. Il ressort des différents résultats obtenus et illustrés par la figure VI.26 que la production de l'AIA est fortement dépendante de la concentration du tryptophane dans le milieu et ceci indépendamment de la nature de la souche testée ou du site du prélèvement.

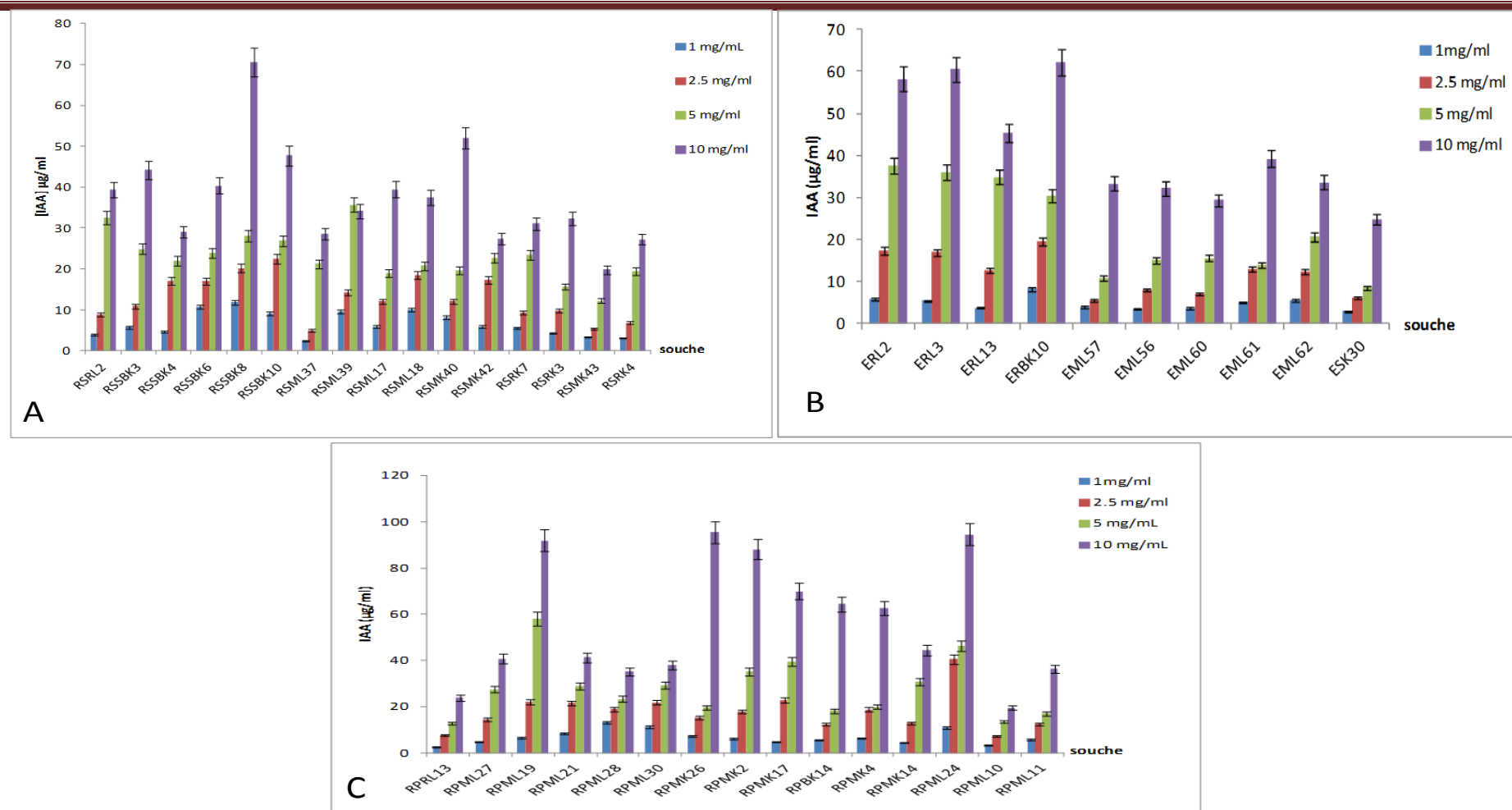
### **VI.4.3. Production de l'ammoniaque (NH<sub>3</sub>)**

La production de l'ammoniaque par les microorganismes de la rhizosphère est souvent recherchée comme un paramètre pour la sélection des bactéries promotrices de la croissance des plantes (Srivastava et al., 2014). Les résultats présentés dans le tableau VI.7 montre que l'ammoniaque a été détectée chez l'ensemble des souches testées.

**Tableau VI.6.** Production de l'indole acétique et l'ammoniaque par les différentes espèces des rhizobactéries isolées des trois sites de la rhizosphère de la tomate.

Souches rhizosphériques				Souches épiphytes				Souches endophytes			
Isolat	AIA (µg/ml)	NH <sub>3</sub>	Espèce	Souche	AIA (µg/ml)	NH <sub>3</sub>	Espèce	souche	IAA (µg/ml)	NH <sub>3</sub>	Espèce
<b>RPMK14</b>	44,5 <sup>f</sup>	+	<i>Pseudomonas sp</i>	<b>RSMK40</b>	51,94 <sup>c</sup>	+	<i>Pseudomonas sp</i>	<b>EML56</b>	32,14 <sup>g</sup>	+	<i>Pseudomonas sp</i>
<b>RPMK2</b>	88,17 <sup>d</sup>	+	<i>Pseudomonas sp</i>	<b>RSMK42</b>	27,47 <sup>k</sup>	+	<i>B. stearothermophilus</i>	<b>EML57</b>	33,33 <sup>fg</sup>	+	<i>Bacillus sp</i>
<b>RPMK26</b>	95,44 <sup>a</sup>	+	<i>B. circulans</i>	<b>RSMK43</b>	19,79 <sup>l</sup>	+	<i>P.aerogenosa</i>	<b>EML60</b>	29,39 <sup>h</sup>	+	<i>Pseudomonas sp</i>
<b>RPMK4</b>	62,64 <sup>c</sup>	+	<i>B. polymixa</i>	<b>RSML17</b>	39,42 <sup>f</sup>	+	<i>B. licheniformis</i>	<b>EML61</b>	39,22 <sup>e</sup>	+	<i>B. sphaerecus</i>
<b>RPML10</b>	19,67 <sup>l</sup>	+	<i>P. chlororaphis</i>	<b>RSML18</b>	37,58 <sup>g</sup>	+	<i>B. brevis</i>	<b>EML62</b>	33,67 <sup>f</sup>	+	<i>B. sphaerecus</i>
<b>RPML11</b>	36,36 <sup>j</sup>	+	<i>B. megaterium</i>	<b>RSML37</b>	28,56 <sup>ik</sup>	+	<i>B. stearothermophilus</i>	<b>ERK10</b>	62,28 <sup>a</sup>	+	<i>B. brevis</i>
<b>RPML19</b>	91,97 <sup>c</sup>	+	<i>B. licheniformis</i>	<b>RSML39</b>	34,14 <sup>h</sup>	+	<i>Pseudomonas sp</i>	<b>ERL13</b>	45,31 <sup>d</sup>	+	<i>Bacillus brevis</i>
<b>RPML21</b>	41,39 <sup>g</sup>	+	<i>Bacillus sp</i>	<b>RSRK3</b>	32,36 <sup>i</sup>	+	<i>B.subtilis</i>	<b>ERL2</b>	58,22 <sup>c</sup>	+	<i>P. chlororaphis</i>
<b>RPML24</b>	94,5 <sup>b</sup>	+	<i>Pseudomonas sp</i>	<b>RSRK4</b>	27,25 <sup>k</sup>	+	<i>P. putida</i>	<b>ERL3</b>	60,47 <sup>b</sup>	+	<i>B. laterosporus</i>
<b>RPML28</b>	35,33 <sup>k</sup>	+	<i>P. putida</i>	<b>RSRK7</b>	31,06 <sup>i</sup>	+	<i>Pseudomonas sp</i>	<b>ESK30</b>	24,86 <sup>i</sup>	+	<i>Pseudomonas sp</i>
<b>RPML30</b>	37,94 <sup>i</sup>	+	<i>B. stearothermophilus</i>	<b>RSRL2</b>	39,33 <sup>f</sup>	+	<i>Pseudomonas sp</i>				
<b>RPRL13</b>	23,86 <sup>l</sup>	+	<i>P. putida</i>	<b>RSSBK10</b>	47,72 <sup>d</sup>	+	<i>Pseudomonas sp</i>				
<b>RPML27</b>	40,83 <sup>h</sup>	+	<i>B. stearothermophilus</i>	<b>RSSBK3</b>	44,19 <sup>e</sup>	+	<i>P. fluorescens</i>				
<b>RPMK17</b>	70,03		<i>P. chlororaphis</i>	<b>RSSBK4</b>	29,03 <sup>j</sup>	+	<i>P.aerogenosa</i>				
<b>RPBK14</b>	64,53		<i>P. fluorescens</i>	<b>RSSBK6</b>	40,33 <sup>f</sup>	+	<i>P.aerogenosa</i>				
				<b>RSSBK8</b>	70,5 <sup>a</sup>	+	<i>B.subtilis</i>				

## Chapitre VI : Résultats et discussion



**Figure VI. 26.** Effet de la concentration du tryptophane sur la production de l'acide indole acétique par les rhizobactéries isolées de:

A : l'ectorhizosphère, B : l'endorhizosphère , C : la rhizoplane

### VI.4.4. Discussion

Les Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont un groupe hétérogène de bactéries qui peuvent être trouvées dans la rhizosphère, à la surface des racines et/ou en association avec les racines, qui peuvent améliorer directement et / ou indirectement la qualité et le degré de croissance des plantes (Bloemberg *et al.*, 2001 ; Bellishree *et al.*, 2014). Les mécanismes exacts par lesquels les PGPR stimulent la croissance des plantes ne sont pas entièrement élucidés, mais on pense qu'il s'agit principalement de la production ou la modification de la concentration de certains régulateurs de la croissance (AIA, gibberellines et éthylène), la solubilisation des phosphates ou autres nutriments ou indirectement par la limitation de la croissance des microorganismes phytopathogènes (Joseph *et al.*, 2007 ; Kumar *et al.*, 2014). La capacité des souches antagonistes sélectionnées à promouvoir la croissance des plantes de tomate a été abordé dans cette partie à travers la mise en évidence de leur pouvoir à solubiliser *in vitro* le phosphate inorganique et leur potentiel de production des phytohormones (AIA) ainsi que le métabolisme des substances azotées par la production d'ammoniaque.

La capacité des PGPR à convertir les phosphates inorganiques insolubles sous des formes disponibles pour la croissance des plantes est une caractéristique importante dans les conditions où le phosphate est un facteur limitant de la croissance des cultures (Majid, 2015). La solubilisation des phosphates est le mode d'action le plus souvent reconnu chez les PGPR pour augmenter la disponibilité de cet élément nutritif en faveur des plantes hôtes (Gupta *et al.*, 1994 ; Vessey, 2003 ; Usha *et al.*, 2012). La présence de cette activité chez les microorganismes est mise en évidence par la formation d'un halo autour des colonies cultivées sur un milieu gélosé (PVK) contenant le phosphate tricalcique comme seule source de P. La mesure de degré de solubilisation est déterminée généralement par le calcul de l'index de solubilisation qui traduit le rapport entre la zone de solubilisation et le diamètre de croissance de la colonie. La formation de zones claires autour des colonies traduit principalement la capacité de chacune des cellules bactériennes présentes à utiliser le phosphate tricalcique comme source de phosphore. Cette capacité de solubilisation a été détectée chez 41% des isolats testés. Des valeurs variables d'ISP ont été enregistrées. Des valeurs comparables à nos résultats ont été ainsi rapportées par d'autres auteurs pour des souches microbiennes isolées à partir de la rhizosphère de plusieurs plantes. Walpola *et Yoon* (2013) rapportent que des souches microbiennes (PSB8-PSB13) isolées à partir de la rhizosphère du blé ont montré un index de solubilisation maximale équivalente à 3.25. Les travaux Alam *et al.*, (2002) ont également obtenu un ISP avoisinant 3.29 chez la souche PSB-

107MB isolée à partir de la rhizosphère de plante de maïs. En revanche, [Islam et al. \(2007\)](#) un index de solubilisation important de 6.7 chez des souches originaires de la surface des racines du riz. La solubilisation des phosphates a été également détectée chez les bactéries endophytes ([Baig et al., 2010](#)). Ces bactéries présente un intérêt particulier pour l'agriculture ([Ji et al., 2014](#)). Il est à signaler que des valeurs d'ISP allant de 2.7 jusqu'à 10 ont été rapportés par [Duangpaeng et al., \(2013\)](#) pour des souches provenant des tissus internes de plusieurs variétés de riz.

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer les mécanismes impliqués dans la solubilisation des phosphates par voie biologique. La production d'acides organiques (acide gluconique et acide oxalique) est le mécanisme le plus adapté ([Alam et al., 2002](#)) de même que, la libération d'ions H<sup>+</sup>, la synthèse de substances chélatrices ou la productions d'acides inorganiques ([Khan et al., 2010](#) ; [Marra et al., 2012](#)).

La variation du degré de solubilisation du phosphate par les différents isolats a été également testée par le suivi de l'activité solubilisante des cellules pendant 14 jours. Des index de solubilisation maximaux ont été obtenus au bout de 14 jours par la majorité à l'exception des souches RSSK3 et RPML19 qui ont montré une activité maximale après 12 jours d'incubation. Des résultats similaires ont été rapportés par [Mardad et al. \(2013\)](#). Ces mêmes résultats sont en désaccord avec les résultats obtenus par d'autres études qui rapportent des activités maximales au bout d'une période d'incubation plus courte. Les travaux d'[Alam et al. \(2002\)](#) portant sur l'effet du temps d'incubation sur l'ISP, rapportent des index de solubilisation maximaux (3.29) après seulement 7 jours d'incubation. Les différences dans les conditions d'utilisation des méthodes d'évaluation de la solubilisation pourraient expliquer les différences dans les résultats obtenus par les différents auteurs. En effet, selon [Fankem et al. \(2006\)](#) la mesure de la capacité de solubilisation par utilisation donnent des résultats non reproductibles et que seul le dosage du phosphate libéré dans milieu liquide permet de déterminer la capacité réelle de la souche.

La production des phytohormones est reconnue pour être un élément clé dans la promotion de la croissance des plantes. Les phytohormones interviennent dans plusieurs activités physiologiques de la plante, Ils favorisent la germination des graines, allongement les racines et stimulent l'expansion de la feuille ([Sessitsch et al., 2003](#) ; [Egamberdieva, 2008](#)). Divers microorganismes du sol y compris les bactéries, les champignons et les algues sont capables de produire des quantités de phytohormones physiologiquement actives et qui peuvent exercer des effets prononcés sur la croissance des plantes ([Ahmad et al., 2005](#)).

La recherche de la production de l'indole acétique parmi chez les différents isolats sélectionnés a permis de montrer que 69% des isolats testés sont capables de produire l'AIA. Des concentrations variables d'AIA ont été enregistrées allant de 19.67 µg/ml jusqu'à 95.44µg/ml.

La nature des isolats producteurs a montré que des quantités élevées d'AIA ont été obtenues aussi bien à partir des souches de *Bacillus* que de *Pseudomonas*. Plusieurs études antérieures ont aussi rapporté que l'AIA est produit par diverses bactéries de la thizosphère. [Kumar et al. \(2014\)](#) rapportent que des souches de *Pseudomonas* fluorescents (Ps-BK1 et Ps-AB4) étaient capables de produire des quantités d'AIA variables allant de 95.60 à 110.00 µg/ml en présence de 200 µg/ml de tryptophane. De même que selon [Starovic et al. \(2013\)](#) des quantités appréciables d'AIA allant de 20.4 µg/ml à 33.6 µg/ml ont été détectées respectivement chez les espèces de (*Bacillus* RC23) et (*Bacillus simplex* RC19) en présence de 25 µg/ml de tryptophane.

Il faut noter qu'il est parfois très difficile de faire une comparaison objective des résultats obtenus par les différents auteurs dans le domaine de la production de l'AIA, cela est probablement dû aux concentrations du tryptophane utilisé dans chaque protocole expérimental. La concentration du tryptophane, utilisée souvent comme précurseur, influe considérablement sur la concentration d'AIA produit. Cette constatation a été confirmée par les résultats obtenus en variant les concentrations du tryptophane. Il est apparu que la concentration de l'AIA dans le milieu de culture est dépendante de la concentration initiale du tryptophane et ceci indépendamment de la souche utilisée. Ces résultats sont corroborés par les résultats présentés dans de l'AIA les travaux d'[Ali et al. \(2009\)](#) et ([Ahmed idriss, 2007](#)).

Un autre trait important des PGPR et qui peut influencer indirectement la croissance des plantes, est celui de la production d'ammoniaque à partir de substances azotées ([Joseph et al., 2007](#)). En effet, la totalité des nos isolats sont producteurs de l'ammoniac. Ces résultats sont en accord avec la plupart des travaux consacrés aux études des traits caractéristiques des PGPR. [Mishra et al., \(2010\)](#) rapportent que les *Pseudomonas* sont des producteurs efficaces de l'ammoniaque et améliorent significativement la croissance des plantes médicinales et aromatiques. Les résultats des travaux de [Joseph et al. \(2007\)](#) ont aussi montré que 95% des *Bacillus* étudiés sont producteurs d'ammoniaque suivis de 94.5% de *Pseudomonas*.

## **VI.5. Evaluation *in vivo* de la capacité des rhizobactéries sélectionnées pour la promotion de la croissance de plants de tomate.**

### **VI. 5.1. Sélection des isolats utilisés dans l'évaluation *in vivo***

La sélection des différents isolats pour le test d'évaluation *in vivo* a été basé sur la capacité des différents isolats à montrer une activité antagoniste vis-à-vis du Fol supérieure à 50% et possédant en même temps d'autres activités liées à l'activité antagonistes ou à l'activité promotionnelle de la croissance des plantes. D'après les résultats présentés dans le tableau VI.7, il ressort que 7 isolats différents présentent les caractères de sélection, trois souches appartenant aux isolats rhizosphériques, deux isolats épiphytique et deux isolats endophytes. La totalité des souches présentent une activité inhibitrice vis-à-vis de l'agent pathogène supérieure à 50% en même temps ils sont en mesure de montrer des activités enzymatiques variables. L'activité protéolytique est aussi présente chez l'ensemble des isolats sélectionnées contrairement aux activités pectinolytique et cellulolytiques qui sont présentes uniquement chez une partie des isolats. La présence d'une activité inhibitrice par la voie des substances volatiles est détectée chez deux isolats RSML19 et ERL2. L'ensemble des souches sélectionnées sont aussi capables de produire de l'acide indole acétique avec des concentrations supérieures à 40 µg/ml en même temps la totalité de ces souches démontrent une capacité élevée dans la solubilisation des phosphates inorganiques (ISP>2.22).

**Tableau VI.7. Caractéristiques des isolats sélectionnés pour l'étude de l'effet *in vivo***

Isolat	% inh.	S. V	Pectine	CMCase	Protéase	Amylase	AIA (µg/ml)	ISP
<b>Isolats rhizosphériques</b>								
<b>RSML19</b>	50,00	28.28	+	-	+++	-	39.42	3.34
<b>RSSBK3</b>	66,67	-	+	-	+++	+	44.19	3.19
<b>RSSBK10</b>	50,00	-	-	+	++	-	40.33	2.22
<b>Isolats épiphytes</b>								
<b>RPMK26</b>	55,56	-	-	+	++++	+	62.64	2.72
<b>RPMK2</b>	53.56	-	-	-	+++	-	88.17	3.44
<b>Isolats endophytes</b>								
<b>ERL2</b>	67,44	33.33	+	-	++++	+	60.47	2.86
<b>ERK10</b>	73,33		-	-	++	-	62.28	3.44

SV : substances volatiles ; % inh : pourcentage d'inhibition ; AIA : acide indole acétique ; ISP : indice de solubilisation du phosphate

### VI.5.2. Effet de la bactérisation des semences de tomate sur le taux de germination et l'index de vigueur

L'effet du traitement par bactérisation des graines de tomates sur le taux de germination et l'index de vigueur par les différents isolats sélectionnés est résumé dans le tableau VI.8. Le taux de germination est variablement affecté par le traitement des grains par les différents isolats. Un taux de germination maximal (100%) a été obtenu par la souche RSSBK10 avec un index de vigueur équivalent à 712.15. Les isolats RSBK3 et RSML19 ont de leur part amélioré nettement le pouvoir de germination des graines par rapport au témoin avec un taux de germination de 92.32% et un index de vigueur correspondant à 688.01. La souche isolée à partir de l'endorhizosphère (ERK10) apparaît dans ce cas moins performante que l'ensemble des isolats en provoquant un taux de germination faible de 61.53% avec un index de vigueur équivalent à 452.48.

**Tableau VI.8:** Effet de la bactérisation sur le pouvoir de germination des graines de tomates

Isolat	Moy. Long. Racine (cm)	Moy. Long. Tige (cm)	% de germination	Index de vigueur
T	3,533	3,25	84,61	573,58
RPMK26	4,250	3,44	84,61	650,34
RSSBK10	3,908	3,21	100	712,15
RPMK2	3,959	4,03	84,61	675,88
RSBK3	3,493	3,96	92,32	688,01
ERK10	4,265	3,09	61,53	452,48
RSML19	4,104	3,01	92,32	656,70
ERL2	3,396	3,11	84,61	550,43

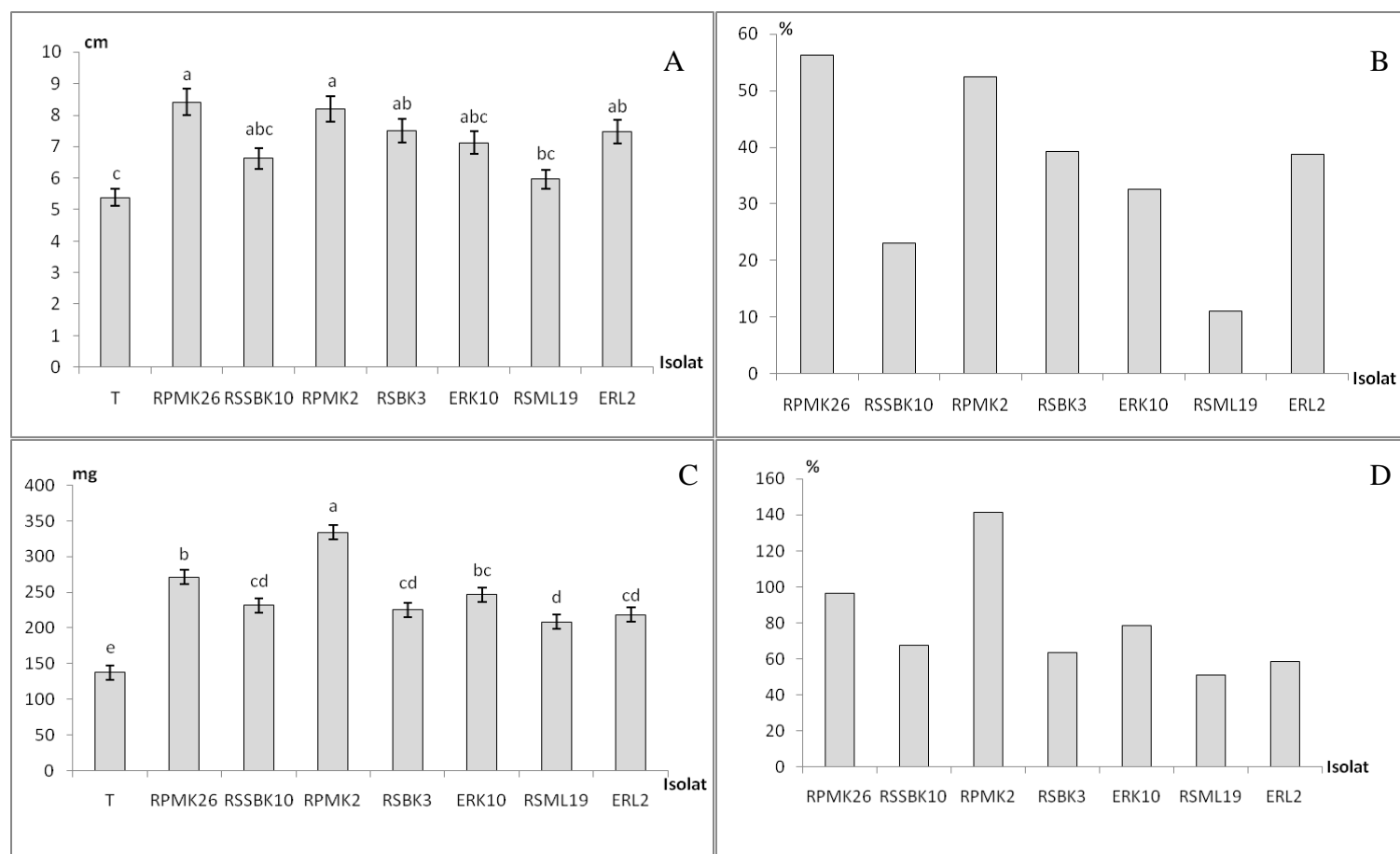
### VI.5.3. Effet de la bactérisation sur la promotion de la croissance de la plante

#### VI. 5.3.1. Promotion de la longueur et poids des racines

La longueur des racines des plantules de tomate traitées par les différents isolats a été mesurée après cultures dans des pots sous serre. Les résultats présentés dans la figure VI.27 montrent que l'ensemble des isolats ont provoqué une nette amélioration de la longueur des racines par rapport au témoin non traité. La longueur des racines des plantules traitées varie entre 5.97 cm et 8.41 cm. La valeur maximale (8.41 cm/plante) a été obtenue par la souche RPMK26 ce qui correspond à une amélioration de 56,26% par rapport au témoin. Des résultats statistiquement significatifs ont été aussi obtenus après traitement par la souche RPMK2 (8.21cm/plante), RSBK3 (7.5cm/plante) et ERL2 (7.47cm/plante) pour des améliorations par rapport au témoin de 52.42%, 39.34% et 38.79% respectivement (Fig. VI.27b).

De même qu'une variation significative dans le poids sec des racines a été aussi enregistrée chez les différentes plantules traitées par les souches sélectionnées. Une amélioration nette variable entre 51.17% et 141.56% a été obtenue par rapport au témoin (Fig. VI.27d). Deux isolats, RPMK2 et RPMK26, ont provoqué des améliorations maximales par rapport aux autres souches et la souche témoin avec un poids sec de racines équivalents à 333.36 mg et 271.40 mg respectivement (Fig. 27c). Les autres isolats ont produit des améliorations moins importantes que les deux isolats précédents en étant toujours supérieures aux résultats obtenus par le traitement témoin.

Au vu des ces résultats, il apparait que les souches isolées à partir de la rhizoplane (RPMK2 et RPMK26) étaient plus actifs dans la stimulation de la croissance du volume racines racinaires aussi bien en termes de poids qu'en termes de longueur. La comparaison entre l'effet des souches ectorhizosphériques et les souches endophytes est moins apparente.

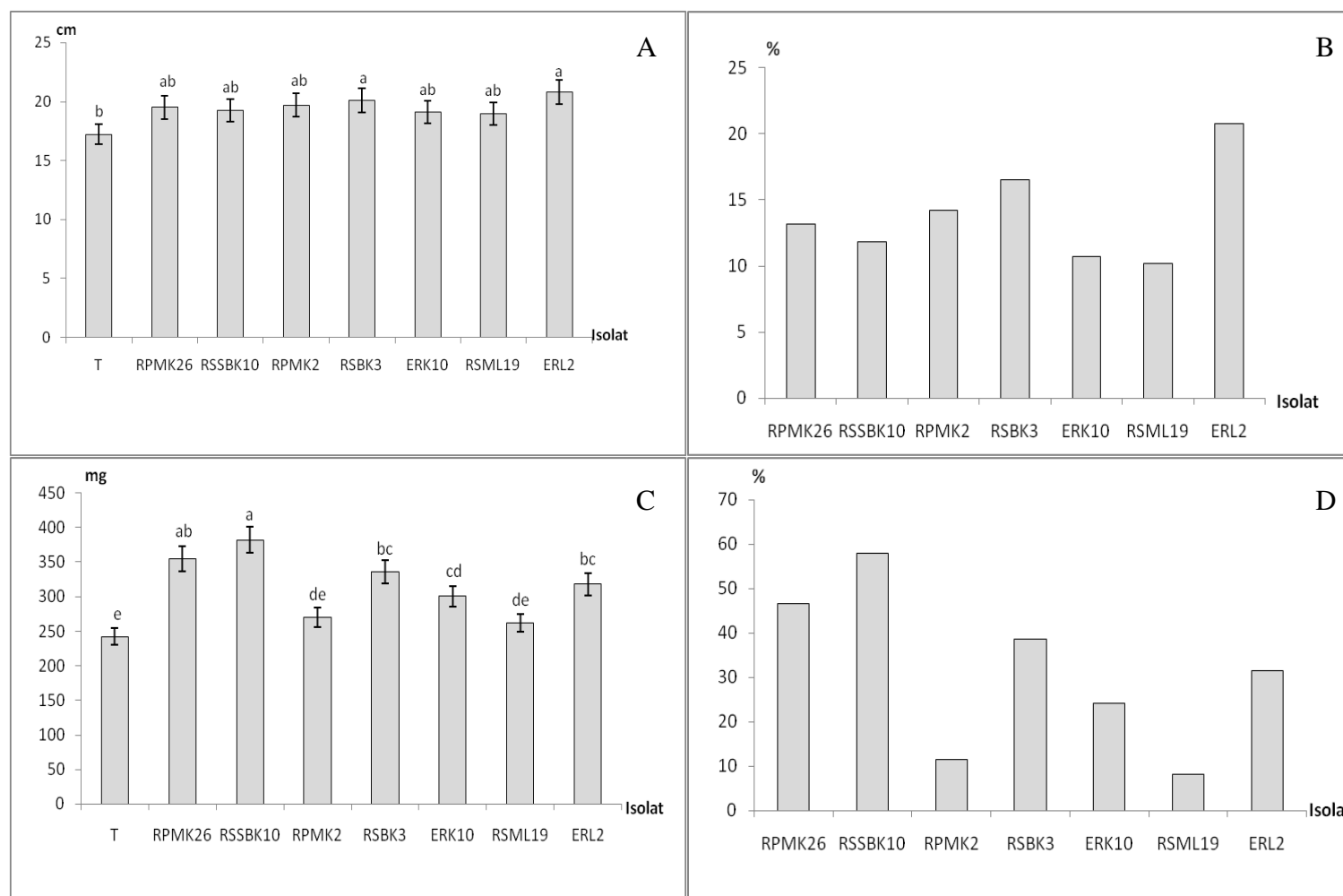


**Figure VI.27.** Effet de l'inoculation des plantules de tomates par les isolats sur la croissance des racines  
 a : longueur de la racine ; b : pourcentage de promotion de longueur de la racine ;  
 c : poids sec de la racine; d : pourcentage de promotion de poids de la racine

### **VI. 5.3.2. Promotion de la longueur et le poids de la tige**

Les différents résultats de l'effet des rhizobactéries sur la promotion de la croissance de la tige sont présentés dans la figure VI.28. Une amélioration significative dans la hauteur des plantules de tomate a été enregistrée en réponse au traitement par les différents isolats. Deux groupes homogènes seulement ont été obtenus par les différents traitements (Tableau VI.9). Ainsi le premier groupe homogène est composé de la souche ERL2 et la souche RSBK3 qui ont produit les tiges les plus longues de 20.81cm et 20.09 cm ce qui correspond à une amélioration de 20.73% et 16.55% par rapport au témoin (Fig. VI.28b). Le deuxième groupe est composé des autres souches qui produisent des longueurs différentes et qui restent statistiquement non significatives entre elles.

Les différents isolats ont eu un effet moins positif sur l'amélioration du poids de la partie aérienne (la tige) que des autres paramètres de la croissance de la plante et par rapport au témoin (Fig. VI.28c). Malgré que les résultats présentés montrent que les différents traitements ont enregistré des augmentations dans le poids de la tige, la figure VI.28d indique que ces augmentations ne dépassent le plus souvent les 60% sauf dans le cas des deux souches RSSBK10 et RPMK26 avec une amélioration de 57.97% et 46.70% respectivement.



**Figure VI.28.** Effet de l'inoculation des plantules de tomates par les isolats sélectionnés sur la croissance de la tige

A : longueur de la tige ; B: % de promotion de longueur de la tige ; C: poids sec de la tige ; B: % de promotion de poids de la tige

## Chapitre VI : Résultats et discussion

**Tableau VI.9.** Analyse statistique des effets de l'innoculation des plantules de tomate par les différents isolats sélectionnés

	Longueur racine (cm)	Poids sec racine (mg)	Hauteur Tige (cm)	Poids sec tige (mg)
<b>Témoin</b>	5,38 <sup>c</sup>	138,10 <sup>f</sup>	17,24 <sup>b</sup>	241,79 <sup>f</sup>
<b>RPMK26</b>	8,41 <sup>a</sup>	271,40 <sup>b</sup>	19,51 <sup>ab</sup>	354,70 <sup>ab</sup>
<b>RSBK10</b>	6,62 <sup>abc</sup>	231,63 <sup>cd</sup>	19,28 <sup>ab</sup>	381,97 <sup>a</sup>
<b>RPMK2</b>	8,20 <sup>a</sup>	333,60 <sup>a</sup>	19,69 <sup>ab</sup>	270,00 <sup>de</sup>
<b>RSBK3</b>	7,50 <sup>ab</sup>	225,77 <sup>de</sup>	20,09 <sup>a</sup>	335,28 <sup>bc</sup>
<b>ERK10</b>	7,13 <sup>abc</sup>	246,70 <sup>c</sup>	19,09 <sup>ab</sup>	300,53 <sup>cd</sup>
<b>RPML19</b>	5,97 <sup>bc</sup>	208,77 <sup>e</sup>	19,00 <sup>ab</sup>	261,87 <sup>de</sup>
<b>ERL2</b>	7,47 <sup>ab</sup>	218,73 <sup>de</sup>	20,81 <sup>a</sup>	317,97 <sup>bc</sup>
<b>Moyenne</b>	7,07	234,34	19,34	308,01
<b>Effet</b>	2.5/<0.05	76.72/<0.05 (H.S)	1.37/<0.05	12.65/<0.05 (H.S)
<b>(Fisher /P)</b>	(H.S)		(H.S)	

### VI.5.3. Discussion

L'effet des PGPR sur la productivité et la croissance des plantes varie entre les essais du laboratoire et ceux sur champs ou en pots. Comme le sol est un système imprévisible, les résultats obtenus aux laboratoires ne sont pas souvent reproductibles dans des conditions non contrôlées. Le changement climatique peut aussi avoir un grand impact sur l'efficacité de ces PGPR (Zaidi *et al.*, 2009). D'autre part, les différentes caractéristiques des PGPR n'agissent pas indépendamment l'un de l'autre mais le plus souvent agissent par effet synergique (Hypothèse additive) et que les mécanismes multiples comme la solubilisation du phosphate, fixation d'azote, activité antifongique, la production de l'AIA et les siderophores etc ... sont responsables en même temps de la promotion de la plante et l'amélioration du rendement de la culture en général (Bashan and Holguin, 1997, Ahemad et Kibret, 2014). Le concept de PGPR est justifié généralement par l'isolement de bactéries qui répondent au moins à deux critères : la colonisation agressive de la rhizosphère de la plante, la stimulation de la croissance de la plante et le biocontrôle de certains agents pathogènes (Benduzi *et al.*, 2012). La détermination des caractères des différents isolats, en termes d'activité antagoniste vis à vis du FOL et en termes de caractères supposés impliqués dans la promotion de la plante, a permis de sélectionner sept (07) souches appartenant aux trois sites de la rhizosphère en même temps présentant des caractères multiples. La sélection de ces souches parmi les microorganismes de la rhizosphère de la plante d'étude permet certainement d'augmenter les chances d'installation des souches dans un environnement au quel ils sont déjà habitués. Selon Weller (1988) l'utilisation des rhizobactéries dans le contrôle des maladies est plus efficace quand ces bactéries sont isolées à partir de la même plante hôte. En plus de leur activité anti-microbienne nos isolats ont été aussi choisis pour leur capacité à produire l'acide indole acétique et leur pouvoir à solubiliser le phosphate inorganique. L'effet de l'AIA sur la croissance des plantes est largement rapporté, il est considéré comme l'auxine le plus caractérisé parmi les auxines produits par les rhizobactéries (Spaepen *et al.*, 2007). Il contrôle une large variété de processus physiologiques impliqués dans le développement et la croissance de la plante : principalement la stimulation de l'élongation des racines primaires et la formation des racines latérales (Spaepen *et al.*, 2007; Remans *et al.*, 2008). De même que la solubilisation du phosphate inorganique, présent chez tout les isolats sélectionnés, est aussi un caractère largement recherché chez les PGPR, il permet à la cellule microbienne d'utiliser les sources de phosphates non assimilables par la plante en les transformant en formes assimilables (Khan *et al.*, 2007). L'introduction de bactéries solubilisant le phosphate a été

plusieurs fois rapportée comme responsable de l'amélioration de la cultures de plusieurs plantes (céréales, légumes, horticoles, etc..) (Awasthi et al., 2011).

L'évaluation primaire de l'efficacité des souches sélectionnées à promouvoir la croissance des plantes de tomate a été étudiée en premier à travers la détermination de leur pouvoir d'amélioration du taux de germination ainsi que l'index de vigueur. Nos résultats montrent que la majorité des souches ont nettement amélioré le pouvoir de germination des graines inoculés. L'effet positif des PGPR sur le pouvoir de germination est aussi rapporté par d'autres études. Selon Subramanian et Satyan (2014), le traitement des graines de tomate par des PGPR à caractères multiples a contribué nettement dans l'amélioration du taux de germination de graines de tomates. Des résultats similaires ont été aussi rapportés par kaur et sharma (2013) après traitements des graines de deux variétés de pois chiches (Desi PBG1 et Kabuli BG1053). Dey et al. (2004) rapportent aussi que les PGPR améliorent la croissance et l'émergence des plantes d'arachides. Si le taux de germination reflète généralement la viabilité des graines en culture, l'index de vigueur est considéré comme un indicateur de la capacité des graines à donner naissance à des plantules capables à terminer leur cycle de vie. Il est rapporté que les graines commencent à perdre leur vigueur avant leur pouvoir de germination (Anonyme, 2009). L'inoculation des graines par certaines PGPR peut varier la valeur de l'index de vigueur des ces graines par rapport à témoin. Nos résultats montrent que la majorité des souches ont provoqué une amélioration dans l'index de vigueur à l'exception de deux souches endophytes (ERK10 et ERL2). Ces résultats avec en accord avec ceux rapportés par différentes études. Subramanian et Satyan (2014) rapportent que le traitement des graines de tomates par des souches de *Pseudomonas* a provoqué une amélioration de germination et l'index de vigueur avec des taux assez élevé (100% et 1363 respectivement) pour indiquer l'effet significatif du traitement par les différentes souches. Cette amélioration a été aussi constatée par Anitha et Kumudini (2013) après des graines de tomate dans conditions normales et salines.

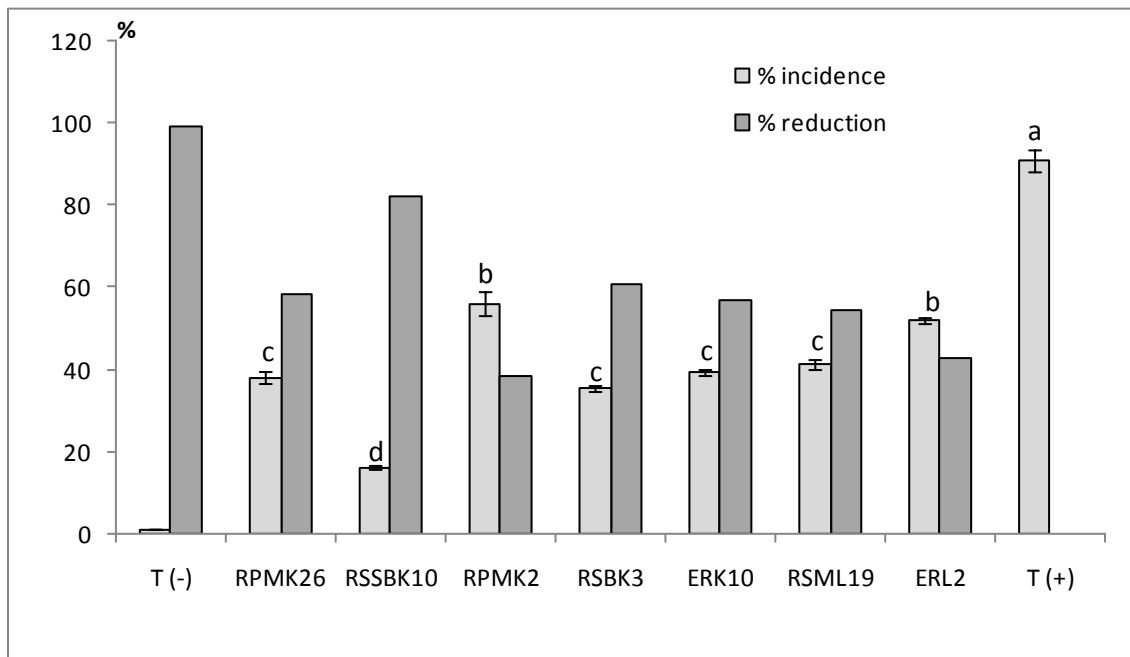
Quand les différentes souches ont été testées *in vivo* pour le pouvoir de promotion, l'ensemble des paramètres de croissance mesurés ont marqué une amélioration par rapport aux plantes témoins. Des pourcentages d'améliorations variables ont été enregistrés pour chacun des isolats testés : longueur de racines (45%-145%), poids sec de racines (10%-60%), longueur de la tige (110%-120%) et poids sec de la tige (100%-160%). Plusieurs recherches ont montré les effets bénéfiques des bactéries sur la croissance des plantes et leur protection contre certains agents pathogènes. Différents mécanismes d'action de ces bactéries ont été proposés. La production des auxines, principalement l'AIA, est parmi les modes d'action les

plus cités. La production de ce métabolite a été détectée dans l'ensemble des isolats sélectionnés. Des concentrations plus ou moins élevées ont été même détectées. Cette présence pourrait expliquer les améliorations notées surtout au niveau des racines. Selon [Vacheron et al. \(2013\)](#), l'AIA exogène (d'origine microbienne principalement) contrôle une large variété de processus de développement chez la plante principalement au niveau des racines. Des observations similaires ont été aussi signalées par [Anitha et Kumidini \(2014\)](#) qui rapportent que la production de l'AIA par les bactéries en présence des plantes provoque le déclenchement d'un effet cascade dans le développement de la plante. La présence d'un AIA exogène au niveau des racines des plantes ne peut à lui seule expliquer l'effet des PGPR sur la croissance végétale et l'effet synergique de plusieurs paramètres est largement plus adaptés ([Burd et al. 2000](#)). La solubilisation du phosphate inorganique du sol par les microorganismes est le plus souvent citée parmi les mécanismes impliqués dans la promotion de la croissance des plantes. A travers ce mécanisme le phosphate insoluble présent dans la rhizosphère est transformé en phosphate disponible pour le développement de la plante. Les isolats sélectionnés sont tous capable de solubiliser le phosphate inorganique démontré par la formation d'un halo de solubilisation sur milieu riche en phosphate tricalcique (milieu PVK). L'effet bénéfique des bactéries solubilisant le phosphate sur l'amélioration des paramètres de croissance de différentes cultures est rapporté par plusieurs recherches de notamment : le maïs ([Hameeda et al., 2006](#)), le blé ([Jisha et Mathur, 2005](#)), la tomate ([Tantawy et al., 2009](#)), la canne à sucre ([Sundara et al., 2002](#)).

### VI.6. Evaluation de l'effet protecteur des plants de tomate par des isolats bactériens vis-à-vis de l'agent pathogène (*F. oxysporum* f. sp *lycopersici*)

#### VI.6.1. Evaluation de l'effet de protecteur des isolats antagonistes sur l'incidence de la maladie

L'effet protecteur des différents isolats sélectionnés contre la maladie de la fusariose chez la plantes de tomates a été évalué en première étape par la mesure du pourcentage de l'incidence de la maladie chez des plantules traitées préalablement par immersion dans des suspensions bactériennes. L'analyse statistique des résultats (ANOVA) montre que le traitement par les agents antagonistes exerce un effet significatif sur la diminution de l'incidence de la maladie par rapports aux témoins ([Annexe III, Tableau VI.4](#)). Malgré qu'aucun des isolats n'a provoqué une éradication totale de la maladie, une réduction significative de la maladie, variable entre 82% et 38%, a été enregistrée chez l'ensemble des agents antagonistes (Fig. VI.29). Une réduction maximale (82%) de la maladie a été démontrée par la souche RSSBK10 pour une valeur d'incidence de 16.2% suivi par la souche RSBK3 avec un taux de réduction de 61%. Les souches ERK19, RPMK26 et RSML29 ont de leur part provoqué une réduction de la maladie avec des taux supérieure à 55%.

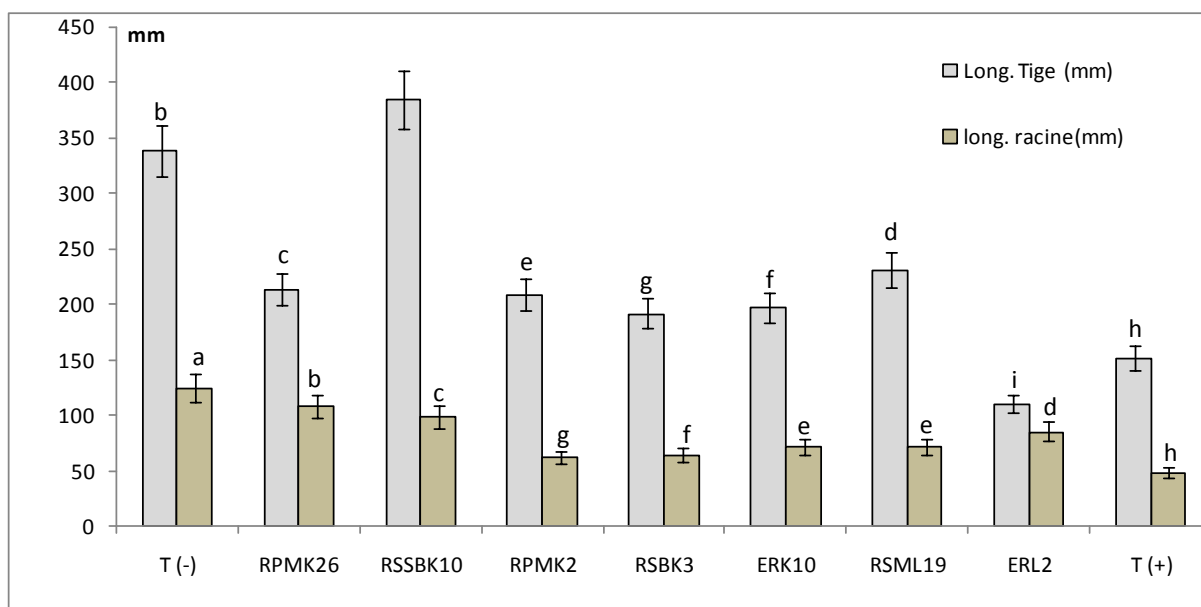


**Figure VI.29.** Effet du traitement par les agents antagonistes sur l'incidence de flétrissement des plantules de tomates.

### VI.6.2. Evaluation de l'effet de protecteur des isolats antagonistes sur les paramètres de croissance des plantules de tomate

#### VI.6.2.1. Effet sur la longueur de la tige et des racines

L'estimation de l'effet protecteur des plantes contre la fusariose par les antagonistes a été réalisé par la culture des plantules de tomates traitées dans des sols infectés par l'agent pathogène de la fusariose (FOL). La comparaison des paramètres de croissance chez les différentes plantules traitées ou témoins (positif et négatif) a permis de détecter une différence significative entre les différents traitements ([Annexe III, Tableau VI.5, 6](#)). La figure VI.30 présente la variation de la longueur des racines et de la tige des plantules en fonction de la nature de la souche antagoniste. Il est clairement démontré que la valeur des résultats varie d'une souche à l'autre. Des longueurs de tige variables entre 110.4mm et 384.5mm. La souche RSBSBK10 a montré une amélioration maximale de la croissance de la partie aérienne supérieure même à la longueur de la moyenne du témoin négatif (sol non infecté). Seule la souche ERL2 était incapable de provoquer une protection efficace traduite par une longueur de la tige moins importante que les autres plantes. La longueur des racines a été également affectée par le traitement. L'analyse statistique des résultats montre que plusieurs groupes homogènes sont présents, une longueur de 107.7mm a été également obtenue après traitement par la souche RSSBK10 suivi par la souche RPMK2. Il est à noter que dans ce cas malgré que les valeurs obtenues sont supérieures aux celles obtenues dans le lot témoin positif, elles sont néanmoins moins importantes que les valeurs du lot témoin négatif.

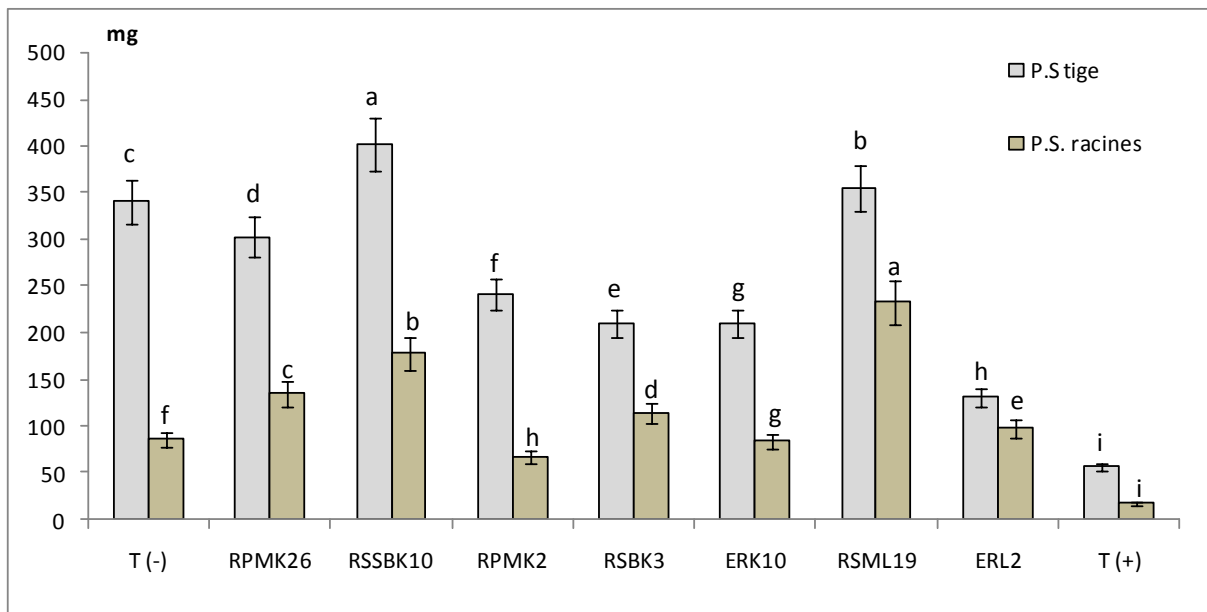


**Figure VI.30.** Effet du traitement par des isolats antagonistes sur la longueur de la tige et des racines des plantules de tomates.

### VI.6.2.2. effet sur le poids sec de la tige et des racines

L'effet protecteur des plantes par les isolats antagonistes a été aussi examiné par la détermination du poids sec des plantes traitées par la mesure des poids de leurs racines ou de leurs tiges. Les résultats présentés dans la figure VI.30 montrent que des poids variables ont été obtenus pour l'ensemble des isolats. L'analyse statistique de ces résultats a permis de vérifier l'effet hautement significatif du traitement par les agents antagonistes sur la variabilité du poids sec de la tige et la racine des plantules traitées (Annexe III, Tableau VI.7, 8). Dans le cas du poids de la tige, des poids supérieures au poids de la plante témoin positif (non traité+infecté) ont été obtenus par l'ensemble des traitements. Le traitement par la souche RSSBK10 a permis l'obtention de plantes dont le poids est supérieur même aux témoins non traités et en absence de l'agent pathogène. Les souches RSML19 et la souche RPMK26 ont de leur part été capables de montrer un effet protecteur contre la maladie en permettant le développement de plantes dont le poids est nettement supérieur aux poids des plantes infectées.

Le traitement des plantes par les bactéries antagonistes a permis également une augmentation du poids racinaire chez l'ensemble des lots par rapport aux lots témoins positifs. Deux souches isolées de la partie externe de la rhizosphère, RSML19 et RSSBK10, ont été les plus performantes avec des racines de poids équivalent à 232.7 mg et 177.63mg.



**Figure VI.31.** Effet du traitement par des isolats antagonistes sur le poids sec de la tige et des racines des plantules de tomates

### VI.6.3. Discussion

L'utilisation des microorganismes comme des bio-pesticides pour réduire les maladies de plusieurs cultures agronomiquement importants est considérée comme l'une des méthodes les plus prometteuses pour le management et la gestion des grandes cultures (Bashan and de-Bashan, 2002; Compant et al., 2005; Toua et al., 2013). Durant cette partie de notre étude, il est question d'évaluer le pouvoir protecteur des plantes de tomates par plusieurs souches microbiennes, isolées de différents sites de la rhizosphère de la tomate, contre l'infection par l'agent pathogène de la fusariose (*F. oxysporum* f.sp *lycopersici*).

Les résultats obtenus montrent que la majorité des isolats ont été capables de réduire l'incidence de la maladie et de promouvoir la croissance des plantes en présence même de l'agent pathogène. La maladie en termes d'incidence a été réduite avec des taux qui dépassent dans la plupart des cas 50%. La souche RSSBK10 a été potentiellement la plus performante par la réduction de l'incidence de la maladie avec un pourcentage de réduction équivalent à 80%. Ces résultats sont en accord avec plusieurs d'autres études qui rapportent dans leur ensemble que les rhizobactéries sont capables de réduire l'infection de la tomate par le FOL (El-rifai et al., 2003 ; Karimi et al., 2012 ; Amkraz, 2013). Toua et al. (2013) ont montré que le traitement par des souches de *Pseudomonas* de plantes de tomate permet la réduction de la sévérité de la fusariose de 4.86% à 74.49%. Ces résultats sont en accord avec aussi ceux rapportés par Priou et al. (2005) qui ont enregistré une réduction de 80% de la maladie causé par *R. solanacearum* après traitement par des souches de *Pseudomonas* sp. Les mêmes observations sont publiées par Soad et al. (2005) rapportent que le traitement de plantules de tomate par une souche de *Bacillus* endophyte a permis l'éradication de l'infection par le FOL après l'inoculation de l'agent antagoniste.

La réduction de l'incidence de la maladie après traitement par les antagonistes est le plus souvent accompagnée chez la plante par une amélioration de la croissance de la plante par rapport aux témoins infectés (Kamal et al., 2009 ; Karimi et al., 2012). Dans le cas de notre étude des résultats qui confirment ces observations ont été enregistrés. Une amélioration significative ( $P < 0.05$ ) des différents paramètres de croissance a été observée. La longueur de la tige et de la racine des plantules de tomate ont été nettement améliorées après traitement par la majorité des isolats. La souche RSSBK10 a été la plus performante par rapport aux autres isolats. Le poids sec des racines et de la tige des plantes ont été également améliorés et les souches RSML19 et RSSBK10 ont été plus efficaces. La promotion de la croissance des plantes en présence de l'agent pathogène peut être attribuée à la limitation de la croissance de ce dernier par les agents antagonistes. En effet les PGPR sont reconnus par leur capacité à

## Chapitre VI : Résultats et discussion

---

exprimer plusieurs mécanismes qui contribuent à ralentir la prolifération de l'agent pathogène dans le sol. Cette inhibition de la croissance des phytopathogènes soutient la promotion de la santé et de la croissance des plantes.

L'étude de la corrélation entre l'effet protecteur (en terme de % d'incidence) *in vivo* et le pouvoir antagoniste des isolats *in vitro* montre une faible corrélation ce qui laisse à penser que l'activité protectrice des isolats n'est pas seulement à un seul mécanisme mais plutôt à la synergie de plusieurs paramètres (Karimi et al., 2012). Bien que les effets des PGPR soient séparés en deux catégories distinctes : effets promotionnels de la croissance et effets de contrôle biologique, il existe toujours une liaison étroite entre les deux (Liu, 2015). Les PGPR promeuvent la croissance de la plante entière, ce qui peut entraîner dans la plante une tolérance accrue à la maladie, et, inversement, la lutte biologique contre les maladies des plantes par PGPR peuvent conduire indirectement à la promotion de la croissance des plantes (Beneduzi et al. 2012). Plusieurs recherches ont montré que l'effet protecteur des PGPR est le plus souvent le résultat de la présence de plusieurs caractères qui peuvent agir directement ou indirectement sur le développement de la maladie chez la plante. En plus de l'action des antibiotiques, des substances volatiles ou les siderophores comme agents principaux dans la réduction de la croissance des agents pathogènes, la promotion de la croissance de la plante via la synthèse de régulateurs de croissance et la mise à la disposition de la plante d'éléments minéraux peuvent aussi contribuer indirectement à l'empêchement de l'installation de l'agent pathogène dans la rhizosphère de la plante (Alwathnani et Perveen, 2012 ; Liu, 2015).

*Conclusion*

*Et*

*Perspectives*

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

La rhizosphère est la partie du sol en contact direct avec les racines de la plante, elle soutient le développement et l'activité d'une communauté microbienne nombreuse et diversifiée. Parmi ces derniers, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont un groupe de bactéries colonisant les racines des monocotylédones et des dicotylédones et capable d'améliorer la croissance de la plante par des mécanismes directs et indirects. L'utilisation d'inoculants microbiens en général ou les PGPR en particulier pour une amélioration durable de la production agricole est de plus en plus largement comme une pratique générale dans l'agriculture intensive dans de nombreuses parties du monde.

La réussite de leur utilisation comme inoculats du sol dépend principalement sur la capacité de ces cellules à coloniser efficacement la rhizosphère ainsi que leur pouvoir à synthétiser des métabolites à effet direct ou indirect sur la croissance du végétal.

L'étude entreprise avait pour objectif, la sélection et l'étude des caractères antagonistes et physiologiques de rhizobactéries endophytes et libres associés aux plantes de tomate cultivées dans différents zones de la wilaya de Mostaganem. Dans ce contexte un ensemble de 109 isolats ont été sélectionnés à partir des différents sites de la rhizosphère des plantes de tomates. L'isolement a été effectué à partir de trois niveaux différents de la rhizosphère des plantes de tomates. Les résultats obtenus ont montré une prédominance relative des bactéries à Gram positif (*Bacillus*) dans les zones de l'ectorrhizosphère et l'endorrhizosphère. Au niveau de la rhizoplane, la présence des bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas* spp) a été plus importante. L'identification des souches sur la base de leurs caractères cultureux et biochimiques nous a permis de vérifier leur appartenance aux espèces du genre *Bacillus* et *Pseudomonas*. Une variété d'espèces appartenant aux deux genres a été mise en évidence ce qui témoigne de la richesse des zones rhizosphériques en microorganismes.

L'activité antagoniste des souches isolées a été testée vis-à-vis de l'agent causal de la fusariose de la tomate. Le choix de l'agent pathogène est justifié par le fait que ce champignon occupe généralement le même espace que les rhizobactéries (la rhizosphère) ainsi que sa capacité de pathogénicité par la présence de plus races différentes chez le champignon. Les prospections réalisées ont montré la présence d'un nombre réduit des foyers de la maladie. La présence du champignon dans ces cultures a été dévastatrice pour la plante sur de grandes superficies. 08 isolats fongiques de morphotypes différents ont été isolés

durant cette étude à partir de plantes de tomate présentant les symptômes de flétrissement fusarienne. L'étude de leur caractère macroscopique et microscopique nous a permis de les classer parmi les espèces de *F. oxysporum*. La pathogénicité de ces espèces vis-à-vis des tomates était variable en comparaison avec une souche de référence. Seules deux isolats ont montré un indice d'altération foliaire plus ou moins élevées par rapport à l'ensemble (78.4% et 64.3%). Il reste à noter que la confirmation de l'appartenance des isolats aux différentes formes spéciales n'a pas été confirmée et que des techniques moléculaires étaient nécessaires pour atteindre cet objectif.

Les mécanismes de lutte biologique investies ont porté sur l'étude du pouvoir antagoniste (inhibiteur) des isolats par la technique de contacte directe en présence d'une culture de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*. Plus de 55% des isolats ont montré une activité inhibitrice variable de la croissance mycélienne du FOL. Parmi les isolats antagonistes, Les souches isolées à partir de l'ectorrhizosphère ont été majoritaire (23.85%) suivi par les bactéries endophytes et epiphytiques avec 16.51% et 13.76% respectivement. La présence d'autres substances diffusibles dans le milieu a été testée par la recherche exclusivement des siderphores (pyoverdines). 22% des isolats testés étaient producteurs de cette substance et l'ensemble appartient au groupe des Pseudomonas.

D'autres modes d'antagonisme ont été également explorés. La production de substances volatiles (HCN) et la production d'enzymes hydrolytiques impliqués la dégradation de plusieurs types de macromolécules composants les parois microbiennes. L'inhibition de la croissance mycélienne par la production de l'acide cyanhydrique était présente chez 15% des isolats alors que la production. Une activité enzymatique diversifiée chez les différents isolats a été mise en évidence. Tandis que la protéase a été détecté chez 68% des souches antagonistes testées suivi par l'activité lipolytique chez 58% chacune, les cellulases, les pectinases et les amylases étaient présentes dans 25%, 19% et 12% des isolats respectivement. La concordance entre l'activité antagoniste via les substances diffusibles et le taux de présence des activités enzymatiques s'est avérée relativement faible ce qui laisse à penser que différents isolats possèdent plus d'un mécanisme d'action possible vis-à-vis des autres microorganismes cohabitant dans le même environnement.

L'évaluation des caractères liés à l'effet PGP des isolats potentiellement antagonistes a été réalisée par la recherche de la capacité des isolats à produire l'acide idole acétique et à solubiliser le phosphate inorganique. Au moins 69% des isolats sont producteurs d'AIA. Des concentrations variables d'AIA ont été enregistrées allant de 19.67 µg/ml jusqu'à 95.44µg/ml. L'identification biochimiques et phénotypiques des isolas producteurs a montré que des

quantités élevées d'AIA ont été obtenues aussi à partir des souches de *Bacillus* que de *Pseudomonas*. L'étude de l'effet du tryptophane sur les concentrations d'AIA produites a démontré que la synthèse de cette acide est fortement dépendante des quantités de l'acide aminé présentes dans le milieu. La solubilisation du phosphate inorganique a été aussi mise en évidence par la culture des différents isolats sur le milieu PVK. L'apparition d'une zone de solubilisation autour des colonies a été observée chez 41% des souches isolées. L'estimation de l'importance de cet activité par la mesure de l'index de solubilisation a permis de détecter des souches capables de solubiliser efficacement les phosphates inorganiques.

Une sélection des souches les plus performantes a été réalisée en vue de choisir des isolats en même temps d'une part capables d'inhiber la croissance des agents phytopathogènes par la production de substances diffusibles dans le milieu (antibiotiques) avec la possibilité de présence d'autres mécanismes d'antagonisme (HCN, siderophore, activité enzymatique) et d'autre part doués d'activités liées à l'effet PGP des souches (AIA, solubilisation de phosphate). Cette étude nous a permis de sélectionner sept (07) isolats qui répondent aux critères précédents. Ces isolats appartiennent aux trois sites de la rhizosphère ce qui laisse à dire que l'appartenance à un niveau donné de la rhizosphère ne détermine pas à priori les pouvoirs antagonistes et promotionnels des germes.

Les effets des isolats PGPR sélectionnés sur la protection et la promotion des plantes ont été examinés après inoculation de plantes de tomate et leur culture en pots sous serre. Le taux de germination des graines de tomate a été amélioré par l'inoculation des graines par plusieurs isolats par rapport au lot témoin. De même que l'index de vigueur, qui traduit la capacité des graines à donner une plantule normale, a été nettement améliorée après traitement notamment par les isolats RPMK26, RPMK2 et RSML19. L'inoculation des plantules de tomate cultivé dans un sol de jardin stérile par les différents isolats a permis également d'enregistrer des pourcentages de promotion considérables chez les différents paramètres de croissance mesurés. En exemple la souche RSBK10 et RPMK26 ont provoqué des améliorations dans la longueur et le poids sec de la tige dépassant les 100% et 140% par rapport aux témoins. De même que le poids et la longueur des racines qui ont enregistré des améliorations par rapport au témoin non inoculé. Une amélioration de poids dépassant les 50% a été enregistré après inoculations par la souche RPMK26, tandis qu'une amélioration supérieure à 120% a été enregistré dans la longueur de la racine après inoculation par la souche RPMK2.

L'effet protecteur des plantes par les isolats contre la maladie de la fusariose a été également investi par la culture des plantules de tomate dans des sols infectés. Le traitement a

permet la réduction de l'incidence de la maladie chez la majorité des plantes. Un taux de réduction maximal (82%) est obtenu après traitement par la souche RSBK10. La réduction de l'incidence de la maladie est accompagnée par une amélioration nette des paramètres de croissance chez l'ensemble des plantes traités. La longueur de la tige et les racines chez la l'ensemble des plantes inoculées est significativement ( $P < 0.05$ ) affecté par le traitement microbien, la souche RSBK10 a provoqué une promotion de la plante plus importante que le témoin positif (non infecté). La biomasse végétale a également enregistrée une amélioration positive après traitement par les isolats PGPR, les isolats RSBK10, RSML19 et RPMK26 ont été plus performantes que les autres isolats surtout dans la promotion de la biomasse de la partie aérienne.

Les perspectives qui découlent de ce travail sont nombreuses et multiple.

- En premier lieu il est à rappeler que la réussite dans l'utilisation des PGPR dans la lutte biologique et la promotion de la croissance repose sur la capacité des germens à coloniser efficacement la rhizosphère de la plante, Il serait intéressant de suivre l'évolution de la biomasse des cellules dans le sol après inoculation.
- Du point de vue activité antagoniste il est évidemment nécessaire de pouvoir identifier et caractériser les substances impliquées dans l'inhibition de la croissance du FOL de même que d'explorer le spectre d'action de ces substances contre d'agent pathogène.
- La confirmation de la nature des sept souches sélectionnées par des outils moléculaires est évidemment nécessaire pour pouvoir déterminer la variabilité des rhizobactéries sélectionnées pour les applications in vivo.
- Il serait intéressant d'étudier l'effet combiné des souches sur le contrôle de certaines maladies des plantes ainsi que leur effet combinés dans la promotion de la croissance des plantes afin de proposer un formulation de bactéries qui peut engendrer un effet meilleur.

*Références  
bibliographiques*

- Abat, B. 2006.** Growth of agriculturally important *pseudomonas spp.* and *azotobacter chroococcum* on beer waste and observation of their survival in peat. Thèse de Master en science, Ecole des sciences et sciences appliquées, Université technique du moyen orient, Turquie. 109p.
- Abdallah, M.A. 1991.** Pyoverdine and Pseudobactine, Inc CRC handbook of microbial iron chelate, p.139-153.
- Abdul-Baki, A.A., Anderson, J.D., 1973.** Vigour determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Sci.*, 13:630-633.
- Abhilash, P. C. and Singh, N. 2009.** Seasonal variation of HCH isomers in open soil and plant-rhizospheric soil system of a contaminated environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 16:727-740.
- Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J.M., Fromin, N., Degraeve, S., Christen, R. and Gardan, L., 2000.** *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.*, 50 :9–18.
- Agrawal, D.P.K. and Agrawal, S. 2013.** Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) for their use as potential plant growth promoting rhizobacteria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2(10):406-417
- Agrios, G.N., 2005.** Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, USA, UK.
- Ahemad, M. and M. Kibret 2014.** Mechanisms and applications of plant growth M.promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science*, 26 :1–20.
- Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S. 2005.** Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk J. Biol.* 29: 29-34.
- Ahmed Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriss, R. 2007a.** Tryptophan dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 619–626.
- Ahmed Idriss, H., Labuschagne, N. And Korsten, L. 2007b.** Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control.* 40: 97-106.
- Alabouvette, C. 1990.** Biological control of *Fusarium* wilt pathogens in suppressive soils, biological control of soilborne plant pathogens (B. Hornby edt), CAB international Wallingford, pp:27-43

- Alabouvette, C., Lemanceau, P. and Steinberg, C. 1993.** Recent advances in biological control of *Fusarium* wilts. *Pesticides sciences*, 37:365-373.
- Alam S., Khalil, S., Ayub, N. and Rashid, M. 2002.** *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. *Intl. J. Agric. Biol.* 4:454-458.
- Alam, S., Khalil, S., Ayub, N. and Rashid, M. 2002.** *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by Phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *Int. J. Agric. Biol.* 4: 454-458.
- Alemu, F. 2013.** Isolation of *Pseudomonas fluorescens* species from rhizospheric soil of faba bean and assessment of their siderophores production. *International Journal of Advanced Research*, 1(8):203-210.
- Ali, B., Sabri, A.N., Ljung, K. and Hasnain, S. 2009.** Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Lett Appl Microbiol*, 48: 542– 547.
- Alwathnani, H. A. and Perveen, K. 2012.** Biological control of *fusarium* wilt of tomato by antagonist fungi and cyanobacteria. *Af. J. Biotechnology*, 1(5) : 1100-1105
- 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 es-science, université Ibn Zohr, Agadir, Maroc.
- Amkraz, N., Boudyach, E.H., Boubaker, H., Bouizgarne, B., Ait Ben Aoumar, A. 2010.** Screening for fluorescent pseudomonades, isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (6):1059-1065
- Anandhakummar, J. 2006.** Studies on the antagonistic effect of rhizobacteria against soil born *Phytophthora* species on strawberry. Thèse de doctorat, université de Hannover, Allemagne.
- Anitha, G. and Kumudini, B.S. 20014.** Isolation and characterizat on of fluorescents Pseudomonads and their effect on plant growth promotion. *Journal of enviromental biology*, 35:627-634
- Anonyme, 1991.** Les fusarioses de la tomate, Ecological Agriculture Projects, McGill University (Macdonald Campus) Ste-Anne-de-Bellevue, QC, H9X 3V9 Canada.
- Anonyme, 2009.** AOSA. Seed Vigor Testing Handbook. Contribution No. 32 to the Handbook on Seed Testing. <http://seedlab.oregonstate.edu/importance-seed-vigor-testing>

- Anonyme, 2009.** MADR (Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural). In : Snoussi S.A., 2010. Etude de base sur la Tomate en Algerie, Rapport de mission, « Programme régional de gestion intégrée des ravageurs pour le Proche-Orient » Projet GTFS/ REM/070/ITA, Organisation Des Nations Unies Pour L'alimentation et L'agriculture Rome. p. 52.
- Anshi, M., Gennari, M. and Matta, A. 1985.** Retardation of Fusarium wilt symptoms in tomato by pre and post-induction treatments of the roots and aerial parts of the host in hot water. *Physiological plant pathology*, 26:175-183.
- Arcand, M. M. and Schneider, K. D. 2006.** Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(4): 791-807
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K., 1981.** *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. (Eds. Nelson, P.E., TAT, Cook, R.J.), Pennsylvania State University Press, pp: 391–399.
- Arshad, M. and Frankenberger, Jr.W.T. 1992.** Microbial production of plant growth regulators, In: *Soil Microbial Ecol.* Ed. Metting FB Jr, Marcel Dekker Inc., New York. pp 307-347.
- Arwiyanto, T., Maryudani, and Azizah, N.N. 2007.** Sifat-sifat Fenotipik *Pseudomonas fluorescens*, Agensia Pengendalian Hayati Penyakit Lincat pada Tembakau Temanggung. *J. Biodiversitas* 8(2):147-151.
- Aseri, G.K.; Jain, N and Tarafdar, J.C. 2009.** Hydrolysis of Organic Phosphate forms by Phosphatases and Phytase Producing Fungi of Arid and Semi-arid Soils of India. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science*, 5(4): 564-570.
- Asghar, H. N., Zahir Z. A. and Arshad M. 2004.** Screening rhizobacteria for improving the growth, yield, and oil contents of canola (*Brassica napus* L.). *Aust. J. Agric. Res.* 55: 187-194.
- Awasthi1, R., Tewari and, R.Nayyar, H.. 2011.** Synergy between Plants and P-Solubilizing Microbes in soils: Effects on Growth and Physiology of Crops. *International Research Journal of Microbiology*, 2(12) :484-503
- Baayen, R.P., Schoffemeer, E.A.M, Toet, S. and Elgersma, D.M. 1997.** Fungal polygalacturonase activity reflects susceptibility of carnation cultivars to Fusarium wilt. *European Journal of Plant Pathology* 103: 15-23.

- Baig, K.S., Arshad, M., Zahir, Z.A. and Cheema, M.A. 2010.** Comparative efficacy of qualitative and quantitative methods for rock phosphate solubilization with phosphate solubilizing rhizobacteria. *Soil Environment*, 29: 82-86.
- Bakker, A. W., Bakker, P. A.H.M., Schippers, B. 1989.** Deleterious cyanide-producing rhizosphere pseudomonads as a factor limiting potato root growth and tuber yield in high frequency potato-cropping soil. In: Vos, J, Loon, C D, Bollen, G J eds. Effects of Crop Rotation on Potato Production in the Temperate Zones. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 153-162
- Bakker, A.W., Schippers, B., 1987.** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* sp. mediated plant growth stimulation. *Soil Biol. Biochem.* 19:451–457.
- Bakthavatchalu, S., Shivakumar, S. and Bhat Sullia, S. 2012.** Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluation of their potential as biocontrol agents. *Acta Biologica Indica*, 1(1):61-67
- Baldani, J.I., Baldani, V.L., Goi, S. and Dobereiner, J. 1997.** Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* 29:911–22
- Banerjee, M.R., Yesmin, L., Vessey, J.K. and Rai, M. 2005.** Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. In: Rai, M.K. (Eds.), Handbook of Microbial Biofertilizers. Food Products Press New York, pp. 137-181.
- Barna, R., Sanchez, F., Moszkowicz, P. and Mehu, J. 1997.** Leaching behavior of pollutants in stabilised/solidified wastes. *J. Hazar. Mater.*, 52, 287–310.
- Bashan, Y. and De-Bashan, L.E., 2002.** Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 :2637–2643.
- Bashan, Y. and Holguin, G. 1998.** Inoculants of plant growth promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances.* 16:729-770.
- Bashan, Y. and Holguin, G., 1997.** *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances. *Can. J. Microbiol.* 43, 103–121.
- Beattie, G. A. and Lindow, S. E. 1999.** Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89, 353-359.
- Beattie, G.A. 2006.** Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: S.S. Gnanamanickam (ed).Plant-Associated Bacteria. Springer, Netherlands, pp: 1–56.

- Beckman, C.H. 1987.** The nature of wilt diseases of plants. American Phytopathological Society, St Paul. MN., USA. 175 pp
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Meyer, J-M and Spröer, C., 2007.** *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57** (5): 979-985.
- Bellishree, K., Ganeshan, G., Ramachandra, Y.L., Archana, S. R. and Chethana, B. S. 2014.** Effect of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) on germination, seedling growth and yield of tomato. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5(8): 1437-1443.
- Benaouali, H. Hamini-Kadar, N. Bouras, A. Benichou, S.L. Kihal, M. and Henni J.E. 2011.** Isolation, pathogenicity test and physicochemical studies of *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis lycopersici*. *Advances in Environmental Biology*, 8(10) : 36-49.
- 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*, 35:1044-1051.
- Berg, G. 2009.** Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 14: 11-18.
- Bergsma-Vlami, M., Prins, M.E. and Raaijmakers, J.M., 2005.** Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 52, 59–69.
- Berkeley, R. C. W., Heyndrickx, M., Logan, N. and De Vos, P. 2002.** Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives. Oxford: Blackwell ed.
- Bhaktavathalu, S., Shivakumar, S. and Sullia, S. B. 2013.** Characterization of multiple plant growth promotion traits of *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a potential stress tolerant biocontrol agent. *Annals of Biological Research*, 4 (2):214-223.
- Biswas, J. C., Ladha, J. K. and Dazzo, F. B. 2000.** Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64: 1644-1650.
- Blancard, D. 2013b.** *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fusariose). <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5118/Tomate-Fusarium-oxysporum-f-sp-lycopersici>.
- Blancard, D. 2009.** La tomate : la plante et sa culture in : Les maladies de la tomate. Edition Quae c/o INRA, p. 17-34.
- Blancard, D. 2013a.** *Verticillium dahliae* (la verticilliose), <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5119/Tomate-Verticilliose-Verticillium-dahliae>. 14.03.2015

- Bloemberg, G. V. and Lugtenberg, B. J. J. 2001.** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 343 – 350.
- Blumer, C., and Haas, D. 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch Microbiol.* 173:170- 177.
- Boddey, R.M. and Dobereiner, J. 2000.** Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Fert. Res.* 42:241-250.
- Booth C. 1971.** The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycology Institute, Kew, Surrey, England. 237p
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X., Gardan, L. 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20:51-53.
- Botelho, G. and Mendoca-Hagler, L. 2006.** Fluorescents *Pseudomonas* associated with the rhizosphere of crops- an overview. *Brazilian journal of microbiology.* 37:401-416.
- Bottini, R., Cassán, F. and Piccoli, P. 2004.** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biot.* 65, 497–503.
- Bowen, G.D. and Rovira, A.D. 1999.** The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*, 66:1-102.
- Brick, J.M., Bostock R.M. and Silverstone S. E. 1991.** Rapid *in situ* assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:535–538.
- Burd, G.I., Dixon, D.G and Glick, B.R 2000.** Plant growth promoting rhizobacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can. J. Microbiol.*, 33:237-245.
- Burd, G.I., Dixon, D.G. and Glick, B.G. 1998.** Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Applied Environ. Microbiol.* 64, 3663-3669
- Cappuccino J.G. and Sherman, N. 1992.** Biochemical activities of microorganisms. In: Microbiology, a Laboratory Manual. The Benjamin / Cummings Publishing Co. California, pp. 125-178.
- Cattelan A.J., Hartel .PG., Fuhrmann J.J. 1999.** Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of American Journal*, 63:1670- 1680

- Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodriguez, M.L., Chulze, S. and Etcheverry, M. 2005.** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Res. Microbiol.*, 156 (5-6) :748-754.
- Cawoy H., Bettiol W., Fickers P. and Ongena M. 2011.** *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases, In: Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management M. Stoytcheva Edt. INTECH Europe, 520p
- Chandler, D., Bailey, A.S., Tatchell, G.M., Davidson, G., Greaves, J. and Grant, W.P. 2011.** The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Phil. Trans. R. Soc. B* 366, 1987-1998.
- Chaux, C.L. and Foury, C.L. 1994.** Cultures légumières et maraîchères. Tome II, légumineuses potagères, légumes fruit. Edt. TeC et Doc Lavoisier, Paris, France. 563p
- Chen, X.H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Sussmuth, R., Piel, J. and Borriss, R. 2009.** Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, 140(1/2):27-37.
- Chi, F., Shen, S.H., Cheng, H.P., Jing, Y.X., Yanni, Y.G. and Dazzo, F.B. 2005.** Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:7271-7278.
- Chin-A-Woeng, T. F., G. V. Bloemberg. and Lugtenberg, B. J. 2003.** Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New. Phyto.* 157 : 503-523.
- Chin-A-Woeng, T. F., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. and Bloemberg, G. V. 2001.** Introduction of the phzH gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:1006-1015.
- Clays-Josserand, A., P. Lemanceau, L. Philippot and R. Lensi, 1995.** Influence of two plant species (flax and tomato) on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within fluorescent *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 745-749.
- Clément, P. 1958.** Culture de la tomate pour la conserve. Centre techniques des conserves des produits agricoles éditions, Paris, France, p.4
- Cobley, L.S. and Steele, W.M. 1976.** An Introduction to the Botany of Tropical Crops. Second edition. Longman Group Limited London.
- Coelho, L.F., Melo, A.M.T., Chiorato, A.F. and Freitas, S.S. 2008.** Diversity of Fluorescent *Pseudomonads* in Different Rhizospheres. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4 (S): 901-907.

- Comby, M. 2011.** Relation entre l'agressivité des souches de *B. cinerea* et l'efficacité de la protection biologique conférée par deux agents de lutte biologique. Mémoire fin d'études, INRA d'Avignon, Unité de Pathologie Végétale, France.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. and Ait Barka, E. 2005.** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 :4951–4959.
- Costa, R., Gomes, N. C.M., Peixoto, R.S. and Rumjanek, N. 2006.** Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:2434–2447.
- Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J. and Moe nne-Loccoz, Y. 2003.** *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48 : 505–512.
- Czaban, J., Gajda, A., Wroblewska, B. 2007.** The motility of bacteria from rhizosphere and different zones of winter wheat roots. *Polish J. of Environ. Stud.* 16(2 : 301-308
- D'Arcy, 1991.** The *Solanaceae* since 1976, with a review of its biogeography. In. Hawkes JG, Lester RN, Nee M, Estrada N (eds) *Solanaceae* III: taxonomy, chemistry and evolution. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp 75–137
- Dalal, J. and Kulkarni, N. 2013.** Population dynamics and diversity of endophytic bacteria associated with soybean ( (L) Merrill). *Brit. Microbiol. Res. J.* (1):96-105.
- Darrah, P. R. 1993.** The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil*, 155: 1-20.
- Daunay, M.C. and Lester, R.N. 1989.** The usefulness of taxonomy for *Solanaceae* breeders, with special référence to the genus *Solanum* and to *Solanum melongena* L. (eggplant). *Capsicum News lett.* 7:10.
- Daunay, M. C., Laterrot, H. and Janick, J. 2008.** Iconography and history of *Solanaceae*: Antiquity to the XVII<sup>th</sup> century. *Horticultural Reviews*, 34: 1-111.
- Dawling, D.N. and O'gara, F. 1994.** Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *IBTECH*, 12: 133-141.
- De Freitas, J.R., Banerjee, M.R. and Germida, J.J. 2007.** Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola. *Boil. Fertile. Soil.* 24: 358-364
- Defago, G, Haas, D. 1990.** *Pseudomonads* as antagonists of soil borne plant pathogens: mode of action and genetic analysis. *Soil Biochem.* 6:249-291.

- Desmas S., 2005** - Analyse comparative de compétitivité : le cas de la filière tomate dans le contexte euro-méditerranéen. Thèse D.E.A., Institut Agronomique Méditerranéen de Montpellier, 68 p.
- Dey, R., Pal, KK., Bhatt D.M. and Chauhan, S.M. 2004.** Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 159:371-394.
- Di Pietro, A. and Roncero, M.I.G. 1996.** Purification and characterization of pectate lyase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* produced on tomato vascular tissue. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49: 177-185.
- Djuric, S., Pavic, A., Jarak, M., Pavlovic, S., Starovic, M., Pivic, R., And Josic, D. 2011.** Selection of indigenous fluorescent pseudomonad isolates from maize rhizospheric soil in Vojvodina as possible PGPR. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(5):6580-590.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A. and Vanderleyden, J. 1999.** Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*, 212:155–164.
- Domsch K.H., Gams W. and Anderson T.H. 1993.** Compendium of soil Fungi, volume 1 et 2, IHW-Verlag-Eching.
- Douira, A. and Lahlou, H. 1989.** Variabilité de la spécificité parasitaire de *V. albo-atrum* Reinke et Berthold, forme à microscélérotés. *Crypt. Mycol.* 10(1) :19-32.
- Droby, S. and Chalutz, E. 1994.** Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases., in: Wilson, C. L. and Wisniewski, M.E. (Eds). Biological control of postharvest diseases. *Theory and practice*. CRC Press Boca Raton, FL. P: 63 – 73
- Duangpaeng, A., Phetcharat, P., Chanthapho, S. and Okuda, N. 2013.** Screening of endophyte bacteria for phosphate solubilization from organic rice Proceeding Science and Engineering, 4th International Science, Social Science, Engineering and Energy Conference 2012- 61–66.
- Duffy, B., Schouten, A., and Raaijmakers, J.M. 2003.** Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 501-538.
- Duval, J. 1991.** Les fusarioses de la tomate. *Agro. Bio. M. Sc.* 320.05.
- Edel V, Steinberg C, Avelange I, Laguerre G, Alabouvette C, 1995.** Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85:579-585.
- Egamberdieva, D. 2008.** Plant Growth Promoting Properties of Rhizobacteria Isolated from Wheat and Pea Grown in Loamy Sand Soil. *Turk J. Biol.* 32: 9-15.

- Elad, Y., and Stewart, A. 2004.** Microbial control of *Botrytis* spp, p. 223-241, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- El-rifai, I.M., Asswah, S.M.W. and Awdalla, O.A. 2003.** Biocontrol of some disease using antagonistic microorganisms. *Pakistan Journal of Biological Science*, 6(4) : 399-406.
- Emmert, E. A. B. and Handelsman, J. 1999.** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171:1-9.
- Euzéby, J.P. 2004.** **Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Edition :SBSV. Société de bactériologie systématique et vétérinaire. Blagnac. France**
- Fankem, H., Nwanga, D., Deubel, A., Dieng, L., Merbach, W. and Etoa, F. X. 2006.** Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *Afr. J. Biotechnol.*, 5(24), 2450-2460.
- FAOSTAT. 2011.** Food And Agriculture Organization Of The United Nations, Statistics Division, <http://faostat3.fao.org>.
- Favre-Bonte, S., Ranjard, L., Colinon, C., Prigent-Combaret, C., Nazaret, S. and Cournoyer, B. 2005.** Freshwater selenium-methylating bacterial thiopurine methyltransferases: diversity and molecular phylogeny. *Environmental Microbiology*. 7:153-164.
- Fenton A. M., Stephens P. M., Crowley J., O'Callaghan M. and O'Gara F. 1992.** Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3873-3878.
- Fergusson, G. 2001.** Lutte contre le virus de la mosaïque du pépino dans les tomates de serre. Fiche technique 01-108, Ministère de l'agriculture, Ontario, Canada.
- Fiddman P.J. and Rossall S. 1993.** The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.*, 47: 119-126
- Flaishman, M.A., Eyal, Z.A., Zilberstein, A., Voisard, C. and Hass, D. 2001.** Suppression of septoria tritici blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide producing strains of *Pseudomonas putida*. *Mol. Plant Microbe Interacts.* 9: 642-645.
- Foster, R.C. and Rovira A.D. 1978.** The ultrastructure of the rhizosphere of *Trifolium subterraneum* L. In: *Microbial ecology* (MW Loutit, JAR Miles, eds) Springer-Verlag Berlin. 278-280.
- Fravel, D., Olivain, C. and Alabouvette, C. 2003.** *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157: 493-502.

- Fravel, D.R. 1988.** Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26 :75-91.
- Fravel, D.R. 2005.** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 337-359.
- Freney, J., Renaud, F., Hansen W. and Bollet, C. 2000.** Précis de bactériologie clinique, éditions Eska, Paris, pp 1259-1285
- Frossard, E., Condon, L. M., Oberson, A., Sinaj, S. and Fardeau, I.C. 2000.** Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *J. Env. Qual.*29: 19-53
- Fuentes-Ramírez, L.E. and Caballero-Mellado, J. 2006.** Bacterial biofertilizers. In: Z.A. Siddiqui (ed). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Netherlands, pp: 143–172.
- Gale, L.R., Katan, T. and Kistler, H.C. 2003.** The probable center of origin of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* VCG 0033. *Plant Dis.*, 87: 1433–1438.
- García, J.A.L., Probanza, A., Ramos, B., Palomino, M.R. and Mañero, F.J.G. 2004.** Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie for Sustainable Development*, 24 (Suppl 4): 169-176.
- Gaussen, H., Lefoy, J. and Ozenda, P. 1982.** Précis de botanique. Deuxième édition, Masson, Paris, 172p.
- Gilli, C. and Heller, W. 2007.** Le chancre bactérien de la tomate. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 39 (2): 141-142
- Glick, B.R. 1995.** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109–117.
- Glick, B.R., Penrose, D. and Li, J. 1998.** A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190, 63–68.
- Gobat, J.M. ; Aragno, M. and Matthey, W. 2003.** Le sol vivant : Bases de pédologie, Biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes (Ed), 528p
- Göhre, V. and Robatzek, S. 2008.** Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 46:189-215.
- Gordon, R. E. 1981.** One hundred and seven years of the genus *Bacillus*. R. C. Berkeley, and M. Goodfellow (ed.) *The aerobic endosporeforming bacteria*. Academic Press. London,
- 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, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Gray, E.J., Smith, D.L. 2005.** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37: 395–412.
- Greonwalf, S. 2005.** Biology, pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*, Magister thesis, university of Pretoria, south Africa.
- Griffin, G.J. 1969.** *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus flavus* spore germination in the rhizosphere of peanut. *Phytopathology* 59: 1214-1218.
- Guetsky, R., Elad, Y., Shtienberg, D., and Dinoor, A. 2002.** Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guillermondii* and *Bacillus mycooides* applied as a mixture on strawberry plants. *Biocontrol Science and Technology*, 12: 976-985.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K. and Singh, V. 2015.** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microb. Biochem. Technol.* 7(2):096-102.
- Gupta, R.R., Singal, R., Shanker, A., Kuhad, R.C. and Saxena, R.K. 1994.** A modified plate assay for screening phosphate solubilizing micro-organisms. *Gen. Appl. Microbiol.* 40: 255-260.
- Gyaneshwar, P., James, E. K., Mathan, N., Reddy, P. M., Reinhold-Hurek, B. and Ladha, J. K. 2001.** Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 183(8): 2 634–2 645.
- Haas D., 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
- Haas, D. and Défago, G. 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:307-319.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F. and Kloepper J.W. 1997.** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 895-914.
- Hameeda, B., Rupela, O.P., Reddy, G. and Satyavani, K. 2006.** Application of plant growth-promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of pearl millet (*Pennisetum glaucum L.*). *Biol. Fertil. Soils.* 43:221-227.
- Hamini, N. 2011.** Diversité génétique des populations de *Fusarium* pathogène de la tomate sur le pourtour méditerranéen. Thèse de doctorat es-science, faculté des sciences, Université Es-sénia, Oran. 149p.

- Hamini-Kadar, N., Edel-Herman, V., Gautheron, N. and Steinberg, C. 2010.** First report of *Fusarium commune* et *Fusarium redolens* causing crown and root rot on tomato in Algeria. *New disease reports*, 22 :3.
- Hamoir J., Goret M., Mignon B., Gustin P. 2001.** Actualité sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre du traitement des dermatophytoses chez les carnivores domestiques. *Ann. Med Vet.*, 145 :226- 232.
- Hardoim, P.R., Overbeek, L. S. V. and Elsas, J. D. V. 2008.** Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16(10): 463-471.
- Haschek, W. M., Motehn, G., Ness, D. K., Harlin, K. S., Hall, W. F., Vesonder, R. F., Peterson, R. E. and Beasley, V. R. 1992.** Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia* 117, 83-96.
- Hassan, T.U.I. and Bano, A. 2015.** The stimulatory effects of L-tryptophan and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on soil health and physiology of wheat. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15 (1) :190-201.
- Haupt, S.E. 2007:** Applications of Genetic Algorithms in the Environmental Sciences, Workshop on the Application of Artificial Intelligence to Environmental and Geospatial Sciences, Corpus Christi, TX, Jan. 12-1
- Henis, Y., Bashan, Y. 1986.** Epiphytic survival of bacterial leaf pathogens. In N. J. Fokkema & J. van den Heuvel (eds), *Microbiology of the phyllosphere* (pp. 252-268), New York: Cambridge Univ. Press.
- Henni, D. E. 1998.** Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. Thèse de doctorat d'état, université d'oran.171p
- Henni, D.E., Boisson, C. and Geiger, J.P. 1994.** Variabilité de la morphologie chez *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*. *Phytopathologia mediterranea*, 33:51-58.
- Hibar, K., Edel-Herman, V., Steinberg, C.H., Gautheron, N., Daami- Remadi, M., Alabouvette, C. and Elmahjoub, M. 2007.** Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from tomato plants in Tunisia. *J. Phytopathology*, 155: 136–142.
- Hiltner, L., 1904.** Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiet der boden bakteriologie und unter besonderer berucksichtigung det grundungung und branche. *Arb. Deut. Landw. Ges.* 98: 59-78.
- Hinsinger, L., Jaillard, B. and Arvieu, J.C. 1996.** Le sol, un patrimoine menacé. *Le point scientifique*. INRA, Département de Science du Sol, Paris.

- 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.
- Hirano, S. S. and Upper, C. D. 1991.** Bacterial community dynamics. In J. H. Andrews, & S. S. Hirano (Eds), *Microbial Ecology of Leaves* (pp. 271-294) New York: Springer-Verlag.
- Hokeberg, M., Wright, S.A.I., Svensson, M., Lundgren, L.N. and Gerhardson, B. 1998.** Mutants of *Pseudomonas chlororaphis* defective in the production of an antifungal metabolite express reduced biocontrol activity. Edinburgh, Scotland, Abstract Proceedings ICPP98.
- Hu, Q., and Xu, J. 2011.** A simple double-layered chrome azurol S agar (SD-CASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus*. *Af. J. Microbiol. Research*, 5(25):4321-4327.
- Husain, A. and Dimond, A.E. 1960.** Role of cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 50: 329-331.
- Huszcz, E. and Burczyk, B. 2006.** Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. *Z. Naturforsch. [C]* 61:727-733.
- Inam-ul-Haq, M., Javed, R.N.A., Rehman, A. 2003.** Evaluation of different strains of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. *Pakistan journal of plant pathology*, 2(1): 66.
- Islam, M.d. T., Deora, A., Hashidoko, Y., Rahman, A., Ito, T., and S. Tahara. 2006.** Isolation and identification of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizoplane of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C, Biosci.*, 62(1/2): 103-110.
- Jacques, P. 1999.** Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. *Appl. Biotechnol.*, 77:223-233.
- Janse, J.D., Derks, J.H.J., Spit, B.E. and Van Der Tuin, W.R., 1992.** Classification of fluorescent soft rot *Pseudomonas* bacteria, including *P. Marginalis* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 15 : 538 -553.
- Jarvis, W.R. and McKeen, C.D. 1991.** Maladies de la tomate. agr. Canada publications p.50
- Jenssen, O. 1965.** *Pseudomonas aeruginosa* and other green fluorescent pseudomonads. A taxonomic study, Copenhagen: Munksgaard,.
- Ji, S.H., Gururanib, M.A. and Chuna, S.C. 2014.** Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*, 169: 83-98.

- Jisha, M.S. and Mathur, R.S. 2005.** Effect of phosphate solubilizing microorganisms (PSM) on mineral phosphate solubilization and on productivity of wheat (*Triticum aestivum*). *Asian J. of Microbiol. Biotechnol. and Environ. Sci.* 7:609-612.
- Johnsen H. R. and Krause K. 2014.** Cellulase Activity Screening Using Pure Carboxymethylcellulose: Application to Soluble Cellulolytic Samples and to Plant Tissue Prints. *Int. J. Mol. Sci.* 15:830-838.
- Jones, H., Whips, J.M. and Gurr, S.J. 2001.** The tomato powdery mildew mildew fungus, *Oidium neolycopersici*. *Mol. Plant Pathol.*, 2: 303-309
- Joseph, B., Patra, R.R., Lawrence, R., 2007.** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.* 2, 141–152.
- Judd, W.S., Campell, C.S. and Kellog, E. 2002.** Botanique systematique: une perspective phylogénétique. De Boek Edition, Paris.
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G. and Piechulla, B. 2007.** Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*, 187(5):351–360.
- Kamal, A.M., Abo-Elyousr, H. and Mohamed, M. 2009.** Biological control of Fusarium wilt in tomato by plant growth-promoting yeasts and rhizobacteria. *Plant pathol. J.*, 25(2): 199-204.
- Kambale, V. C. 2005.** Étude du comportement physiologique et agronomique de la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en réponse à un stress hydrique précoce. Presse universitaire de Louvain, Belgique.
- Kampert M., Strzelczyk E. and Pokojaska A. 1975.** Production of auxins by bacteria isolated from pine roots (*Pinus sylvestris* L.) *Acta Microbiol. Poll.* 7: 135-143.
- Kapsalis, A., Gravanis, F. and Gowen, S. 2008.** Involvement of phenazine-1-carboxylic acid, siderophores and hydrogen cyanide insuppression of *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. damping-off by *Pseudomonas oryzihabitans* and *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 6 (1): 168 – 171.
- Karimi, K. Amini1 J., Harighi, B. and Bahramnejad, B.. 2012.** Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. *Australian J. crop sciences*, 6(4):695-703.
- Katan, T., Shlevin, E., Katan, J. 1997.** Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculum. *Phytopathology*, 87:712–719.

- Katz E., Demain A.L. 1997:** The peptide antibiotics in *Bacillus*: Chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol.Rev.* 41:449-474.
- Kaur, N. and Sharma, P. 2013.** Screening and characterization of native *Pseudomonas* sp. as plant growth promoting rhizobacteria in chickpea (*Cicer arietinum* L.) rhizosphere. *Af. J. Microbiol.Research*, 7(16) :1465-1474
- Kaur, M., Gupta, M., Tripathi, K.K. and Gupta, K.G. 1989.** Lytic effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase on gram positive and gram negative bacteria. *Zentrablatt Bakt. International Journal of Microbiology* 127:153-157
- Kawano C.Y., Cunha, D. S., Chellegatti M.A., Said S., Fonseca, J. V. M. 1999.** Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. *Biotechnology and applied Biochemistry*, 29: 133-140.
- Keith S. 1996.** *Fusarium interactive key*. Agriculture. Agri-food Canada. Cat. N°.A42-66.
- Kennedy, A. C. 2005.** Rhizosphere, in: Principles and Applications of Soil Microbiology D.M., Sylvia, J.J., Fuhrmann, P.G., Hartel, and D.A., Zuberer, eds., 2<sup>nd</sup> ed. Pearson, Prentice Hall, New Jersey, pp.242-262.
- Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Devos, P., Gillis, M. and Schleifer, K.H., 1996.** Recent changes in the classification of pseudomonads: an overview. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 465–477
- Khan, A. 2009.** Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production, *J. agric. biol. sci.* 1 (1):48-58
- Khan, M. S., Zaidi A. and Wani P. A. 2007.** Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. *Agron. Sustain. Dev.* 27:29-43.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M. and Wani, P.A. 2010.** Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Arch. Agron. Soil Sci.* 56(1): 73–98.
- Kim, M. S., Kim, Y. C. and Cho, B. H. 2004.** Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* 06 upon challenge-inoculation with *Corynespora cassiicola*. *Plant Biol.*,6(2):105-108.
- King, E.O., Ward, M.K. and Rancy, D.E . 1954.** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.
- Klein, K. K. and Correll, J. C. 2001.** Vegetative compatibility group diversity in *Fusarium*, Chapter 6, 83—96, in: Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., Burgess, L. W. (ed.), *Fusarium* — Paul E. Nelson Memorial Symposium, AS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 392.

- Kloepper, J. W., Leong, J., Tecutze, M. and Schroth, M. N. 1980.** Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature*. 286:885-886.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. N., 1980.** *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current microbiology*, 4(5): 317-320.
- Kloepper, J.W. and Schroth, M.N., 1978.** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, vol. 2. Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France, pp. 879–882.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R. and Zablotowicz, R.M. 1989.** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7:39-43.
- Knapp S. 2002.** Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the *Solanaceae*. *Journal of Experimental Botany* 53:2001-2022.
- Knoester, M., Pieterse, C.M.J., Bol, J.F. and van Loon, L.C. 1999.** Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:720–727.
- Kolak, A., and Bicici, M. 2013.** PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in protected tomato-growing areas of the eastern Mediterranean region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37: 457-467.
- Koumousti, A. 2004.** Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186 :1084-1096.
- Kumar, A., Maurya, B. R., Raghuwanshi, R. 2014.** Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3 121–128.
- Lahlali, R. Bajii, M. and Jijakli, M.H. 2007.** Isolation and evaluation of bacteria and fungi as biological control agents against *rhizoctonia solani*. *Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University*, 72/4 :973-982
- Landa, B.B., Hervàs, A., Bettiol, W. and Jiménez-Díaz, R.M. 1997.** Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica* 25(4):305-318.

- Latigui, A. 1984.** Etude des différents niveaux de fertilisation potassique sur la fructification de la tomate cultivée en hiver sous serre non chauffée. Thèse de magister, INA El-harrech, Algérie.
- Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F. and Lemanceau, P. 1996.** The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2449-2456.
- le 15.03.2015
- Le Minor L. and Véron M.1989.** Bactériologie médicale. 2<sup>ème</sup> édition. Flammarion. Paris
- Leben, C. 1965.** Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 3, 209-230.
- Legemble, W. 2008.** Le mildiou de tomate (*Phytophthora infestans*). Fiche technique du service régional de la protection des végétaux de haute-normandie, France.
- Lelliott, R.A., Billing E. and Hayward A.C. 1966.** A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.* 29:470–489.
- Lemanceau P., Bakker P.A.H.M., De Kogel W.J., Alabouvette C. and Schippers B. 1993.** Antagonistic effect on nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. Dianthi. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 74–82.
- Lemanceau, P. 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie*, 12:413-437.
- Lemanceau, P. and Alabouvette, C. 1991.** Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection* **10** : 279-286.
- Leminor, L. and Véron, M. 1982.** Bactériologie Médicale, Ed. Flammarion medecine-science, p. 360- 375
- Lepoivre P. 2003.** Phytopathologie: bases moléculaires de biologiques des pathosystemes et fondement des stratégies de lutte. De Boeck & Presses Agronomiques de Gembloux (Eds.), Brussels, Belgium, 149-167.
- Leslie, J. F. et Summerell, B. A.2005.** *Fusarium* Laboratory manual. Blackwell publishing. P.300.
- Linderman, R.G.1988.** *Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora – the mycorrhizosphere effect.* *Phytopathology* 78, 366–371.
- Liu, K. 2015.** Selecting Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Both Biological Control of Multiple Plant Diseases and Plant Growth Promotion in the Presence of

- Pathogens. A dissertation submitted for the Degree of Doctor of Philosophy, the Graduate Faculty of Auburn University, Alabama, 179p.
- Liu, L., Klopper, J.W. and Tuzun, S. 1995.** Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth promoting rhizobacteria: duration of protection and effects of host resistance on protection and root-colonization. *Phytopathology*, 95 : 1064-1068.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mezgeay, M. and Lelie, D.V. 2002.** Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21:586–606
- Logan, A. N. and Halket, G. 2011.** Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endospore-forming Bacteria . In: Endospore-forming Soil Bacteria, Niall A. Logan and Paul De Vos ed. London, pp: 1-30
- Logan, N.A. and Allen, R. N. 2008.** Aerobic, Endospore-Forming Bacteria from Antarctic Geothermal Soils. In: Microbiology of Extreme Soils, Don, P. and Nautyal C. S. Edts, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 155-176.
- Loper J.E. and Schroth M.N. 1986.** Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, 76:386–389.
- Lotta J. 2008.** Fates and Impacts of the Genetically Modified Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. 53p
- Louvet, J. and Bulit, J. 1964.** Recherche sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. I. Action du gaz carbonique sur la croissance et l'activité parasitaire de *Sclerotinia minor* et *Fusarium oxysporum* f. *melonis*. *Ann. Epiphyties*, 15:21-44
- Lugtenberg, BJJ, Dekkers, L.C., and Bloemberg, G.V. 2001.** Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:461-90.
- Lynch, J.M. 1987.** The rhizosphere. Chichester: Wiley Interscience (*ed.*)
- MacHardy, W.E. and Beckman, C.H. 1981.** Vascular wilt Fusaria: Infections and Pathogenesis. In *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*, (P.E. Nelson, T.A. Toussoun, & R.J. Cook, eds): 365-390. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.

- Magnin-Robert, M. 2007.** Protection de la vigne contre *Botrytis cinerea* et stimulation des mécanismes de défense à l'aide de bactéries issues du vignoble champenois. Thèse de doctorat en Biologie des organismes, Université de Reims, France.
- Maheshwari, D.K. 2010.** Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Springer Science & Business Media Edt. p :136.
- Majeed, A., Abbasi, M. K., Hameed, S., Imran, A. and Rahim, N. 2015.** Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology*, 8 :1-10.
- Makoto, S. 2000.** Bacterial control of plant diseases. *Journal of bioscience and bioengineering*, 89(6):515-521
- Mandeel, Q. and Baker, R. 1991.** Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 81:462-469.
- Manikanda, R., Saravanakuma,r D., Rajendran, L., Raguchander, T. and Samiyappan, R. 2010.** Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfl for its efficacy against Fusarium wilt of tomato. *Biol control* 54: 83-89.
- 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. *Afr. J. Microbiol. Research*, 7(8) :626-635.
- Marra, L.M., Soares, C., De Oliveira, S.M., Ferreira, P., Soares, B.L., Carvalho, R.F., Lima, J.M. and Moreira, F.M. 2012.** Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant Soil*, 357:289–307.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G.and Mora, M.L. 2010.** Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10(3): 293 - 319
- Mastretta, C., Barac T., Vangronsveld J., Newman, L., Taghavi, S. and van der Lelie, D. 2006.** Endophytic bacteria and their potential application to improve the phytoremediation of contaminated environments. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 23:15–207.
- Mavrodi, D. V., R. F. Bonsall, S. M. Delaney, M. J. Soule, G. Phillips, and L. S. Thomashow. 2001.** Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **183**:6454-6465.

- Messiaen, C.M. 1981.** Les variétés résistantes. Méthodes de lutte contre les maladies et ennemis des plantes. INRA, Paris
- Meyer, J.M. and Abdallah, M.A., 1978.** The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107: 319-328.
- Meyer, J.M., Abdallah, M.A. 1978.** The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens* Biosynthesis, purification and physical-chemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107: 319-328
- Meyer, J.M., Geoffroy, V.A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W. and Palleroni, N., 2002.** Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2745–2753.
- Mezaache, S. 2012.** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse Doctorat es-sciens. Université Ferhat ABBAS Sétif, 141p.
- Migula, W. 1894.** Über ein neues System der Bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe* **1**, 235–238 (in German).
- Mishra, R. K., Prakash, O., Alam, M. and Dikshit, A. 2010.** Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the productivity of *pelargonium graveolens* L. herit. *Recent Research in Science and Technology*, 2(5): 53-57.
- Montealegre, J.R., Reyes, R., Perez, L.M., Herrera, R., Silva, P. and Besoain, X. 2003.** Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic J. Biotech.* 6:115-127.
- Muleta, D., Assefa, F., Borjesson, E. and Granhall, U. 2013.** Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea Arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12:73–84
- Nahas, E. 1996.** Factors determining rock phosphate solubilization by microorganism isolated from soil. *World J. Microb. Biotechnol.* 12:18-23.
- Naika, S., van Lidt de Jeude, J., De Goffau, M., Hilmi, M. and Van Dam, B. 2005.** Cultivation of tomato : production, processing and marketing. CTA. Series no 17.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. 1983.** *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA.
- Norris, J. R. and Ribbons, D. W. 1971.** Methods in Microbiology. Vol 6A .Academic Press. London and New York.

- Nourozian, J., Etebarian, H.R., Khodakaramian, G. 2006.** Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *J. Sci. Technol.*, 28:29-38
- Ongena, M. and Jacques, P. 2008.** *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.*, 16:115-125.
- O'Sullivan, M., P.M. Stephens, and F. O'Gara. 1991.** Extracellular protease production by fluorescent *Pseudomonas* spp. and the colonization of sugarbeet roots and soil. *Soil Biol. Biochem.* 23:623-627.
- Oyaizu, H. and Komagata, K. 1983.** Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29:17-40.
- Palleroni, N. J. 1984.** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 141-199. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt.
- Palleroni, N. J., 2010.** The *Pseudomonas* Story. *Environ. Microbiol.* 12(6):1377-1383.
- Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R. and Doudoroff, M., 1973.** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23: 333-339.
- Patten C.L. and Glick B.R. 1996.** Bacterial biosynthesis of indole-3- acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. 2002.** Role of *pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microb.* 68:3795-3801.
- Pegg, G.F. 1981.** Biochemistry and physiology of pathogenesis . In *Fungal Wilt Diseases of Plants* (Eds. Mace, M.E., Bell A.A., Beckman, C.H.), New York : Academic Press, 193-253.
- Peix, A., Berge, O., Rivas, R., Abril, A. and Velazquez, E., 2005.** *Pseudomonas argentinensis* sp. nov., a novel yellow pigment-producing bacterial species, isolated from rhizospheric soil in Cordoba (Argentina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1107-1112.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H. and Velázquez, E., 2009.** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, 9: 1132-1147.
- Peralta , I. E., Spooner , D. M. and Knapp, S. 2008.** Taxonomy of wild tomatoes and their relatives ( *Solanum* sect. *Lycopersicoides* , sect. *Juglandifolia* , sect. *Lycopersicon* ; Solanaceae). *Systematic Botany Monographs*, 84: 1- 186.
- Peralta, I. E. and Spooner, D. M. 2005.** Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon*). *A Festschrift for William G. D'Arcy*. T. B. Croat, V. C. Hollowell and R. C. Keating, Missouri Botanical Garden Press. 104: 227-257.

- Perveen, K., Haseeb, A. and Shukla, P.K. 2007.** Management of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Mentha arvensis* cv. Gomti. *J. Mycol. Plant Pathol.* 37:33-36
- Peypoux, F. 1999.** Recent trends in the biochemistry of surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:553-563.
- Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. and Guckert, A., 2000.** Frequency and biodiversity of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:948–955.
- Pierzynski, G. M., Sims, J.T. and Vance, G.F. 2000.** Soils and environmental quality. 2<sup>nd</sup> Edt, CRC. Pres. Newyork. 459p.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., Hoffl, E., van Pelt, J.A., van Loon, L.C. 1996.** Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, 8:1225–1237.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. 1997.** Fungi and Food spoilage, second edition, Blackie Academic and Professional. London.
- Ploetz, R.C. and Pegg, K.G. 2000.** Fungal diseases of the root, corm, and pseudostem: Fusarium wilt. p.143-159. In: D.R. Jones (ed.), Diseases of Banana, Abaca and Enset. CABI Publishing, Oxon, UK.
- Polèse, J.M. 2007.** La culture des tomates, Artémis, coll. "Les clefs du jardinage", Paris, 95p.
- Premono, M.E., Moawad, A.M. and Vleck, P.L.G. 1996.** Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Crop Science*, 11:13–23.
- Priou, S., Marquez, M., and Gutarra, L., 2005.** Biological control of bacterial wilt of potato (*Ralstonia solanacearum*) using antagonistic *Pseudomonas putida* strains. *Phytopathology* 95 (Supplement) S85
- Pritts, M.P. 2002.** Benefits of biotechnology to small farms. In: Perspectives on Agricultural Biotechnology . NRAES-144, pp. 89-91.
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C. and Moenne-Loccoz, Y. 2009.** The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant And Soil.* 321(1-2):341-361
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M. and De Souza, J.T. 2002.** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Anton. Leeuw.* 81:537-547.

- Ramesh R.; Joshi A. A.; Ghanekar M. P. 2009.** *Pseudomonads*: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:47–55
- Ramette, A., Frapolli, M., De´fago, G. and Moenne-Loccoz, Y. 2003.** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol Plant-Microbe Interact.*, 16:525–535.
- Ramírez-Suero, M. 2009.** Etude de l’interaction de *Medicago truncatula* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France
- Ramyasmruthi, S., Pallavi, O., Pallavi, S., Tilak, K. and Srividya, S. 2012.** Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from *Solanaceae* rhizosphere effective against broad spectrum fungal phytopathogens. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2 (1):16-24.
- Ranc , N. , Munos , S., Santoni , S. and Causse M. 2008.** A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (Solanaceae). *BMC Plant Biology* 8: 130.
- Rangarajan, S. Loganathan, P., Saleena, L.M and Nair, S. 2001.** Diversity of pseudomonads isolated from three different plant rhizospheres. *Journal of Applied Microbiology* 2001, 91, 742-749
- Rapilly, F. 1968.** Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyties*, 19, 102 p
- Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T., 1998.** Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17:29-54.
- Remans, R., Beebe S., Blair, M., Manrique, G., Tovar, E., Rao, I. M., et al. 2008.** Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* , 302 :149–161.
- Reyes, M.E.Q., Rohrbach, K.G. and Paull, R.E. 2004.** Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit postharvest. *Biol. Technol.* 33(2):193-203.

- Richard, C. and Boivin, G. 1994.** Maladies et ravageurs des cultures légumières au Canada. Edition de la Société Canadienne de Phytopathologie et la Société d'entomologie du Canada.
- Rogers, L.M., Kim, Y.K., Guo, W., Gonzalez-Candelas, L., Li, D. and Kolattukudy, P.E 2000.** Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria haematococca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 9813-9818.
- Roncero, M.I.G., Hera, C., Ruiz-Rubio, M., García Maceira, F.I., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Calero, F., Delgado-Jarana, J., Roldán-Rodríguez, R., Martínez-Rocha, A.L., Velasco, C., Roa, J., Martín-Urdiroz, Córdoba, D. and Di Pietro A. 2003.** *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62: 87-98.
- Roopa, B., Maya, C. and Makar, H.K. 2012.** Effect of different PGPR strains along with *Rhizobium* on nodulation and chickpea productivity. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*3: 424-426
- Rosenblueth, M. and Martinez-Romero, E. 2006.** Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:827– 837
- Rouxel, F., Alabouvette, C. and Louvet, J. 1979.** Recherche sur la résistance des sols aux maladies. IV : mise en évidence drôle de *Fusarium* autochtones dans la résistance d'un sol à la fusariosedu melon. *Ann. Phytopathol.* 70 :412-417.
- Ruchi, Kapoor, R., Kumar, A., Kumar, A., Patil, S., Thapa, S. and M. Kaur. 2012.** Evaluation of plant growth promoting attributes and lytic enzyme production by fluorescent *Pseudomonas* diversity associated with Apple and Pear. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2(2):1-8.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. and Hunt, M.D. 1996.** Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 8: 1809-1819.
- Sadfi, N., Cherif, M., Fliss, I., Boudabbous, A. and Antoun, H. 2001.** Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *Journal of Plant Pathology.* 83, 101-118
- Sagervanshi, A. Kumari, P. Nagee A. and Kumar. A. 2012.** Media optimization for inorganic phosphate solubilizing bacteria isolated from anand agriculture soil. *Int. J. of life science and*, 2(3): *Pharma Research* 245-255.
- Sagoe, C. I., Ando T., Kouno, K. and Nagaoka, T. 1998.** Relative importance of protons and solution calcium concentration in phosphate rock dissolution by organic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.* 44:617-625.

- Saharan B.S. and Nehra V. 2011.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, 1-30
- Sahu, G.K. and Sindhu, S.S. 2011.** Disease control and plant growth promotion of greengram by siderophores producing *Pseudomonas* sp. *Res. J. Microbiol.* 6:735-749.
- Sang-Woo L., Il-Pyung A., Sang-Yeon S. and Sue-Yeon L. 2010.** *Pseudomonas* sp. LSW25R, antagonistic to plant pathogens, promoted plant growth, and reduced blossom-end rot of tomato fruits in a hydroponic system. *Eur. J. plant Pathol.* 126:1-11.
- Saravanan, T., Muthusamy, M. and Marimuthu, T. 2003.** Development of integrated approach to manage the Fusarial wilt of banana. *Crop Protection*, 22:1117–1123
- Sato, R. and Arako, T. 1974.** On the tomato root rot disease occurring under vinyl-house conditions in southern Hokaido. *Rep. soc. Plant prot. North Japan.* 25:5-13.
- Schenk, P.M., Wilson, K.I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. and Manners, J.M. 2000.** Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*, 97:11655–11660.
- Scher, F.M. and Baker, R. 2006.** Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology.* 72 : 1567-1573.
- Schroth, M.N. and Hancock J.G. 1982.** Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*, 216:1376-81.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1987.** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Ann. Biochem.* 160:47– 56.
- Seifert, K.A. 2001.** *Fusarium* anamorphic generic concepts. In: *Fusarium*. (Eds. Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden W.L. , Burgess L.W), APS Press St. Paul, USA.
- Sessitsch, A., Kan, F.Y and Pfeifer, U. 2003.** Diversity and community structure of culturable *Bacillus* spp. populations in the rhizospheres of transgenic potatoes expressing the lytic peptide cecropin B. *Appl. Soil Ecol.* 22 (2): 149-158.
- Shtienberg, R. G. D., Elad, Y. and Dinoor, A. 2001.** Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*, 91(1): 621 – 627.
- Sieber, T.N. 2002.** Fungal root endophytes In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) *The hidden half*. Dekker, New York, pp 887–917
- Sivasakthi, S., Usharani, G. and Saranraj, P. 2014.** Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) : *Pseudomonas fluorescens* and *B. subtilis* : Review. *Afr. J. agr. research*, 9(16) :1265-1277.

- Slepecky, R.A. and Hemphill, H. E. 2006.** The Genus *Bacillus*—Nonmedical. In: Dworkin M. (ed), Prokaryotes. Springer Science+Business Media, LLC., 4:530–562.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H. and Berg, G., 2001.** Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4742–4751.
- Smibert, R. M., and Krieg N. R.1994.** Phenotypic characterization, p.607–654. In P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg(ed.), Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C
- Sneath, P. H. A., Stevens, M. and Sackin, M. J. (1981).** Numerical taxonomy of *Pseudomonas* based on published records of substrate utilization. *Antonie van Leeuwenhoek*, 47:423–448.
- Snissi A., Ezzouhri L., Rossi B. D. et L. Lairini. 2006.** Contrôle de la fusariose de la tomate causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Congrès international de Biochimie, 9 - 12 Mai, Agadir, Maroc, pp 352 - 356.
- Snoussi S.A. 2010.** Etude de base sur la Tomate en Algérie, Rapport de mission, « Programme régional de gestion intégrée des ravageurs pour le Proche-Orient » Projet GTFS/REM/070/ITA, Organisation Des Nations Unies Pour L'alimentation Et L'agriculture Rome. 52p.
- Snyder, W.C. and Hansen H.N. 1940.** The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27:64-67.
- Soad, A. A, Xie, G.L and Coosemans, J. 2005.** Delivery methods for introducing endophytic *Bacillus* into tomato and their effect on growth promotion and suppression of tomato wilt. *Plant Pathology Journal*, 4(1) :69-74.
- Soderberg, K.H., Probanza, A., Jumpponen, A. and Baath, E. 2004.** The microbial community in the rhizosphere determined by community-level physiological profiles (CLPP) and direct soil- and cfu-PLFA techniques. *Applied Soil Ecology*, 25 : 135–145.
- Sood, A., Sharma, S., Kumar, V. and Thakur, R. 2007.** Antagonism of dominant bacteria in tea rhizosphere of Indian Himalayan regions. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 11(4) 63 - 66
- Sørensen, J. and Sessitsch, A. 2006.** Plant-associated bacteria lifestyle and molecular interactions. In Modern Soil Microbiology (2nd edn) (van Elsas, J.D. et al., eds), , CRC Press, pp. 211–236

- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:425-448.
- Srivastava, N., Bhandari, V. and Bhatt, A.B. 2014.** PGPR Isolated from rhizospheric soil of *Zanthoxylum armatum* DC. in Garhwal Himalaya. *International Journal of Herbal Medicine* , 2 (1):100-108.
- Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., 1966.** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43:159-271
- Starovic , M., Josic , D., Pavlovic , S., Drazic , S., Postic , D., Popovic, T.and Stojanovic, S. 2013.** The effect of IAA producing *Bacillus* sp. Q3 strain on marshmallow seed germination. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19(3): 572-577.
- Stein, T. 2005.** *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4): 845-857.
- Stevens, M.A. 1974.** Varietal influence on nutritional value. P. 87 – 110. In P.L. White and N.SELVEY (eds.) Nutritional qualities of fresh fruits and vegetables. Futura Publ. Co., Mt. Kisco, N.Y.
- Stevenson, F. J. 2005.** Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. John Wiley and Sons, New York.
- Subramanian, J. and Satyan, K. 2014.** Isolation and selection of fluorescent pseudomonads based on multiple plant growth promotion traits and siderotyping. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 74(3) :319-325.
- Sundara, B., Natarajan, V, and Hari, K. 2002.** Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yield. *Field Crop Res.* 77:43-49.
- Tantaway, M.E. and Mohamed, M.A.N. 2009.** Effect of inoculation with phosphate solubilizing bacteria on the tomato rhizosphere colonization process, plant growth and yield under organic and inorganic fertilization. *J. Appl. Sci. Res.* 5:1117-1131.
- Teale, W.D., Paponov, I.A., and Palme, K. 2006.** *Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development.* *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 847–859
- Teintze, M, Hossain, M.B., Baines, C.L., Leong, J. and Van der Helm, D. 1981.** Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growthpromoting *Pseudomonas*. *Biochem.* 20:6446-6457.
- Thangavelu, R., Palaniswami, A. and Velazhahan, R. 2004.** Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 103:259–263.

- Thomashow, L.S., and Weller, D.M., 1988.** Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* 170:3499-3508.
- 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 W.L. , Burgess L.W.), APS Press St. Paul, USA.
- Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U. and Tillberg, E. 1999.** Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* 31:1847–1852.
- Todar, K. 2005.** Todar's online textbook of bacteriology: the genus *Bacillus*. University of Wisconsin- Madison, Department of bacteriology
- Toua, D., Benchabane, M., Bensaid, F. and Bakour, R. 2013.** Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of fusarium wilt in tomato and flax. *Afr. J. Microbiol. Research*, 7(48) :5449-5458.
- Toumatia, O. 2015.** Etude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum* : taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé. Thèse doctorat es-science, Ecole normale supérieure de Kouba, Algérie. 217p
- Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdynseva, T.A. and Netrusov, A.I. 2006.** Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Micro.* 42:117–126.
- Tsuge, K., Ano, T., Hirai, M., Nakamura, Y. and Shoda, K. 1999.** The genes *degQ*, *pps*, and *lpa-8 (sfp)* are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2183-2192
- Usha, R. M., Arundhathi and Reddy, G. 2012.** Screening of rhizobacteria containing plant growth promoting (PGPR) traits in rhizosphere soils and their role in enhancing growth of pigeon pea. *Afr. J. Biotechnol.*, 11(32): 8085-8091.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B. and al. 2013.** Plant growth promoting rhizobacteria and root system functioning, Review article. *Frontiers in Plant Science | Functional Plant Ecology*, 4 :1-19.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36: 453- 483.
- Vancanneyt, M., Segers, P., Torck, U., Hoste, B., Bernardet, J.-F., Vandamme, P. and Kersters, K. (1996).** Reclassification of *Flavobacterium odoratum* (Stutzer 1929) strains

- to a new genus, *Myroides*, as *Myroides odoratus* comb. nov. and *Myroides odoratimimus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 46:926–932.
- Varela, A.M., Seif, A. and Lohr B. 2003.** A guide to IPM in tomato production in Eastern and Southern Africa. CTA/ICRISAT/GTZ.
- Verlent, I., van Loey, A., Smout, C., Duvetter, T., Ly Nguyen, B. and Hendrickx, M.E. 2004.** Changes in purified tomato pectin methyl-esterase activity during thermal and high pressure treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84:1839-1847.
- Vessey, J. K. 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571 – 586.
- Viron, N. 2010.** Identification et validation de nouveaux gènes candidats impliqués dans la régulation du développement du fruit de tomate. Thèse de doctorat en Biologie végétale. École doctorale Sciences de la vie et de la santé, Université de Bordeaux 1. France.
- Voisard C., Keel C., Haas D and Défago, G. 1989.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* 8:351–358.
- Waard, M., Georgopoulos, S., Hollomon, D., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N. and Schwinn, F. 1993.** Chemical control of plant diseases: problems and prospects. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 403-421.
- Walker, R., Powell, A.A. and Seddon, B. 1998.** *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *J. Appl. Microbiol* 84:791–801.
- Walpolo, B. C. and Yoon, M.H. 2013.** *In vitro* solubilization of inorganic phosphates by phosphate solubilizing microorganisms. *Afr. J. Microbial research*, 7(27): 3534-3541.
- Warnock, S. J. 1988.** A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. *Hort Science*, 23:669-673.
- Weese, T.L. and Bohs, L. 2007.** A three gene phylogeny of the genus *Solanum* (*Solanaceae*). *Syst. Bot.* 32: 445–463.
- Welbaum, G.E., A.V. Sturz, Z. Dong, and J. Nowak. 2004.** Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23, 175–193.
- Weller, D. M. 1988.** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *annu. Rev. Phytopathol.* 26:379-407.
- Whipps J.M., 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 52:487-511

- Whipps, J.M. 1987.** Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *The New Phytologist*, 107:127–142.
- Whipps, J.M. 1997.** Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research*, **26**: 1–134.
- Whitelaw, M.A. 2000.** Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.*, 69:100– 151.
- Williams, G.E. and Asher, M.J.C. 1996.** Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crop protection*. 15: 479-486
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Madigan, M.T., Fowler, V.J., Hahn, C.M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K.H. and Fox, G.E., 1984.** The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**: 315–326.
- Wong, M.Y. 2003.** *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. PP728 Soil borne plant pathogen class project, spring 2003.
- Yandri, T. Suhartati, D. Herasari, and S. Hadi. 2008.** The chemical modification of protease enzyme isolated from locale bacteria isolate, *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 with cyanuric chloride-polyethylenglycol. *European Journal of Scientific Research*, (23)1: 177-186.
- Yasmin, F., Othman, R., Sijam, K. and Saad, M. S. 2009.** Characterization of beneficial properties of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere, *Afr. J. Microbiol. Research*, 3(11):815-821
- Zaidi, A., Khan, M.S., Ahemad, M., Oves, M., 2009.** Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 56, 263–284.
- Zeller, S.L., Brandl, H. and Schmid, B. 2007.** Host-plant selectivity of rhizobacteria in a crop/weed model system. *PLoS One*, 2(9):846
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z, and al. 2002.** Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2198-2208.

# *ANNEXES*

# Annexe I

## Milieux de culture

### Solution Tampon phosphate saline (PBS) (g/l)

NaCl	8
KCl	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.24

### Milieu King B (g/L)

Peptone	20
MgSO <sub>4</sub>	1.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5
Glycérol	10
Agar Agar	15
Eau distillée	1000 ml
pH	7.2

### Milieu Luria-Burtani (LB) (g/L)

Hydrolysate de caséine	10
NaCl	5
Extrait de levure	5
Agar agar	15
Eau distillée	1000 ml
pH	7

**Milieu PDA (g/L)**

Pomme de terre	200
Glucose	20
Agar Agar	20
Eau distillée	1000 ml
pH	5.2

**Milieu Bakkers et schippers (g/L)**

Hydrolysate de caséine	10
NaCl	5
extrait de levure	5
Glycine	4.4
Eau distillée	1000 ml
pH	7.2

**Milieu agar au lait écrémé (Skimmed milk agar) (g/L)**

Peptone pancréatique	5
Extrait de levure	2.5
Glucose	1
Lait écrémé	7%
Agar Agar	15
Eau distillée	1000 ml
pH	7.2

**Milieu M9 (g/L)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
NaCl	0.5
NH <sub>4</sub> Cl	1
MgSO <sub>4</sub>	0.5
CaCl <sub>2</sub>	0.015
Glucose	2
Eau distillée	1000 ml
pH	7.2

**Milieu Pikovskaya (PVK) (g/l)**

Extrait de levure	0.5
Glucose	10
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	0.5
KCl	0.2
MnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.1
FeSO <sub>4</sub>	0.0001
Agar Agar	15
Eau distillée	1000 ml
pH	7.2

## ANNEXE II

### Origine et nature des rhizobactéries

Tableau VI. 1 : Origine et caractères des rhizobactéries endophytes

N°	souche	Lieu d'isolement	origine	milieu	forme	Gram	Espèces
163	EBK38	Bouski	endo	KB	B	-	<i>P. oryzihabitans</i>
77	EML56	Mazagran	endo	LB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
72	EML57	Mazagran	endo	LB	B	+	<i>Bacillus sp</i>
74	EML59	Mazagran	endo	LB	cocci	-	ND
78	EML60	Mazagran	endo	LB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
79	EML61	Mazagran	endo	LB	B	+	<i>B. sphaerecus</i>
80	EML62	Mazagran	endo	LB	B	+	<i>B. sphaerecus</i>
50	EMK41	Mazagran	endo	KB	B	+	<i>B. mycoides</i>
41	EML36	Mazagran	endo	LB	B	+	<i>B. mycoides</i>
22	ERK10	Radar	endo	LB	B	+	<i>B. brevis</i>
20	ERK14	Radar	endo	KB	B	-	<i>P. oryzoabtans</i>
21	ERK9	Radar	endo	KB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
15	ERL1	Radar	endo	LB	B	+	<i>B. pumilis</i>
12	ERL11	Radar	endo	LB	B	+	<i>B. mycoides</i>
19	ERL13	Radar	endo	LB	B	+	<i>B. brevis</i>
14	ERL2	Radar	endo	LB	B	-	<i>P. chloroaphis</i>
16	ERL3	Radar	endo	LB	B	+	<i>B. laterosporus</i>
112	ESK30	Stidia	endo	KB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
95	ESL1	Stidia	endo	LB	B	-	ND

Tableau VI. 2 : Origine et caractères des rhizobactéries isolées à partir de la rhizoplane

N°	souche	Lieu d'isolement	origine	milieu	forme	Gram	Espèces
135	RPBK14	Bouski	Rplane	KB	B	-	<i>P. fluorescens</i>
158	RPBK33	Bouski	Rplane	KB	B	-	<i>P. putida</i>
160	RPBK35	Bouski	Rplane	KB	B	-	<i>P. fluorescens</i>
153	RPBK39	Bouski	Rplane	KB	B	-	<i>P. fluorescens</i>
149	RPBK42	Bouski	Rplane	KB	B	-	<i>P. fluorescens</i>
150	RPBK43	Bouski	Rplane	KB	B	-	N.D
152	RPBK45	Bouski	Rplane	KB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
136	RPBL15	Bouski	Rplane	LB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
137	RPBL16	Bouski	Rplane	LB	B	-	<i>P. putida</i>
141	RPBL22	Bouski	Rplane	LB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
69	RPMK14	Mazagran	Rplane	KB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
71	RPMK16	Mazagran	Rplane	KB	B	-	ND
103	RPMK17	Mazagran	Rplane	KB	B	-	<i>P. chlororaphis</i>
66	RPMK2	Mazagran	Rplane	KB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
64	RPMK25	Mazagran	Rplane	KB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
63	RPMK26	Mazagran	Rplane	KB	B	+	<i>B. circulans</i>
67	RPMK3	Mazagran	Rplane	KB	B	+	<i>B. circulans</i>
35	RPMK30	Mazagran	Rplane	KB	B	+	<i>Paenibacillus macerans</i>
68	RPMK4	Mazagran	Rplane	KB	B	+	<i>B. polymixa</i>
90	RPML10	Mazagran	Rplane	LB	B	-	<i>P. chlororaphis</i>
91	RPML11	Mazagran	Rplane	LB	B	+	<i>B. megaterium</i>
52	RPML19	Mazagran	Rplane	LB	B	+	<i>B. licheniformis</i>
54	RPML21	Mazagran	Rplane	LB	B	+	<i>Bacillus sp</i>
105	RPML25	Mazagran	Rplane	LB	B	-	<b>N.D</b>
87	RPML23	Mazagran	Rplane	LB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
88	RPML24	Mazagran	Rplane	LB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
106	RPML26	Mazagran	Rplane	LB	B	-	<i>P. putida</i>
107	RPML27	Mazagran	Rplane	LB	B	+	<i>B. stearothermophilus</i>
33	RPML28	Mazagran	Rplane	LB	B	-	<i>P. putida</i>
56	RPML29	Mazagran	Rplane	LB	B	-	ND
57	RPML30	Mazagran	Rplane	LB	B	+	<i>B. stearothermophilus</i>
10	RPRL13	Radar	Rplane	LB	B	-	<i>P. putida</i>
11	RPRL14	Radar	Rplane	LB	B	-	<b>ND</b>
116	RPSK45	Stidia	Rplane	KB	B	+	<i>B. sphaerecus</i>
159	RPSL10	Bouski	Rplane	KB	B	+	<i>B. subtilis</i>
114	RPSL13	Stidia	Rplane	LB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
115	RPSL15	Stidia	Rplane	LB	B	+	<i>B. brevis</i>
81	RPSL22	Stidia	Rplane	LB	B	+	<i>B. stearothermophilus</i>
82	RPSL60	Stidia	Rplane	LB	B	+	<i>B. macerans</i>

Tableau VI.3 : Origine et caractères des rhizobactéries libres isolées à partir de l'ectorrhizosphère

N°	souche	Lieu d'isolement	Origine	milieu	forme	Gram	Espèce
125	RSBK49	Bouski	rhizph	KB	B	-	<i>P. fluorescens</i>
128	RSBK52	Bouski	rhizph	KB	B	-	<i>P. fluorescens</i>
130	RSBK54	Bouski	rhizph	KB	B	-	<i>P. fluorescens</i>
132	RSBK56	Bouski	rhizph	KB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
48	RSMK40	Mazagran	rhizph	KB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
51	RSMK42	Mazagran	Rhizph	KB	B	+	<i>B. stearrowthermophilus</i>
96	RSMK43	Mazagran	rhizph	KB	B	-	<i>P. aerogenosa</i>
98	RSMK44	Mazagran	rhizph	KB	B	-	ND
104	RSMK45	Mazagran	Rhizph	KB	B	+	<i>B. megaterium</i>
97	RSML1	Mazagran	Rhizph	LB	B	+	<i>B. megaterium</i>
102	RSML10	Mazagran	Rhizph	LB	B	+	<i>B. megaterium</i>
103	RSML15	Mazagran	Rhizph	LB	B	+	<i>B. megaterium</i>
43	RSML17	Mazagran	rhizph	LB	B	+	<i>B. licheniformis</i>
18	RSML18	Mazagran	Rhizph	LB	B	+	<i>B. brevis</i>
44	RSML18	Mazagran	rhizph	LB	B	-	<i>P. fluorescens</i>
98	RSML2	Mazagran	Rhizph	LB	B	+	<i>B. stearrowthermophilus</i>
104	RSML21	Mazagran	rhizph	LB	B	+	<i>B. subtilis</i>
3	RSML3	Mazagran	Rhizph	LB	B	+	<i>B. subtilis</i>
34	RSML37	Mazagran	Rhizph	LB	B	+	<i>B. stearrowthermophilus</i>
36	RSML39	Mazagran	rhizph	LB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
4	RSML4	Mazagran	Rhizph	LB	B	+	<i>B. brevis</i>
42	RSML47	Mazagran	rhizph	LB	B	+	<i>B. subtilis</i>
100	RSML48	Mazagran	rhizph	LB	B	-	ND
99	RSML6	Mazagran	rhizph	LB	B	-	<b>N.D</b>
100	RSML7	Mazagran	Rhizph	LB	B	+	<i>B. stearrowthermophilus</i>
101	RSML9	Mazagran	Rhizph	LB	B	+	<i>B. megaterium</i>
8	RSRK3	Radar	Rhizph	LB	B	+	<i>B. stearrowthermophilus</i>
9	RSRK4	Radar	rhizph	KB	B	-	<i>P. putida</i>
6	RSRK7	Radar	Rhizph	KB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
7	RSRK8	Radar	rhizph	LB	B	+	<i>B. subtilis</i>
1	RSRL1	Radar	Rhizph	LB	B	-	ND
2	RSRL2	Radar	Rhizph	LB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
5	RSRL5	Radar	Rhizph	LB	B	+	<i>B. sphaerecus</i>
32	RSSBK10	Sablette	rhizph	KB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
26	RSSBK3	Sablette	rhizph	KB	B	-	<i>P. fluorescens</i>
27	RSSBK4	Sablette	rhizph	KB	B	-	<i>P. aerogenosa</i>
28	RSSBK5	Sablette	rhizph	KB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
29	RSSBK6	Sablette	rhizph	KB	B	-	<i>P. aerogenosa</i>
31	RSSBK8	Sablette	rhizph	LB	B	+	<i>B. subtilis</i>
23	RSSBL1	Sablette	rhizph	LB	B	-	<i>Pseudomonas sp</i>
25	RSSBL9	Sablette	Rhizph	LB	B	+	<i>B. sphaerecus</i>
61	RSSK10	Stidia	rhizph	KB	B	-	<i>P. aeroginosa</i>
113	RSSK34	Stidia	rhizph	KB	B	-	N.D
70	RSSK37	Stidia	Rhizph	LB	B	+	<i>B. stearrowthermophilus</i>
60	RSSK9	Stidia	rhizph	LB	B	+	<i>B. subtilis</i>
108	RSSL3	Stidia	rhizph	LB	cocci	+	<b>N.D</b>
55	RSSL4	Stidia	rhizph	LB	B	-	<i>P. fluorescens</i>
109	RSSL5	Stidia	rhizph	LB	B	+	<i>Bacillus sp</i>
110	RSSL6	Stidia	Rhizph	LB	B	+	<i>B. brevis</i>
58	RSSL7	Stidia	Rhizph	LB	B	+	<i>B. stearrowthermophilus</i>
59	RSSL8	Stidia	rhizph	LB	B	+	<i>B. subtilis</i>

## ANNEXE III

### ANALYSES STATISTIQUES

**Tableau VI.1.** Analyse de la variance de l'effet inhibiteur des souches rhizosphériques sur la croissance radiale de *FOL*

Source	DDL	SC	MC	F	P
souche	25	32161,81	1286,47	930,84	<0,05**
Erreur	52	71,87	1,38		
Var. totale	77	32233,68			

**Tableau VI.2.** Analyse de la variance de l'effet inhibiteur des souches épiphytiques sur la croissance de *FOL*

Source	DDL	SC	MC	F	P
souche	17	4365,834	256,814	908,07	<0,05**
Erreur	36	10,181	0,283		
Var. totale	35	4376,016			

**Tableau VI.3.** Analyse de la variance de l'effet inhibiteur des souches endophytes sur la croissance radiale de *FOL*

Source	DDL	SC	MC	F	P
souche	14	12816,05	915,43	3966,61	<0.05**
Erreur	30	6,92	0,23		
Var. totale	44	12822,97			

**Tableau VI. 4.** Analyse de la variance de l'effet du traitement par les isolats sur l'incidence de la maladie de la fusariose chez les plantes de tomates

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
<b>var. totale</b>	15446,5	26	594,096		
<b>Isolat</b>	15308,33	8	1913,542	249,291	0
<b>Erreur</b>	138,167	18	7,676		

**Tableau VI. 5.** Analyse de la variance de l'effet du traitement sur la longueur de la tige chez les plantes de tomates cultivées dans un sol infecté

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
<b>var. totale</b>	177572,7	26	6829,721		
<b>Isolat</b>	177568,5	8	22196,06	93320,65	0
<b>Erreur</b>	4,281	18	0,238		

**Tableau VI. 6.** Analyse de la variance de l'effet du traitement sur la longueur de la racine chez les plantes de tomates cultivées dans un sol infecté

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
<b>var. totale</b>	14610,81	26	561,954		
<b>Isolat</b>	14607,72	8	1825,965	10633,87	0
<b>Erreur</b>	3,091	18	0,172		

**Tableau VI. 7.** Analyse de la variance de l'effet du traitement sur le poids de la tige chez les plantes de tomates cultivées dans un sol infecté

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
<b>var. totale</b>	295474,2	26	11364,39		
<b>Isolat</b>	295469	8	36933,62	128155,2	0
<b>Erreur</b>	5,188	18	0,288		

**Tableau VI. 8.** Analyse de la variance de l'effet du traitement sur le poids de la racine chez les plantes de tomates cultivées dans un sol infecté

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>
<b>var. totale</b>	96223,47	26	3700,903		
<b>Isolat</b>	96221,59	8	12027,7	115465,9	0
<b>Erreur</b>	1,875	18	0,104		

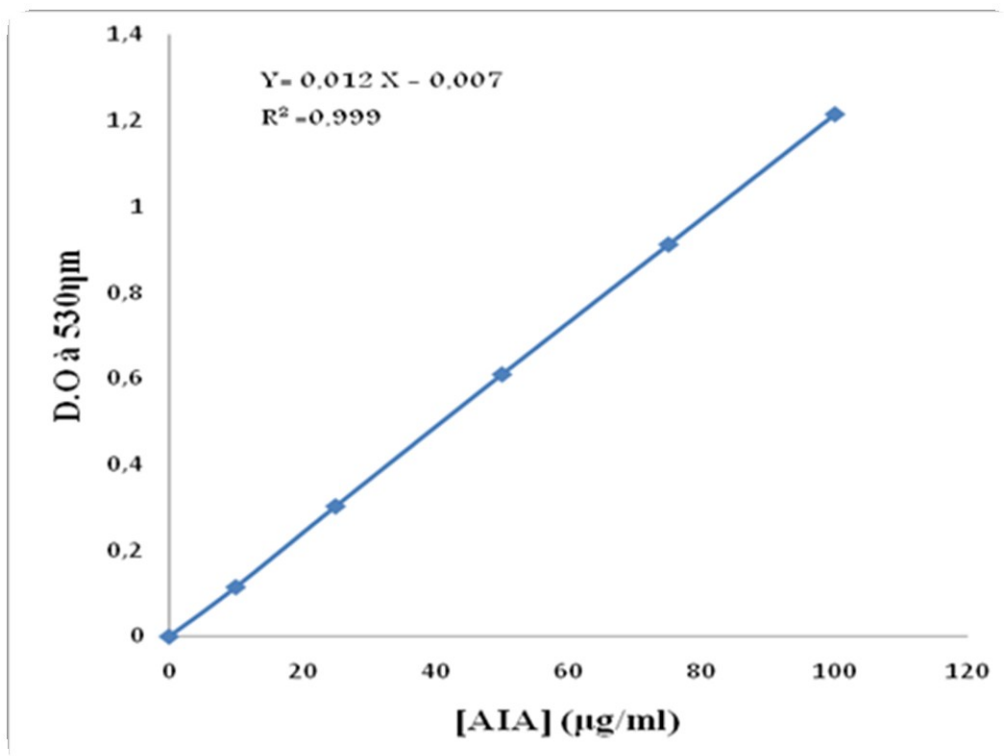


Figure VI.I . Courbe étalon pour la détermination de la concentration d'AIA

*Publication*

# SCREENING OF FREE-LIVING AND ENDOPHYTIC RHIZOBACTERIA WITH POTENTIAL ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST *F. OXYSPORUM* F. SP *LYCOPERSICI* FOR THEIR POTENTIAL AS PLANT GROWTH PROMOTERS

A. BOUZNAD<sup>1</sup> AND M. BELLAHCENE<sup>2</sup>

1. Laboratoire de Microbiologie et Biologie végétale, université de Mostaganem, Algeria.
2. Centre universitaire d'Ain-timouchent, Algeria

(Received 30 September, 2014; accepted 25 October, 2014)

**Key words :** PGPR, Tomato, Antagonism, Phosphate solubilization, IAA, Growth promotion

**Abstract**—Plants can benefit from soil microbes in many ways. Certain microbes stimulate plant growth, enrich soils, degrade pollutants, or protect plants against pathogens. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are free-living, soil-borne bacteria, which, when applied to seeds or crops, enhance the growth of the plant or reduce the damage from soil-borne plant pathogens. In the present work a total of one hundred and nine bacterial strains have been isolated from the rhizosphere, surfaces root (rhizoplane) and the inner roots tissues (endophytic bacteria) of tomato plant cultivated in different locations of semi-arides zones in west of Algeria. Out of these, 53% of the total isolates exhibited a variable antagonistic activity against tomato wilt agent (*F. oxysporum* f.sp *lycopersici*). The endophytic strain ERL3 has exhibited the maximal inhibition rate equivalent to 78%. Effective antagonist isolates have been further screened for their plant growth promoting (PGP) activity viz., production of plant growth regulators (IAA), siderophores, HCN, inorganic phosphate solubilization, Ammonia and catalase production. Indole acetic acid has been detected in 72%, 66% and 61% epiphytic, endophytic and rhizospheric strains respectively. 47.45% among antagonist strains are of solubilization inorganic phosphates capacity. A maximal solubilization index (SI) of 2.48 has been obtained after 14 days of incubation with RMSK43 and RPMK26. Evaluation of Seven strains, each with multiple plant growth promoting activities, to enhance tomato plant growth was carried out in pots experiments under greenhouse conditions. All the isolates have significantly ( $P < 0.01$ ) increased shoot length, root length, shoot dry weight, root dry weight of the inoculated plant. The percentage increase of root weight was up 141.56% with RPMK2 and shoots weight up to 57.98% with RSBK10 over uninoculated control.

## INTRODUCTION

Bacteria as biofertilizers, that can improve plant growth, have been known for decades and have been introduced into soil, on seeds or roots to improve plant growth and health (Raaijmakers *et al.*, 2002). Those bacteria that are beneficial for plant growth are called Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Kloepper *et al.*, 1980). This term includes those bacteria that induce plant growth, improving plant nutrition or producing plant growth regulators (Gutierrez-Manero *et al.*, 2000) as well as those preventing the attack of pathogenic microorganisms (Bowen and Rovira, 1999; Van Loon *et al.*, 1998). They are a heterogeneous group of bacteria that can be found

in the rhizosphere, on root surfaces (rhizoplane) and in association with roots (such as endophytic bacteria) (Joseph *et al.* 2007).

Mechanisms by which PGPR promote plant growth are not fully understood but are thought to include (i) antagonism against phytopathogenic microorganisms by production antibiotics and cyanide (Flaishman *et al.*, 2001) and siderophores (Scher and Baker, 2006) (ii) the ability to produce or change the concentration of plant growth regulators like indole acetic acid, gibberellic acid, cytokinins and ethylene (Arshad and Frankenberger, 1992) (iii) asymbiotic  $N_2$  fixation (Boddey and Dobereiner, 2000), (iv) solubilization of mineral phosphates and other nutrients (De Freitas *et al.*, 2007). Most popular bacteria studied and exploited as PGPR agent

---

\*Corresponding author's email: Bouznadahcene@yahoo.fr

belongs to the species of fluorescents *Pseudomonas* and *Bacillus* spp.

In order to make its cultivation sustainable and less dependent on chemical fertilizers it is highly important to master the use microorganisms that can contribute to the improvement of plant growth.

Tomato (*Lycopersicon esculentum* L) is the most important staple food in Algeria, and chemical fertilizers are the most important input required for its cultivation (Snoussi, 2010). The cultivation of this plant occupies 63.06% of the area of arable land in Algeria representing 8.33% of the national production of vegetable cultures (Anonymous, 2009). This culture is also affected by a set of bacterial and fungal diseases that generates large losses in crops. Although wilt resistant cultivars have been available for decades and provide some degree of control, the occurrence and development of new pathogenic races is a continuing problem. The treatment of these diseases is most often achieved through the use of phyto-chemicals that even if they give immediate results can cause long-term harm to soil and the consumer. In order to make its cultivation sustainable and less dependent on chemical fertilizers it is highly important to master the use microorganisms that can contribute to the improvement of plant growth.

Hence, the present study, aimed at isolating free living and endophytic rhizobacteria (*Pseudomonas* and *Bacillus* species) from rhizosphere soils, root surface and inner tissues of tomato root with antagonistic activity towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) bearing multiple plant-growth promoting traits and further asses their inoculation effect on growth of tomato seedlings under greenhouse conditions.

## MATERIAL AND METHODS

### Isolation of rhizobacteria

Rhizospheric, epiphytic and endophytic bacteria were isolated according to the procedures of Han *et al.* (2009). Heat treatment method described by Walker *et al.* (1998) was used for isolation of *Bacillus* to bias the selection towards spore-forming bacteria.

In all cultivation experiments, the agar plates were incubated in the dark for 3 days at 28°C. Based on the colony characteristics, single colonies were selected and stored in 15% glycerol at 20°C for further study.

The bacterial isolates were afterward characterized to the species level on the basis of

cultural conditions, morphological and biochemical characteristics tests.

### In vitro antagonism test

All the isolated bacteria (rhizospheric, epiphytic and endophytic) were evaluated for their in vitro antagonistic activity against F.O.L. Bacterial isolates were incubated in broth medium (LB or KB based on the medium from which they were isolated) at 25°C during 24 h. Aliquots of 100 µL of each growing bacterial culture were placed at approximately 3 mm on the edge of the plate and incubated for 24 h. A 5-mm plug from the leading edge of a 5-days-old culture of the fungal pathogen (F.O.L) was placed at the centre of a 9-cm diameter Petri dish containing PDA.

Percentage of growth inhibition was calculated by the following equation:  $100 \times (R1 - R2) / R1$ , where R1 represents the radius of the colony of F.O.L in the direction with no bacterial colony and R2 is the radius of the fungal colony in the direction of the bacterial colony.

### Production of HCN

The production of HCN was determined according to the method of Liu *et al.*, (2010). Briefly, overnight culture of each strain was spread on LB agar containing glycine (4.5 g L<sup>-1</sup>). A sterilized filter paper saturated with 1% solution of picric acid and 2% sodium carbonate was placed in the lid of the Petri dish. The Petri dish was then sealed and incubated at 28°C for 4 days. A change in color of the filter paper from yellow to reddish brown is an indication of cyanogenic activity.

### Screening for siderophore producing activity

The protocol of King *et al.* (1954) was used for fluorescence production. Bacteria were streaked on King's B agar and incubated at 28°C for 48 h. At the end of the incubation, the plates were observed under UV light for production of fluorescence. Fluorescence pigment formed was considered as an indication of siderophore production (Teintze *et al.*, 1981; Yasmin *et al.*, 2009). Each test was replicated three times.

### Characterization of rhizobacteria PGPR traits

#### Production of indole acetic acid

Indole acetic acid (IAA) production was detected as described by Brick *et al.*, (1991). Bacterial cultures were grown for 48h at 28°C on Luria-burtani medium supplemented with 10 mg/ml of L-

tryptophan. The cultures were centrifuged at 6000 rpm for 20 min. The supernatant (2ml) was mixed with two drops of orthophosphoric acid and 4ml of the Salkowski reagent (50ml, 35% of perchloric acid, 1 ml 0.5M FeCl<sub>3</sub> solution). Development of pink colour indicates IAA production. The absorbance of the pink color was measured spectrophotometrically at 530 nm. The IAA concentration in the culture was determined by using a calibration curve of pure IAA (Hi-media) as a standard obtained in the range of 10–100 mg/ml. There were three replicates in this experiment.

#### Phosphate solubilization and phosphate solubilizing index (PSI)

All the isolates were screened for their phosphate-solubilizing ability on Pikovskaya agar (Pikovskaya, 1948). Bacterial isolates were streaked on Pikovskaya agar and incubated for 72 h at 28°C. Appearance of clear halo zone indicates positive phosphate solubilization ability.

The solubilizing activity of the most effective strains was expressed as phosphate solubilization Index (PSI) calculated from the following formula:

$PSI = \frac{\text{total diameter (colony + halo zone)}}{\text{colony Diameter}}$

#### Production of ammonia

Bacterial isolates were tested for the production of ammonia in peptone water. Freshly grown cultures were inoculated in 10ml peptone water in each tube and incubated for 48-72h at 28°C. Nessler's reagent (0.5 ml) was added in each tube. Development of brown to yellow colour was a positive for ammonia production (Cappuccino and Sherman, 2005).

#### Phytopathogen agents

The fungal phytopathogen of tomato plant, *FOL* used for the present investigation was obtained from Microbiology and plant biology laboratory (Mostaganem university, Algeria). The culture was maintained on potato dextrose agar medium at 28°C with regular subculturing at an interval of 1 month.

#### Evaluation of bacterial isolates for growth promotion

The effect of isolated strains on plant growth was studied in pot experiments. The inoculation treatments were setup in a randomized design with three replicates.

Tomato seeds, from the Saint Pierre cultivar purchased from a local agency, were surface

sterilized for 30 s in ethanol (75°) and this was followed by 3 min dipping in 2% NaClO. They were then washed three times in sterile water. Three surface sterilized seeds/pot were sown in a 12cm x 10 cm diameter pot containing steam-pasteurized soil-manure mixture (3:1). Three repetitions were made per strain.

The sown seeds were watered regularly until the emergence of the first shoot. Five days later, 30ml of the bacterial inoculum (10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup>cfu/ml, concentration was adjusted with a spectrophotometer, to OD<sub>540</sub> = 0.2) was applied to the pots as a soil drench and a second application was made one week later. Until the starvation, the pots were watered daily. Growth promoting ability of the bacterial isolates was determined based on the data collected on shoot height, shoot dry and fresh weight, root length and root dry weight.

#### Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) and means comparison tests were performed using Mintab version 14 statistical package (free trial).

## RESULTS AND DISCUSSION

Use of the rhizosphere microorganisms to promote plant growth and to control plant diseases continues to be an area of rapidly expanding research in agriculture as it is of the most appropriate alternative to usage of chemical fertilizers, pesticides. In this study, one hundred and nine strains have been isolated from three levels sites of the tomato rhizosphere. The rizospheric strains were represented by 23% while the epiphytic and the endophytic were represented by 22% and 40% respectively (Tables 1,2,3). The distribution of isolated strains according to their origin and their reaction vis a vis the Gram stain are presented in Fig. 1 and the results don't show the dominance any of the groups. On the other hand, according to the morphological and biochemical tests, 43% of the total number has been identified as *Pseudomonas* sp and 56% belonging to *Bacillus* species. Isolation of bacteria from within the rhizosphere of the target crop is essential for successful identification of potential PGPR agents (Williams and Asher, 1996). This approach may also provide an opportunity to select effective PGPR strains capable of the roots colonization at population densities efficient to produce the beneficial effects and antagonizing soil-borne pathogens in the same environment where

they will be used commercially (Landa *et al.*, 1997).

The bacterial strains previously isolated were screened in a preliminary test for their antagonistic activity against *FOL* by plate assay technic with three different strains by plate. For 54% of the total strains tested there was no direct contact between fungal mycelium and bacterial colonies. The PDA medium used for dual cultures is rich in nutrients thus the competition for nutriment might be excluded, so that the clear inhibition zone observed might be linked to production of substances that diffused into the agar medium (Ahmed idriss *et al.*, 2007). For the calculation of the inhibition rate, each antagonist strain was individually tested against

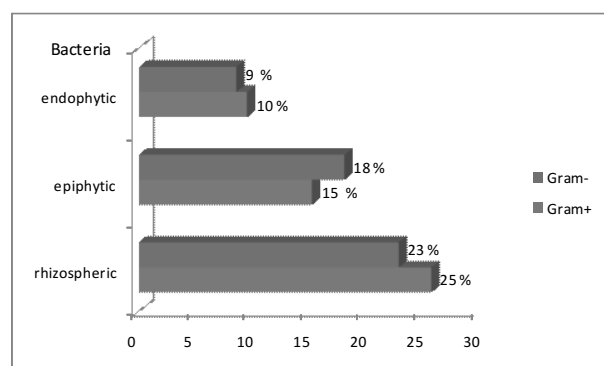


Fig. 1. Distribution of the microbial strains according to the Gram staining in the three rhizosphere levels.

F.O.L (Fig. 2). The degree of inhibition observed varies depending on the nature of strains, ranging between 31% for RPSK45 isolate and 78% for ERL3. This suggests that not only the nature of the antifungal metabolite produced by the isolate may be chemically different from one strain to strain but also that the producing bacterial isolates are taxonomically different (Williams and Asher, 1996). The *in vitro* antagonistic activity of the rhizospheric isolates, vary from 0.23% to 77.78% (Fig. 2), of which the best performing strains were RSML37, RSMK45, RSSBL3 and RSSBK9. The antagonistic activity of the strains isolated from the rhizoplane is presented in the (Fig. 3). In this case the majority of the strains have shown an inhibitory effect ranging between 40% and 56.56%. The most active of them were RPMK3 and RPMK4 with 56.56%. The endophytic strains have shown higher activities than presented either by the rhizospheric or by the epiphytic strains, the most important of them were ERL3 and ERK10 with an inhibition percentage of 78% and 73.11% respectively (Fig. 4). These results are in line with the results of Yang *et al.* (2011) who found that from 72 strains isolated from the tomato rhizosphere, 48 isolates have had an inhibition rate ranging between 50% to 78%.

HCN (cyanhydric acid) and siderophore are other mechanisms by which rhizobacteria exert their

Table 1. Origin and screening of PGPR activities of microbial strains isolated from the rhizoplane of tomato.

Strain	Culture medium	Gram Stain	shape	Siderophore	P.sol	IAA ( $\mu\text{g/ml}$ )	HCN	NH <sub>3</sub>	
RPRL13	LB	-	rod	+	+	23,86 <sup>l</sup>	-	+	<i>P. putida</i>
RPRL14	LB	-	rod	-	-	40,83 <sup>h</sup>	-	+	<i>B. stearoothermophilus</i>
RPML19	LB	+	rod	-	+	91,97 <sup>c</sup>	-	+	<i>B. laterosperus</i>
RPML21	LB	+	cocci	-	+	41,39 <sup>g</sup>	-	+	ND
RPML29	LB	-	rod	-	-	35,33 <sup>k</sup>	-	+	ND
RPML30	LB	+	rod	-	+	37,94 <sup>i</sup>	-	+	<i>B. stearoothermophilus</i>
RPMK26	KB	+	rod	-	-	95,44 <sup>a</sup>	+	+	<i>B. stearoothermophilus</i>
RPMK25	KB	-	rod	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas sp</i>
RPMK2	KB	-	rod	+	+	88,17 <sup>d</sup>	-	+	<i>Pseudomonas sp</i>
RPMK3	KB	+	rod	-	+	-	-	+	ND
RPMK4	KB	+	rod	-	-	62,64 <sup>e</sup>	-	+	ND
RPMK14	KB	-	rod	-	-	44,5 <sup>f</sup>	-	+	<i>Pseudomonas sp</i>
RPMK16	KB	-	rod	-	+	-	-	+	ND
RPML23	LB	-	rod	-	+	-	-	+	<i>Pseudomonas sp</i>
RPML24	LB	-	rod	-	-	94,5 <sup>b</sup>	-	+	<i>Pseudomonas sp</i>
RPML10	LB	+	rod	+	+	19,67 <sup>l</sup>	-	+	<i>P. fluorescens</i>
RPML11	LB	+	rod	-	+	36,36 <sup>j</sup>	-	+	<i>B. stearoothermophilus</i>
RPMK17	KB	-	rod	+	-	-	-	+	<i>P. putida</i>

\*Means (of three replications) that do not share a letter are significantly different

+: production, -: absence of the character, ND: not identified, KB: king, P. sol: phosphate solubilization

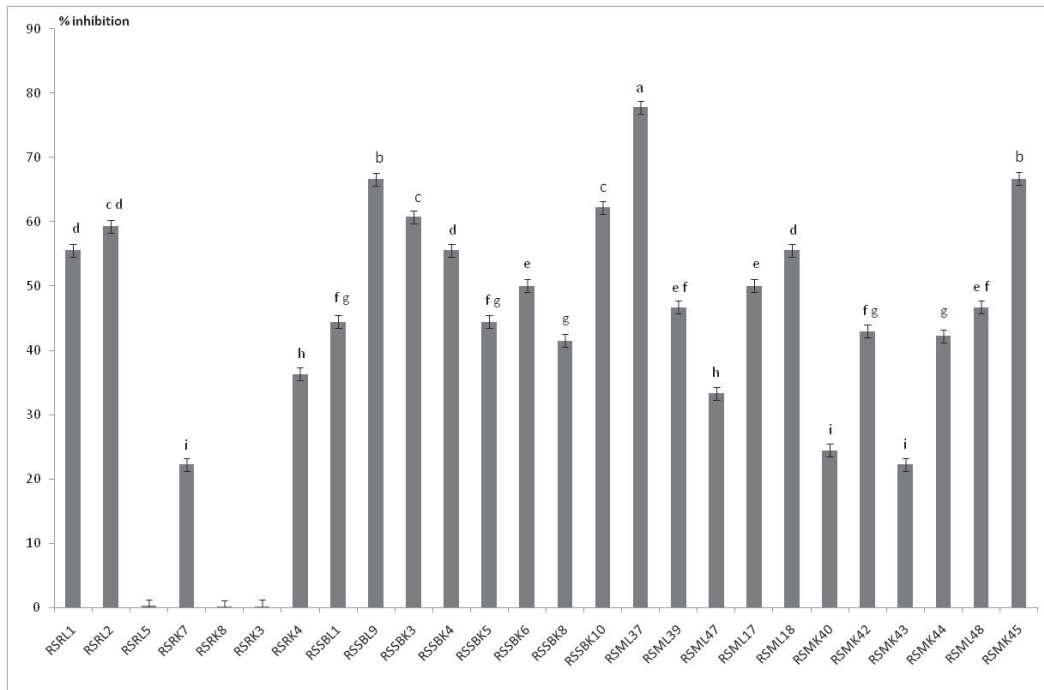


Fig. 2. Extent of antagonistic activity of isolates isolated from the rhizospheric soil of tomato plant against FOL.

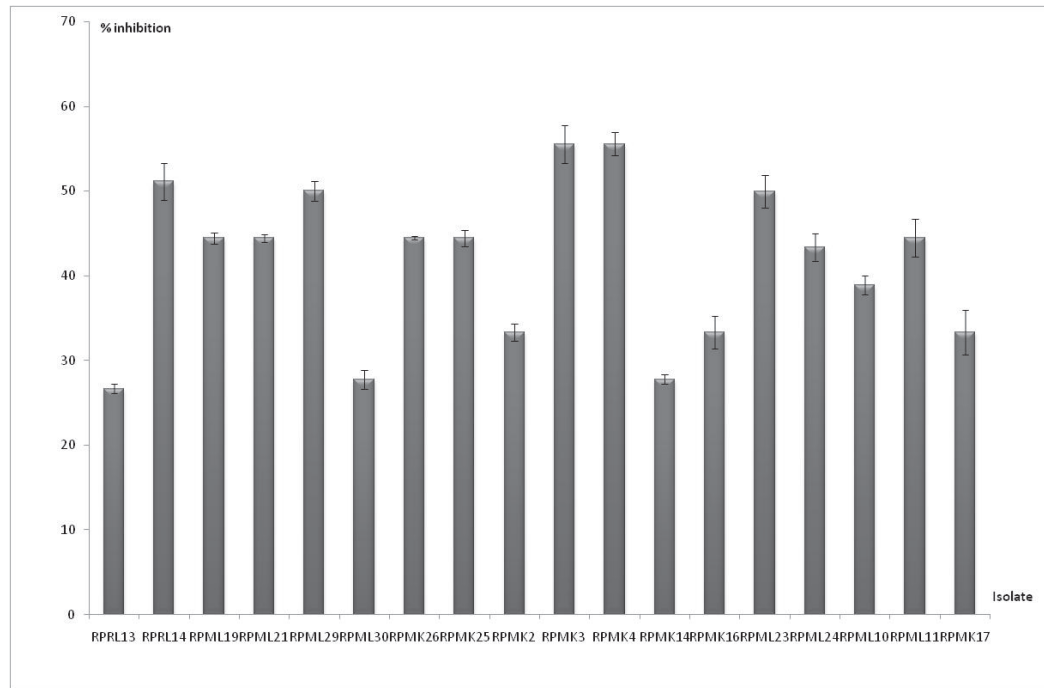


Fig. 3. Extent of antagonistic activity of isolates isolated from the rhizoplane of tomato plant roots against FOL.

suppressive action on soil-borne pathogens. These two characters were detected in 15.25% of strains exhibiting for HCN production (Fig. 2) and 22.03% for the production of siderophores (Fig. 2f). Several authors have reported that HCN is produced by

many rhizobacteria including *Pseudomonas* and *Bacillus* species (Bakker and Schippers, 1987) and it has been proposed as a defense regulator against many phytopathogens (Blumer and Haas, 2000). The lack of the HCN is sometimes considered as PGPR

traits because these substances are harmful for plant growth promotion (Agrawal and Agrawal, 2013). The production of siderophore detected in 22.03 % of the total isolates was mainly present in strains belonging to the *Pseudomonas* genus. The role of siderophore in biocontrol activity is well established since considered as the main tools used in nutrient competition in the rhizosphere. The presence of a few number of HCN and siderophore producers may suggest that the production of antibiotics like substances may be the main mechanisms involved in the antagonism activity exhibited by the majority of the isolates.

In addition to their antagonistic activity towards pathogen agents, the rhizobacteria are often studied for their plant promotion traits including production of phytohormones, fixation of atmospheric nitrogen and solubilization of minerals such as phosphorus and iron. The exploration of these traits has been achieved on strains presenting such an antagonistic activity towards *FOL*. The

results for the production of IAA indicate that the substance is present in 61%, 72% and 80% for the rhizospheric, endophytic and epiphytic strains respectively (Table 1,2,3). These results have been also mentioned by Patten and Glick (2002) who reported that 80% of soil bacteria possess IAA producing potential. The prevalence of the epiphytic strains, in our case, as good producers of the phytohormone may be explained by the availability of the IAA precursors in vicinity of the plant root system. Although Glick and Bashan (1997) reported that isolates from rhizosphere are more efficient auxin producers than isolates from the bulk soil. Varying amounts of bacterial IAA have been obtained during this study. The highest IAA value (94.5 µg/ml) has been produced by the epiphytic RPML24 strain (Table 1) and the lowest (19.79 µg/ml) obtained by RSMK43 of rhizospheric origin (Table 2). Different concentrations of IAA, produced by a myriad of PGPR strains, have been reported by many researchers (Kaur and Sharma, 2013).

**Table 2.** Origin and screening of PGPR activities of microbial strains isolated from the rhizosphere of tomato.

Isolate	Culture medium	Gram stain	Cell shape	Siderophore	P.sol.	IAA (µg/ml)	HCN	NH <sub>3</sub>	
RSRL1	LB	-	cocci	-	-	-	-	+	ND
RSRL2	LB	-	rod	-	+	39,33 <sup>f</sup>	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp
RSRL5	LB	+	rod	-	+	-	-	+	<i>B. stearothermophilus</i>
RSRK7	KB	-	rod	+	+	31,06 <sup>i</sup>	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp
RSRK8	KB	+	rod	-	+	-	-	+	ND
RSRK3	KB	+	rod	-	+	32,36 <sup>i</sup>	-	+	ND
RSRK4	KB	-	rod	+	-	27,25 <sup>k</sup>	-	+	<i>P. putida</i>
RSSBL1	LB	-	rod	-	+	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp
RSSBL9	LB	+	rod	-	-	-	-	+	<i>B. stearothermophilus</i>
RSSBK3	KB	-	rod	+	+	44,19 <sup>e</sup>	+	+	<i>P. fluorescens</i>
RSSBK4	KB	-	rod	+	+	29,03 <sup>j</sup>	+	+	<i>P.aerogenosa</i>
RSSBK5	KB	-	rod	-	+	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp
RSSBK6	KB	-	rod	+	-	40,33 <sup>f</sup>	+	+	<i>P.aerogenosa</i>
RSSBK8	KB	+	rod	-	-	70,5 <sup>a</sup>	-	+	ND
RSSBK10	KB	-	rod	-	+	47,72 <sup>d</sup>	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp
RSML37	LB	+	rod	-	-	28,56 <sup>k</sup>	-	+	<i>B. stearothermophilus</i>
RSML39	LB	-	rod	-	-	34,14 <sup>h</sup>	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp
RSML47	LB	+	rod	-	-	-	-	+	<i>B.subtilis</i>
RSML17	LB	+	rod	-	-	39,42 <sup>f</sup>	-	+	<i>B. laterosperus</i>
RSML18	LB	-	rod	-	+	37,58 <sup>g</sup>	-	+	<i>P.putida</i>
RSMK40	KB	-	rod	-	+	51,94 <sup>c</sup>	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp
RSMK42	KB	+	rod	-	+	27,47 <sup>k</sup>	-	+	<i>B. stearothermophilus</i>
RSMK43	KB	-	rod	+	+	19,79 <sup>l</sup>	+	+	<i>P.aerogenosa</i>
RSMK44	KB	-	rod	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp
RSML48	LB	-	rod	-	-	-	-	-	ND
RSMK45	KB	+	rod	-	-	-	-	-	ND

\*Means ( of three replications) that do not share a letter are significantly different.

+: production, - : absence of the character, ND: not identified, KB: king, P. sol: phosphate solubilization

Ashrafuzzaman et al. (2009) has reported that the IAA production was influenced by cultural conditions, growth stage and tryptophan availability.

The phosphate solubilization ability was detected in 33%, 55% and 57% of the endophytic, epiphytic and rhizospheric isolates respectively (Table 1,2,3). It appears that the rhizosphere and epiphytic isolates are more effective in the solubilization of phosphate than endophytic ones, probably due to an adaptation acquired by their presence in a rich

source of insoluble phosphate medium with respect to the roots inside tissues where the substrate is less available. It is reported that the phosphate solubilization activity is affected by time and conditions of microorganisms' growth (Nahas, 2003). Thus, fifteen phosphate solubilizing strains have been selected to measure the effect of incubation period on the variability of the solubilization ability (in term of PSI) of the different isolates. The results demonstrate that all the strains selected displayed a PSI ranging between 1.5 and

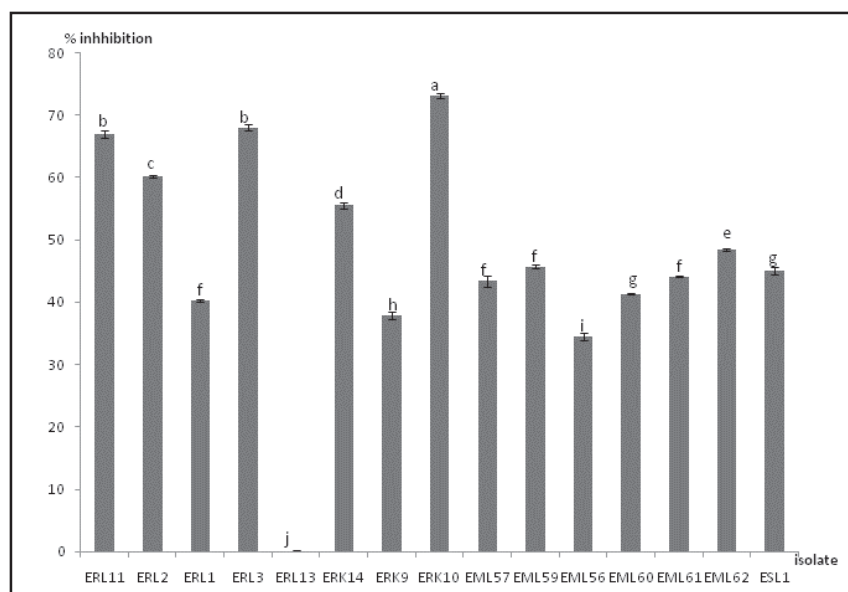


Fig. 4. Extent of antagonistic activity of isolates isolated roots against FOL

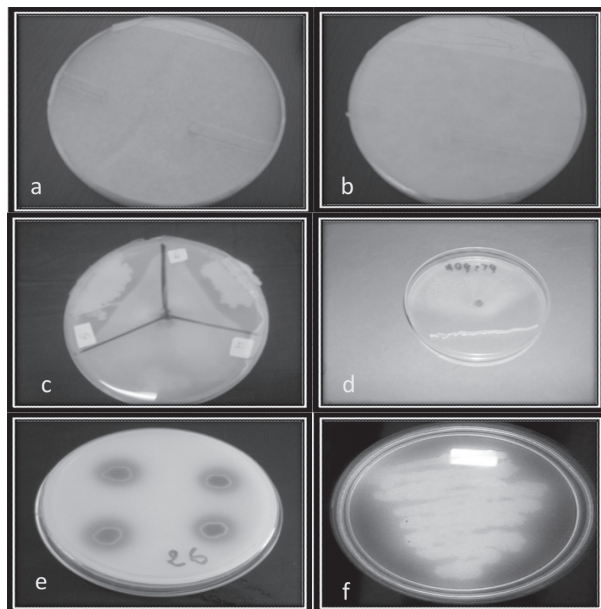
Table 3. Origin and screening of PGPR activities of endophytic strains isolated from the tomato roots.

Isolate	Culture medium	Gram stain	shape	Siderophore	P.Sol.	IAA (µg/ml)	NH <sub>3</sub>	HCN	
ERL11	LB	+	rod	-	-	-	+	-	<i>B. mycooides</i>
ERL2	LB	-	rod	+	-	58,22 <sup>c</sup>	+	-	<i>P. putida</i>
ERL1	LB	+	rod	-	+	-	-	-	ND
ERL3	LB	+	rod	-	-	60,47 <sup>b</sup>	+	-	<i>Bacillus sp</i>
ERL13	LB	+	rod	-	-	45,31 <sup>d</sup>	+	-	<i>Bacillus sp</i>
ERK14	KB	-	rod	-	-	-	+	+	<i>P. oryzo-habitans</i>
ERK9	KB	-	rod	-	+	-	+	-	<i>Pseudomonas sp</i>
ERK10	KB	-	rod	-	+	62,28 <sup>a</sup>	+	+	<i>Pseudomonas sp</i>
EML57	LB	+	rod	-	+	33,33 <sup>g</sup>	+	-	<i>Bacillus sp</i>
EML59	LB	-	rod	-	-	-	-	-	ND
EML56	LB	-	rod	-	-	32,14 <sup>g</sup>	+	-	<i>Pseudomonas sp</i>
EML60	LB	-	rod	-	+	29,39 <sup>h</sup>	+	-	<i>Pseudomonas sp</i>
EML61	LB	+	rod	-	-	39,22 <sup>e</sup>	+	-	<i>Bacillus sp</i>
EML62	LB	+	rod	-	-	33,67 <sup>f</sup>	+	-	<i>Bacillus sp</i>
ESL1	LB	-	rod	-	-	24,86 <sup>i</sup>	+	-	<i>Bacillus sp</i>

\*Means (three replications) that do not share a letter are significantly different.

+: production, - : absence of the character, ND: not identified, KB: king, P. sol: phosphate solubilization

2.78 (Fig.3) and this parameter is dependent on incubation period. The max value has been reached after 14 days of incubation. Similar results have been obtained by Kaur and Sharma (2013) who reported that maximum amounts of phosphorus (6.40 mg/100ml) have been obtained by a reference *Pseudomonas* sp. LK884 strain after 12 days after which a decline in the production was observed. All the isolates were able to produce ammonia and catalase. Ammonia is often considered an important



**Fig. 5.** Different plant growth promoting activities of rhizobacteria isolated from tomato rhizosphere (a: HCN production, b: HCN production control, c, d: antagonistic activity vs FOL, e: inorganic phosphate solubilization, f: fluorescence production).

trait of PGPR that may indirectly influence the plant growth. The accumulation of ammonia in soil may increase in pH creating alkaline condition of soil at pH 9-9.5. It suppresses the growth of certain fungi and nitrobacteria due to its potent inhibition effect.

Study of tomato plant growth under the influence of seven PGPR isolates has been undertaken to investigate the effect of these PGPR on the promotion of the plant growth. All the PGPR isolates shown increased growth of plant in terms of root length, shoot length, and dry weight (Table 4). The highest percentage increase in root weight over control has been observed with RPMK2 (141%) followed by RPMK26 (96%). Both strains are epiphytic and are high-producers of IAA, 88.17 µg/ml and 95.44 µg/ml respectively. A positive effect of the RPMK26 strain over the shoot length has been also recorded. The effect of IAA over the promotion of the root growth is reported by many investigations (Agrawal and Agrawal, 2013; Malleswari and Bagyanarayana, 2013). Ahmad and *al.* (2005) reported that the effects of auxins on plant seedlings are concentration dependent and different plant seedlings respond differently to variable auxin concentrations and type of microorganisms. The percentage of shoot dry weight increase was less significant and it varies between 21% and 58%. The highest percentage increase was recorded with RSBK10 (57.98%) followed by RPMK26 (46.70%). The length of shoot plants was the parameter less affected by isolates inoculation ( $F=1.37$ ), it ranges from 19cm to 28.81cm. These results show that the effect of bacterial inoculation on the growth parameters is not mainly due to the IAA production

**Table 4.** Evaluation of the most potential rhizobacteria isolates for their growth plant promoting effects on tomato plants under greenhouse conditions

	Root length (cm)	Shoot height (cm)	Shoot dry Weight (mg)	Root dry Weight (mg)	% shoot weight increase over control	% root weight increase over control
Control	5,38 <sup>c</sup>	17,24 <sup>b</sup>	241,79 <sup>f</sup>	138,10 <sup>f</sup>		
RPMK26	8,41 <sup>a</sup>	19,51 <sup>ab</sup>	354,70 <sup>ab</sup>	271,40 <sup>b</sup>	46,70	96,52
RSBK10	6,62 <sup>abc</sup>	19,28 <sup>ab</sup>	381,97 <sup>a</sup>	231,63 <sup>cd</sup>	57,98	67,73
RPMK2	8,20 <sup>a</sup>	19,69 <sup>ab</sup>	270,00 <sup>de</sup>	333,60 <sup>a</sup>	11,67	141,56
RSBK3	7,50 <sup>ab</sup>	20,09 <sup>a</sup>	335,28 <sup>bc</sup>	225,77 <sup>de</sup>	38,67	63,48
ERK10	7,13 <sup>abc</sup>	19,09 <sup>ab</sup>	300,53 <sup>cd</sup>	246,70 <sup>c</sup>	37,92	78,64
RPML19	5,97 <sup>bc</sup>	19,00 <sup>ab</sup>	261,87 <sup>de</sup>	208,77 <sup>e</sup>	21,92	51,17
ERL2	7,47 <sup>ab</sup>	20,81 <sup>a</sup>	317,97 <sup>bc</sup>	218,73 <sup>de</sup>	48,04	58,39
Mean	7,07	19,34	308,01	234,34		
Effect (Fisher value/P)	2.5/<0.05 (H.S)	1.37/<0.05 (H.S)	12.65/<0.05 (H.S)	76.72/<0.05 (H.S)		

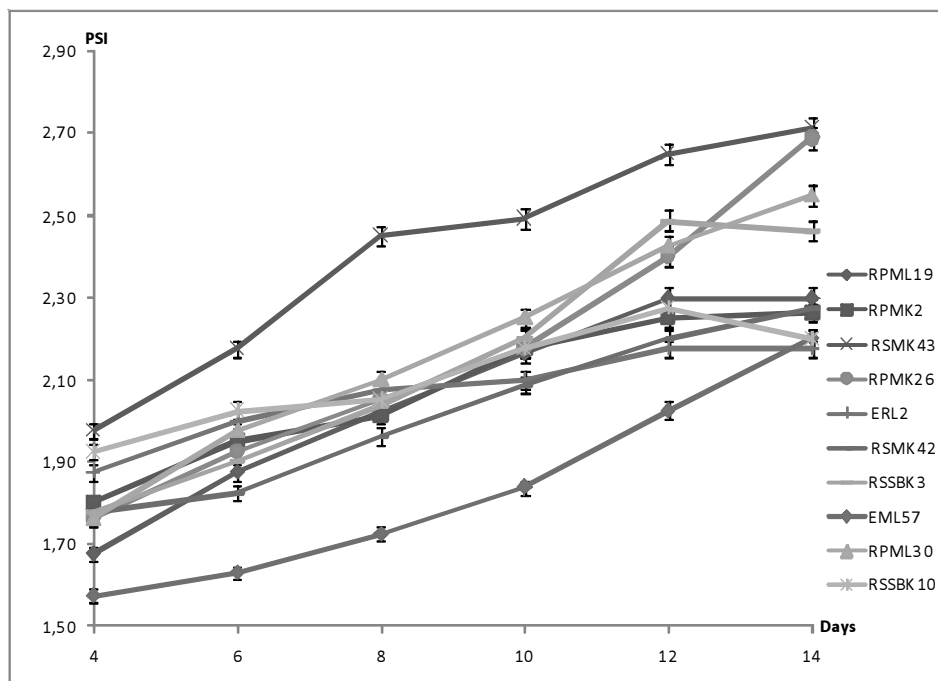


Fig. 6. Effect of incubation time on the solubilization index of microbial isolates solubilizing inorganic phosphate

but also to the other traits such phosphate solubilization ability, production of ammonia or antagonistic activity towards deleterious microorganisms. It seems also that the origin the PGPR isolation has not shown a significant effect on the strain performance since either rhizospheric or epiphytic and endophytic PGPR have exhibited the same growth promotion effect on the tomato plant.

## REFERENCES

- Anonymous 2009. MADR (Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural). In : Snoussi S.A., 2010. Etude de base sur la Tomate en Algérie, Rapport de mission, « Programme régional de gestion intégrée des ravageurs pour le Proche-Orient » Projet GTFS/REM/070/ITA, Organisation Des Nations Unies Pour L'alimentation Et L'agriculture Rome. p. 52.
- Agrawal, D.P.K. and Agrawal, S. 2013. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) for their use as potential plant growth promoting rhizobacteria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2 (10) : 406-417
- Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of azotobacter and fluorescent pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. *Tunk. J. Biol.* 29 : 29-34.
- Ahmed Idriss, H., Labuschagne, N. And Korsten, L. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control.* 40 : 97-106.
- Arshad, M. and Frankenberger, Jr.W.T. 1992. Microbial production of plant growth regulators, In: *Soil Microbial Ecol.* Ed. Metting FB Jr, Marcel Dekker Inc., New York. pp 307-347.
- Ashrafuzzaman, M., Hossen, F.A., Ismail, M.R., Hoque, M.A., Islam, Z.M., Shahidullah, S.M. and Meon, S. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology.* 8(7):1247-1252.
- Bakker, A.W. and Schippers, B. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. *Soil Biol. Biochem.* 19 : 451-457.
- Blumer, C. and Haas, D. 2000. Mechanism, regulation and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology.* 173: 170-177.
- Boddey, R.M. and Dobereiner, J. 2000. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Fert. Res.* 42:241-250
- Bowen, G.D. and Rovira, A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy.* 66 : 1-102.
- Brick, J.M., Bostock, R.M. and Silverstone, S.E. 1991. Rapid *in situ* assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 535-538.
- Cappuccino, J.C. and Sherman, N. 2005. *Microbiology-A Laboratory manual*, 7th Edn., Pearson Int., Ontario, Canada. pp: 125-179
- Chitra, R.S., Sumitra, V.C. and Yash, D.S. 2002. Effect of

- different nitrogen sources and plant growth regulators on glutamine synthetase and glutamate synthase activities of radish cotyledons. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 28 : 46-56.
- De Freitas, J.R., Banerjee, M.R. and Germida, J.J. 2007. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola. *Boil. Fertile. Soil*. 24 : 358-364.
- Flaishman, M.A., Eyal, Z.A., Zilberstein, A., Voisared, C. and Hass, D. 2001. Suppression of septoria tritici blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide producing strains of *Pseudomonas putida*. *Mol. Plant Microbe Interacts*. 9 : 642-645.
- Glick, B.R. and Bashan, Y. 1997. Genetic manipulation of plant growth promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv.* 15: 353-378.
- Gutierrez-Manero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehrouachi, J., Tadeo, F.R. and Talon, M. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant* 111 : 206-211
- Han, J., Xia, D., Li, L., Sun, L., Yang, K., Zhang, L. 2009. Diversity of culturable bacteria isolated from root domains of Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Microb. Ecol.* 58 : 363-373.
- Joseph, B., Ranjan Patra, R. and Lawrence, R. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*. 1: 141-151
- Kaur, N. and Sharma, P. 2013. Screening and characterization of native *Pseudomonas* sp. as plant growth promoting rhizobacteria in chickpea (*Cicer arietinum* L.) rhizosphere. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7 : 1465-1474.
- King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 44 (2) : 301-307.
- Klopper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286: 885-886.
- 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 : 305-318.
- Liu, X., Jia, J., Atkinson, S., Camara, M., Gao, K., Li, H. and Cao, J. 2010. Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 : 1465-1471.
- Malleswari, D. and Bagyanarayana, G. 2013. *In vitro* screening of rhizobacteria isolated from the rhizosphere of medicinal and aromatic plants for multiple plant growth promoting activities. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 3(1) : 84-91.
- Nahas, E. 2003. Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, E. Velazquez and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). 111-115.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 : 3795-3801.
- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologia* 17 : 362-370.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M. and De Souza, J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81 (1-4) : 537-547.
- Scher, F.M. and Baker, R. 2006. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*. 72 : 1567-1573.
- Snoussi, S.A. 2010. Etude de base sur la Tomate en Algérie, Rapport de mission, « Programme régional de gestion intégrée des ravageurs pour le Proche-Orient » Projet GTFS/REM/070/ITA, Organisation Des Nations Unies Pour L'alimentation Et L'agriculture, Rome. 52p.
- Teintze, M., Hossain, M.B., Baines, C.L., Leong, J. and Van Der Helm, D. 1981. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochem.* 20 : 6446-6457.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36 : 453-483.
- Walker, R., Powell, A.A. and Seddon, B. 1998. *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *J. Appl. Microbiol.* 84 : 791-801.
- Williams, G.E. and Asher, M.J.C. 1996. Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crop Prot.* 15 : 479-486.
- Yang, C., Zhang, X. and Shi, G. 2011. Isolation and identification of endophytic bacterium W4 against tomato *Botrytis cinerea* and antagonistic activity stability. *African Journal of Microbiology Research*. 5 (2): 131-136.
- Yasmin, F., Othman, R., Sijam, K. and Saad, M.S. 2009. Characterization of beneficial properties of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *Afr. J. Microbiol. Research*. 3 (11) : 815-821.