

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون  
Faculté des Sciences de la Nature et  
de la Vie et des Sciences de la Terre  
et de l'Univers



جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج  
Université Mohamed El Bachir El  
Ibrahimi Bordj Bou Arreridj

Département des Sciences Biologiques

Laboratoire de caractérisation et de valorisation des ressources naturelles

THÈSE

Présentée par

*Khalifa Meriem Wafaa*

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT**

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie

THÈME

**Interaction des rhizobactéries symbiotiques (*Rhizobium*) et  
bactéries antagonistes (*Pseudomonas* et *Bacillus*) avec l'agent du  
flétrissement fusarien du pois chiche**

Soutenue le : 22/09/2022

Devant le Jury composé de :

Président :	Dr. BOUBELLOUTA Tahar	Université Bordj Bou Arreridj
Directeur :	Pr. ROUAG Noureddine	Université Ferhat Abbas Sétif 1
Examineur :	Dr. MOUATASSEM Dahou	Université Bordj Bou Arreridj
Examineur :	Dr. BENDIF Hamdi	Université Mohamed Boudiaf M'sila
Examineur :	Dr. BENSOUILAH Taquieddine	Université Bordj Bou Arreridj

Année universitaire : 2021/2022

## **Remerciements**

*Tout d'abord, je tiens à écrire un « MERCI » sincère à mon promoteur, Pr. Rouag Noureddine, qui je lui dois tout mon respect et ma considération. Mes mots ne seront jamais suffisants pour lui exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Je le remercie de tout mon cœur pour le soutien dont il a fait preuve à mon égard, tout au long de ma formation. Je le remercie aussi d'avoir enrichi mes connaissances et de m'avoir toujours guidée. Je salue son amabilité, sa patience, sa disponibilité, sa souplesse d'esprit et son savoir. Qu'il sache qu'il restera mon exemple, et que je suis très fière d'être l'étudiante d'un professeur aussi exceptionnel.*

*Je tiens à remercier chaleureusement Dr. Boubellouta Tahar, Doyen de la Faulté FSNV-STU, qui a gracieusement accepté de présider le jury, mais aussi pour ses encouragements. Que Dr. Mouatassem Dahou, Dr. Bendif Hamdi, et Dr. Bensouilah Taquieddine trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de participer à l'expertise de cette thèse et pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.*

*Je tiens à remercier vivement Dr. Mariem Bouhadida de l'INRAT Tunis, Laboratoire des grandes cultures pour l'accueil chaleureux au sein de son laboratoire, pour son assistance pertinente et son soutien continu.*

*Je tiens également à remercier Dr. Dekkiche Samia, enseignante à l'université Hadj Lakhder de Batna pour son aide précieuse.*

*Un merci très spécial au Pr. Ouzari Imene du laboratoire de microorganismes et biomolécules actives, Faculté des sciences de Tunis, Université El Manar, qui m'a permis d'effectuer les analyses de biologie moléculaire au sein de son laboratoire.*

*J'adresse tous mes remerciements au Pr. Ahcene Hakem, enseignant à l'université Ziane Achour de Djelfa pour son support et ses recommandations bienveillantes.*

*Je tiens également à remercier Dr. Yabrir Benalia, enseignant à l'université Ziane Achour de Djelfa pour son aide précieuse.*

*Ces remerciements seraient incomplets s'ils ne mentionnaient pas tous les membres de ma famille qui m'ont soutenu durant cette recherche.*

*Mes remerciements les plus sincères s'adressent à tous les ingénieurs du laboratoire de Biologie de l'université Ziane Achour de Djelfa.*

*Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche.*

*Meriem wafaa*

## **Interaction des rhizobactéries symbiotiques (*Rhizobium*) et bactéries antagonistes (*Pseudomonas* et *Bacillus*) avec l'agent du flétrissement fusarien du pois chiche**

### **Résumé**

L'objectif du présent travail est l'étude du pouvoir antagoniste des rhizobactéries envers le *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceris* (Foc) et leur effet stimulateur de la croissance de la culture du pois chiche. L'effet antifongique des rhizobactéries a été évalué *in vitro* contre deux souches Foc, codées Foc-S1 et Foc-S2. Parmi les *Pseudomonas*, les souches E1FP13, E1FP4, et E1PP7 ont été les plus efficaces contre Foc-S1, tandis que les souches E1PP6, E1FP13, et E1PP15 ont été les plus efficaces contre Foc-S2. Concernant les isolats *Bacillus*, les souches E2PB1, E1PB10, et E1PB6 ont été les plus efficaces contre les deux Foc. Par ailleurs, l'examen microscopique a révélé que les bactéries ont provoqué des changements morphologiques dans la structure mycélienne, allant de la granulation et la condensation du cytoplasme à la fragmentation et gonflement des hyphes de Foc. L'appartenance des bactéries aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* a été confirmée à travers le séquençage du gène ARNr 16S et l'analyse phylogénétique. L'évaluation de la production des composés favorisant la croissance des plantes a montré que les souches bactériennes étaient capables de solubiliser le phosphate et de produire l' $\alpha$ -amylase, la lipase, la protéase, la cellulase, le cyanure d'hydrogène, l'acide indole acétique, l'ammoniac et les sidérophores. L'application (individuelle et en consortium avec *Sinorhizobium meliloti*) des souches bactériennes sur les grains de pois chiche a montré que les traitements étaient capables d'améliorer au moins deux des paramètres de croissance mesurés (longueur de la tige, longueur de la racine, poids sec de la tige et poids sec des racines). L'activité de biocontrôle des souches bactériennes a également été évaluée ; les résultats du test ont montré que la gravité de la maladie (GM) était significativement plus faible dans les plantes traitées par rapport aux témoins non traités inoculés par Foc-S1 et Foc-S2. Les résultats de la réduction de la maladie (RM) ont révélé que dans le groupe *Pseudomonas*, le traitement E1FP13c a enregistré la RM la plus élevée, soit 69,23 % dans les pots inoculés par Foc-S1 et 66,67 % dans les pots inoculés par Foc-S2. En ce qui concerne le groupe *Bacillus*, le traitement E1PB6c a été marqué par la plus haute RM égale à 78,85 % dans les pots inoculés par Foc-S1 tandis que le traitement E2PB1c a montré la meilleure RM égale à 76,67 % dans les pots inoculés par Foc-S2. Ceci a été conjugué avec une amélioration significative des paramètres de croissance des plantes par rapport aux témoins non traités. Les résultats de la présente étude suggèrent l'introduction des souches *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Sinorhizobium* dans le programme de protection des semences pour contrôler le flétrissement fusarien et améliorer la croissance des plantes de pois chiche.

**Mots clés :** Foc, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sinorhizobium*, Biocontrôle.

## **Interaction of symbiotic rhizobacteria (*Rhizobium*) and antagonistic bacteria (*Pseudomonas* and *Bacillus*) with the agent of Fusarium wilt of chickpea**

### **Abstract**

The objective of the present work is to study the antagonistic ability of rhizobacteria towards *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceris* (Foc) and their growth stimulating effect on chickpea crop. The antifungal effect of rhizobacteria was evaluated *in vitro* against two Foc strains, coded Foc-S1 and Foc-S2. Among *Pseudomonas*, strains E1FP13, E1FP4, and E1PP7 were the most effective against Foc-S1, while strains E1PP6, E1FP13, and E1PP15 were the most effective against Foc-S2. Regarding *Bacillus* isolates, strains E2PB1, E1PB10, and E1PB6 were the most effective against both Foc. Furthermore, microscopic examination revealed that the bacteria caused morphological changes in the mycelial structure, ranging from granulation and condensation of the cytoplasm to fragmentation and swelling of the Foc hyphae. The bacterial isolates were subjected to 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis and were confirmed as *Pseudomonas* and *Bacillus* species. The evaluation of the production of plant growth-promoting compounds showed that the bacterial strains were able to solubilize phosphate and produce  $\alpha$ -amylase, lipase, protease, cellulase, hydrogen cyanide, indole acetic acid, ammonia, and siderophores. Application of the bacterial strains (individually and in consortium with *Sinorhizobium meliloti*) on chickpea grains showed that the treatments were able to improve at least two of the measured growth parameters (shoot length, root length, shoot dry weight and root dry weight). The biocontrol activity of the bacterial strains was also assessed; the results of the test showed that the disease severity (DS) was significantly lower in the treated plants compared to the untreated controls inoculated with Foc-S1 and Foc-S2. The disease reduction (DR) results revealed that in the *Pseudomonas* group, the treatment E1FP13c registered the highest DR of 69,23 % in the pots inoculated with Foc-S1 and 66,67 % in the pots inoculated with Foc-S2. Concerning the *Bacillus* group, the treatment E1PB6c was marked with the highest DR equal to 78,85 % in the pots inoculated with Foc-S1 while treatment E2PB1c showed the best DR equal to 76,67 % in the pots inoculated with Foc-S2. This was coupled with an improvement in plant growth parameters compared to untreated controls. The results of the present study suggest the introduction of *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Sinorhizobium* strains in the seed protection program to control Fusarium wilt and improve chickpea plant growth.

**Keywords:** Foc, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sinorhizobium*, Biocontrol.

## تفاعل البكتريا الجذرية التكافلية (*Rhizobium*) والبكتيريا المضادة (*Pseudomonas and Bacillus*) مع عامل ذبول الفيوزاريومي للحمص

### ملخص

يهدف هذا البحث إلى عزل بكتيريا التربة الجذرية لنبات الحمص المنتمية لنوعي *Pseudomonas* و *Bacillus* و دراسة قدرتها الفردية و بالاتحاد مع *Sinorhizobium* على مكافحة الفطر (*Fusarium oxysporum* f.sp *ciceris* (Foc) بالإضافة إلى دراسة خصائصها في تعزيز نمو النبات. تم تقييم التأثير المضاد للفطريات للبكتيريا في المختبر ضد سلالتين من Foc ، سميتا ب Foc-S1 و Foc-S2. بين *Pseudomonas*، كانت السلالات E1FP4، E1FP13، و E1PP7 هي الأكثر فعالية ضد Foc-S1، بينما كانت السلالات E1FP6، E1FP13، و E1PP15 هي الأكثر فعالية ضد Foc-S2. فيما يتعلق بعزلات *Bacillus*، كانت السلالات E2PB1، E1PB10، و E1PB6 هي الأكثر فعالية ضد كل من Foc-S1 و Foc-S2. كشف الفحص المجهرى لتأثير البكتيريا على Foc أن السلالات تسببت في تغيرات شكلية في الفطر ، تتمثل في تحبيب وتكثيف السيتوبلازم و تفتيت وانتفاخ الخيوط الفطرية. تم تأكيد انتماء البكتيريا الى نوعي *Pseudomonas* و *Bacillus* من خلال تسلسل الجين rRNA16S والتحليل الفيلوجيني. أظهر تقييم إنتاج المركبات المعززة لنمو النبات أن السلالات البكتيرية كانت قادرة على إذابة الفوسفات وإنتاج ألفا الأميليز ، والليباز ، والبروتياز ، والسيليلاز ، وسيانيد الهيدروجين (HCN) ، وحمض الخليك الإندول 3 (AIA) ، والأمونيا و siderophores . تم تطبيق السلالات البكتيرية بشكل فردي و بالاتحاد مع *Sinorhizobium meliloti* على بذور الحمص لتقييم تأثيرها على نمو النبات. أظهرت نتائج التجربة أن جميع البكتيريا كانت قادرة على تحسين اثنين على الأقل من متغيرات النمو المقاسة (طول الساق وطول الجذر والوزن الجاف للساق والوزن الجاف للجذر). تم أيضاً تقييم نشاط مكافحة الحيوية للسلالات البكتيرية، وأظهرت نتائج الاختبار أن شدة المرض (GM) كانت أقل بشكل ملحوظ في النباتات المعالجة مقارنة بالشواهد غير المعالجة المصابة ب Foc-S1 و Foc-S2. أظهرت نتائج الحد من المرض (RM) أنه في مجموعة *Pseudomonas*، سجلت E1FP13c أعلى RM بنسبة 69,23 ٪ في النباتات المصابة ب Foc-S1 و 66,67 ٪ في النباتات المصابة ب Foc-S2. فيما يتعلق بمجموعة *Bacillus*، تميزت E1PB6c بأعلى معدل RM المساوي ل 78,85 ٪ في النباتات المصابة ب Foc-S1 بينما أظهرت E2PB1c أفضل RM بقيمة مساوية ل 76,67 ٪ في النباتات المصابة ب Foc-S2. أظهرت نتائج أثر المعالجات البكتيرية على نمو النباتات المصابة بالذبول الفيوزاريومي تحسناً ملحوظاً في متغيرات النمو لدى جميع النباتات المعالجة مقارنة بالشواهد غير المعالجة. أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن استخدام سلالات *Pseudomonas* و *Bacillus* (بشكل فردي وفي اتحاد مع *Sinorhizobium meliloti*) كعلاجات للذبول يمكن أن يقلل بشكل كبير من الذبول الفيوزاريومي ويحسن نمو نبات الحمص.

**الكلمات المفتاحية:** Foc ، *Pseudomonas* ، *Bacillus* ، *Sinorhizobium* ، مركبات تعزيز نمو النبات ، مكافحة الحيوية.

## Table des matières

<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>i</i>
<i>Liste des figures</i> .....	<i>iv</i>
<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>vi</i>
<i>Introduction générale</i> .....	<i>1</i>
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique</b>	
<i>Partie 1 Généralités sur le pois chiche</i> .....	<i>5</i>
1. 1 Origine et histoire .....	5
1. 2 Systématique .....	5
1. 3 Description de la plante.....	5
1. 4 Type de cultivars .....	6
1. 5 Caractéristiques agronomiques.....	7
1. 5. 1 Les exigences climatiques .....	7
1. 5. 2 Les exigences édaphiques.....	7
1. 6 Cycle et saison de culture.....	8
1. 6. 1 Émergence des plantules.....	9
1. 6. 2 Croissance de la plante .....	9
1. 6. 3 Pollinisation et fertilisation.....	9
1. 6. 4 Maturité.....	9
1. 7 Distribution et production du pois chiche .....	10
1. 8 Situation du pois chiche en Algérie .....	11
1. 9 Importance du pois chiche.....	12
1. 9. 1 Intérêt alimentaire.....	12
1. 9. 2 Intérêt agronomique.....	14

1. 10 Organismes nuisibles et maladies courantes .....	14
1. 10. 1 L'antracnose .....	14
1. 10. 2 Complexe de la pourriture radiculaire .....	14
1. 10. 3 Flétrissement vasculaire.....	15
1. 10. 4 Les virus.....	16
1. 10. 5 Nématodes, parasites .....	16
1. 10. 6 Insectes.....	16
<i>Partie 2 Généralités sur Fusarium oxysporum f.sp ciceris</i> .....	16
2. 1 Introduction .....	16
2. 2 Formae Speciales, races et compatibilité végétative .....	17
2. 3 Description et identification du <i>Fusarium oxysporum</i> .....	18
2. 4 Cycle évolutif du flétrissement vasculaire .....	19
2. 5 Contrôle de la maladie .....	20
2. 5. 1 Les mesures agronomiques .....	20
2. 5. 2 L'utilisation de cultivars résistants.....	22
2. 5. 3 La lutte chimique.....	23
2. 5. 4 La lutte par les plantes .....	24
2. 5. 5 La lutte par les microorganismes .....	25
<i>Partie 3 Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes</i> .....	25
3. 1 Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes .....	25
3. 2 Genre <i>Bacillus</i> .....	26
3. 2. 1 Classification et systématique des <i>Bacillus</i> .....	26
3. 2. 2 Principales caractéristiques des <i>Bacillus</i> .....	28
3. 2. 3 Usage industriel des <i>Bacillus</i> .....	29
3. 2. 4 <i>Bacillus</i> comme agent de biocontrôle.....	31

3. 3 Genre <i>Pseudomonas</i> .....	33
3. 3. 1 Classification et identification des <i>Pseudomonas</i> .....	33
3. 3. 2 Principales caractéristiques des <i>Pseudomonas</i> .....	34
3. 3. 3 Usage industriel des <i>Pseudomonas</i> .....	34
3. 3. 4 <i>Pseudomonas</i> comme agent de biocontrôle .....	36
3. 4 Les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote .....	37
3. 4. 1 Classification et systématique .....	37
3. 4. 2 Principales caractéristiques des rhizobia .....	39
3. 4. 3 Usage industriel des rhizobia .....	41
3. 4. 4 Rhizobia comme agent de biocontrôle .....	42
 <b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes</b>	
<i>Partie 1 Isolement et caractérisation de l'agent pathogène</i> .....	44
1. 1 La collecte des échantillons infectés.....	44
1. 2 Isolement et purification de l'agent pathogène .....	44
1. 3 Identification et caractérisation des isolats fongiques .....	45
1. 3. 1 Caractérisation macroscopique .....	45
1. 3. 2 Caractérisation microscopique .....	45
1. 3. 3 Etude de la pathogénicité des isolats fongiques .....	45
1. 3. 4 Identification moléculaire des isolats fongiques .....	46
<i>Partie 2 Isolement et caractérisation des PGPR</i> .....	48
2. 1 Prélèvement des échantillons .....	48
2. 2 Isolement des <i>Pseudomonas</i> .....	48
2. 3 Isolement des <i>Bacillus</i> .....	49
2. 4 Identification préliminaire des isolats <i>Pseudomonas</i> et <i>Bacillus</i> .....	49
2. 4. 1 Identification préliminaire des isolats <i>Pseudomonas</i> .....	49

2. 4. 2	Identification préliminaire des isolats <i>Bacillus</i> .....	50
<i>Partie 3 Evaluation de l'activité promotrice de la croissance des plantes</i> .....		51
3. 1	Etude de l'activité antagoniste <i>in vitro</i> .....	51
3. 1. 1	Production de composés antifongiques (test de co-culture) .....	51
3. 1. 2	Production de composés volatiles antifongiques (CVA) .....	51
3. 1. 3	Consortiums rhizobactéries- <i>Sinorhizobium</i> .....	52
3. 1. 4	Effet des bactéries sur la morphologie des champignons .....	53
3. 2	Recherche des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance des plantes .....	53
3. 2. 1	Production de la protéase .....	53
3. 2. 2	Production d' $\alpha$ -amylase .....	53
3. 2. 3	Production de la lipase .....	54
3. 2. 4	Production de la cellulase .....	54
3. 2. 5	Dégradation de la chitine .....	54
3. 2. 6	Production de cyanure d'hydrogène (HCN) .....	55
3. 2. 7	Production de l'Acide indole 3-acétique (AIA) .....	55
3. 2. 8	Solubilisation du Phosphate .....	55
3. 2. 9	Production d'ammoniac .....	56
3. 2. 10	Production de sidérophores .....	56
3. 3	Analyse statistique des résultats .....	57
<i>Partie 4 Effet des bactéries sur la croissance du pois chiche et le contrôle de la fusariose</i> .....		57
4. 1	Effet des bactéries sur la croissance du pois chiche .....	58
4. 2	Biocontrôle de la fusariose .....	58
4. 3	Identification moléculaire des bactéries .....	60
4. 3. 1	Extraction d'ADN .....	60
4. 3. 2	PCR .....	60

4. 3. 3 Électrophorèse.....	61
4. 3. 4 Séquençage .....	61
4. 4 Analyse statistique des résultats .....	61
<b>Chapitre 3 : Résultats et discussion</b>	
<i>Partie 1 Isolement et caractérisation de l'agent pathogène .....</i>	<i>62</i>
1. 1 Isolement et caractérisation macroscopique.....	62
1. 2 Caractérisation microscopique .....	62
1. 3 Etude de la pathogénicité des isolats fongiques .....	63
1. 4 Identification moléculaire des isolats fongiques .....	64
<i>Partie 2 Isolement et caractérisation des PGPR.....</i>	<i>65</i>
2. 1 Identification préliminaire des isolats <i>Pseudomonas</i> .....	65
2. 2 Identification préliminaire des isolats <i>Bacillus</i> .....	66
<i>Partie 3 Evaluation de l'activité promotrice de la croissance des plantes.....</i>	<i>68</i>
3. 1 Etude de l'activité antagoniste <i>in vitro</i> .....	68
3. 2 Consortiums rhizobactéries- <i>Sinorhizobium</i> .....	74
3. 3 Effet des bactéries sur la morphologie des Foc .....	79
3. 4 Recherche des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance des plantes .....	83
<i>Partie 4 Effet des bactéries sur la croissance du pois chiche et le contrôle de la fusariose .....</i>	<i>87</i>
4. 1 Effet des bactéries sur la croissance du pois chiche .....	87
4. 2 Biocontrôle de la fusariose.....	91
4. 3 Identification moléculaire des bactéries.....	99
<i>Conclusion générale.....</i>	<i>111</i>
<i>Références bibliographiques .....</i>	<i>114</i>
<i>Annexes</i>	

## Liste des abréviations

AIA : Acide indole 3-acétique

ANOVA : Analysis of variance

AS: Acide salicylique

*B: Bacillus*

BAFE : Bactéries aérobies formatrices d'endospores

BLAST: Basic local alignment search tools

BMR : Bactéries multi-résistantes

CAS: Chrome azurol s

Cd: Condensation

CDA : Composés diffusibles antifongiques

CMC: Carboxyméthylcellulose

CRYEMA: Congo red yeast extract mannitol agar

CTAB : Cetyltrimethylammonium Bromide

CVA : Composés volatiles antifongiques

Df : Déformations

DFM : Direct-fed microbials

EDTA : Ethylène diamine tetra-acétique

EPS: Exopolysaccharides

EV: Expect value

*F : Fusarium*

f.sp : Formes spéciales

Fo: *Fusarium oxysporum*

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

Fr : Fragmentations

GCV : Groupes de compatibilité végétative

GM : gravité de la maladie

GN: Gélose nutritive

Gr : Granulations

HCN : Cyanure d'hydrogène

HDTMA : Hexadécyltriméthylammonium

ICARDA : International center for agricultural research in the dry areas

ICRISAT : International crop reseach institute for the semi-arid tropics

INRAA : Institut national de la recherche agronomique d'Algérie

INRAT : Institut nationale de la recherche agronomique de Tunisie

KB : King B

LB : Luria-Bertani

LR : Longueur de la racine

LT : Longueur d la tige

NBRIP: National botanical research institute's phosphate

NCBI: National center for biotechnology information

*P : Pseudomonas*

PCR : Polymerase chain reaction

PDA: Potato dextrose agar

PGPR: Plant growth promoting rhizobacteria

PSR : Poids sec de la racine

PST : Poids sec de la tige

RM : réduction de la maladie

*S: Sinorhizobium*

SDS : Sodium dodecyl sulfate

St : Septa

TE : Tris-EDTA

THIA: Thiamethoxam

Tris : Trisaminométhane

YEMA: Yeast mannitol agar

## Liste des figures

FIGURE 1. ASPECT DES TROIS TYPES CULTIVES DE POIS CHICHE .....	6
FIGURE 2. EVOLUTION DES SUPERFICIES, PRODUCTIONS ET DES RENDEMENTS DU POIS CHICHE DURANT LA PERIODE 2000 – 2020 EN ALGERIE .....	12
FIGURE 3. CYCLE D’INFECTION DU <i>F. OXYSPORUM</i> F. SP. <i>CICERIS</i> .....	20
FIGURE 4. SCHEMA GENERAL DES DIFFERENTS TESTS EFFECTUES DANS LA PRESENTE ETUDE .....	43
FIGURE 5. OBSERVATION MACROSCOPIQUE DES ISOLATS FOC (VUE DE FACE ET DE DOS).....	62
FIGURE 6. OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES ISOLATS FOC .....	63
FIGURE 7. TEST DE PATHOGENICITE .....	64
FIGURE 8. EXAMEN DU GEL SOUS LUMIERE UV DE LA BANDE SPECIFIQUE FO .....	64
FIGURE 9. EXAMEN DU GEL SOUS LUMIERE UV DE LA BANDE SPECIFIQUE FOC .....	65
FIGURE 10. ACTIVITE ANTAGONISTE <i>IN VITRO</i> .....	78
FIGURE 11. OBSERVATIONS EN MICROSCOPE OPTIQUE DE L’IMPACT DES SOUCHES <i>PSEUDOMONAS</i> SUR LA MORPHOLOGIE DES HYPHES DE FOC-S1 (40×) .....	80
FIGURE 12. OBSERVATIONS EN MICROSCOPE OPTIQUE DE L’IMPACT DES SOUCHES <i>PSEUDOMONAS</i> SUR LA MORPHOLOGIE DES HYPHES DE FOC-S2 (40×).....	81
FIGURE 13. OBSERVATIONS EN MICROSCOPE OPTIQUE DE L’IMPACT DES <i>BACILLUS</i> ET <i>S. MELILOTI</i> SUR LA MORPHOLOGIE DES FOC (40×) .....	81
FIGURE 14. EVALUATION DE L’ACTIVITE PROMOTRICE DE LA CROISSANCE DES PLANTES .....	85
FIGURE 15. EFFET DES BACTERIES SUR LA CROISSANCE DU POIS CHICHE .....	90
FIGURE 16. BIOCONTROLE DE LA FUSARIOSE.....	97
FIGURE 17. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA SOUCHE E1FP4 CONSTRUIT PAR LA METHODE « NEIGHBOR JOINING » .....	101
FIGURE 18. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA SOUCHE E1FP13 CONSTRUIT PAR LA METHODE « NEIGHBOR JOINING » .....	102
FIGURE 19. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA SOUCHE E1PP6 CONSTRUIT PAR LA METHODE « NEIGHBOR JOINING » .....	103
FIGURE 20. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA SOUCHE E1PP7 CONSTRUIT PAR LA METHODE « NEIGHBOR JOINING » .....	104
FIGURE 21. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA SOUCHE E1PP15 CONSTRUIT PAR LA METHODE « NEIGHBOR JOINING ».....	105

FIGURE 22. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA SOUCHE E1PB10 CONSTRUIT PAR LA METHODE « NEIGHBOR JOINING » .....106

FIGURE 23. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA SOUCHE E1PB6 CONSTRUIT PAR LA METHODE « NEIGHBOR JOINING » .....107

FIGURE 24. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA SOUCHE E2PB1 CONSTRUIT PAR LA METHODE « NEIGHBOR JOINING » .....108

FIGURE 25. GEL DE L'ELECTROPHORESE DES BACTERIES SOUS UV ..... ANNEXE

## Liste des tableaux

TABLEAU 1. PRINCIPAUX PAYS PRODUCTEURS DE POIS CHICHES DANS LE MONDE.....	10
TABLEAU 2. PROFIL NUTRITIONNEL DU POIS CHICHE POUR 100 G .....	13
TABLEAU 3. GENRES DE LA FAMILLE DES <i>RHIZOBIACAE</i> AVEC NOMBRE D'ESPECES. ....	39
TABLEAU 4. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DE <i>RHIZOBIUM</i> ET <i>ENSIFER</i> .....	40
TABLEAU 5. LES CONDITIONS DES CYCLES PCR DES PAIRES D'AMORCES FO ET FOC.....	47
TABLEAU 6. COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL DE LA PCR .....	60
TABLEAU 7. RESULTATS DE L'IDENTIFICATION PRELIMINAIRE DES <i>PSEUDOMONAS</i> .....	66
TABLEAU 8. RESULTATS DE L'IDENTIFICATION PRELIMINAIRE DES <i>BACILLUS</i> .....	67
TABLEAU 9. POURCENTAGES D'INHIBITION DE LA CROISSANCE RADIALE DE FOC PAR LES ISOLATS <i>PSEUDOMONAS</i> DANS CHAQUE ESSAI. ....	69
TABLEAU 10. POURCENTAGES D'INHIBITION DE LA CROISSANCE RADIALE DE FOC PAR LES ISOLATS <i>BACILLUS</i> DANS CHAQUE ESSAI. ....	71
TABLEAU 11. POURCENTAGES D'INHIBITION DE LA CROISSANCE RADIALE DE FOC PAR LE CONSORTIUM <i>PSEUDOMONAS-SINORHIZOBIUM</i> .....	75
TABLEAU 12. POURCENTAGES D'INHIBITION DE LA CROISSANCE RADIALE DE FOC PAR LE CONSORTIUM <i>BACILLUS-SINORHIZOBIUM</i> .....	77
TABLEAU 13. PRODUCTION DES METABOLITES IMPLIQUES DANS LA PROMOTION DE LA CROISSANCE DES PLANTES.....	84
TABLEAU 14. EFFETS INDIVIDUEL ET EN CONSORTIUM DES <i>PSEUDOMONAS</i> SUR LA CROISSANCE DU POIS CHICHE.....	88
TABLEAU 15. EFFETS INDIVIDUEL ET EN CONSORTIUM DES <i>BACILLUS</i> SUR LA CROISSANCE DU POIS CHICHE .....	89
TABLEAU 16. BIOCONTROLE DE LA FUSARIOSE PAR LES TRAITEMENTS <i>PSEUDOMONAS</i> .....	92
TABLEAU 17. EFFET DES TRAITEMENTS <i>PSEUDOMONAS</i> SUR LA CROISSANCE DU POIS CHICHE INFECTE PAR FOC .....	93
TABLEAU 18. BIOCONTROLE DE LA FUSARIOSE PAR LES TRAITEMENTS <i>BACILLUS</i> .....	94
TABLEAU 19. EFFET DES TRAITEMENTS <i>BACILLUS</i> SUR LA CROISSANCE DU POIS CHICHE INFECTE PAR FOC.....	96
TABLEAU 20. RESULTATS DU BLAST DES SOUCHES <i>PSEUDOMONAS</i> ET <i>BACILLUS</i> .....	100

# *Introduction générale*

## **Introduction générale**

Le pois chiche fait partie des légumineuses les plus importantes au monde (Rawal et Navarro 2019). Il fournit de l'énergie et des nutriments tels que les protéines, les lipides, les glucides et les minéraux. Il contribue également au maintien de la bonne santé grâce à des composants non-nutritifs (substances phytochimiques) qui jouent le rôle d'agents anticarcinogènes, hypocholestérolémiques ou hypoglycémiques (Muzquiz et Wood, 2007 ; Wood et Grusak, 2007). Dans un régime sans protéines animales, le pois chiche peut présenter un substitut solide pour les végétariens (Latham, 1997). Il est utilisé dans l'industrie de l'élevage (Rawal et Navarro, 2019) et contribue également à la fertilité du sol lorsqu'il est inclus dans les rotations de cultures à travers la fixation de l'azote (Aslam *et al.*, 2003).

En 2020, le pois chiche a occupé la deuxième position parmi les légumineuses, avec une production nationale de 39889 tonnes (FAOSTAT, 2020). Cette production reste insuffisante devant les besoins de consommation de la population (Belaid, 2018). La production de pois chiche fait face à de nombreuses contraintes, d'ordre technique, agronomique, abiotique et biotique. Le flétrissement fusarien présente l'une des maladies fongiques les plus menaçantes qui peuvent toucher le pois chiche. Le *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Padwick) Matuo et K. Sato est le champignon responsable de cette maladie (Landa *et al.*, 2006), elle est transmise par le sol et les graines (Knights, 2004). Le Foc affecte presque toutes les régions productrices de pois chiches dans le monde (Haware *et al.*, 1990), c'est un pathogène difficile car il peut survivre dans le sol et sur les débris de culture sous forme de chlamydospores jusqu'à six ans sans son hôte (Gopalakrishnan et Srinivas, 2019). Le champignon peut causer des pertes de rendement allant jusqu'à 100 % lorsque les conditions sont adéquates (Landa *et al.*, 2004).

Plusieurs stratégies de gestion ont été employées pour contrôler le flétrissement fusarien ; l'efficacité de la rotation des cultures a considérablement diminué en raison de la nature persistante du pathogène dans le sol (Arfaoui *et al.*, 2006 ; Gopalakrishnan et Srinivas, 2019). L'utilisation de cultivars résistants a ses limites en raison de la variabilité du pathogène (Jiménez-Gasco *et al.*, 2004). Les pesticides chimiques ne sont plus attrayants en raison de leurs graves effets secondaires, sur l'applicateur, le consommateur et l'environnement en général (Hayes et Laws, 1991 ; Ramezani, 2009). La recherche d'une alternative plus sûre et plus efficace

a été l'objectif de nombreux chercheurs au cours des dernières années, d'où l'intérêt croissant pour la lutte biologique (Abed *et al.*, 2016 ; Al-Ghafri *et al.*, 2020).

De nombreuses rhizobactéries ont été abondamment utilisées pour contrôler plusieurs phytopathogènes du sol y compris le Foc (Zaim *et al.*, 2016). Parmi les diverses bactéries qui existent dans le sol, les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* semblent attirer l'attention des chercheurs en raison de leurs capacités exceptionnelles à gérer les phytopathogènes à travers une multitude de mécanismes, allant de la production d'antibiotiques, de sidérophores et d'enzymes lytiques à la libération de composés antifongiques volatils dans l'atmosphère (Kumari et Khanna, 2019).

De nombreuses études évaluant l'effet des *Pseudomonas* sur plusieurs phytopathogènes ont été publiées. *P. luteola* et *P. fluorescens* ont été rapportées par Abed *et al.* (2016) pour leur capacité à inhiber la croissance de Foc. La souche *P. fluorescens*-5 a également été rapportée par Rathore *et al.* (2020) pour sa capacité à inhiber la croissance de *F. oxysporum* f. sp. *cumini*. Les isolats ISO1 et ISO2 de *P. aeruginosa* ont montré des niveaux significatifs d'antagonisme envers *F. solani* (Al-Ghafri *et al.*, 2020). Il a également été démontré que *P. frederiksbergensis* CMAA 1323 peut contrôler la croissance de *Botrytis cinerea* affectant les pseudofruits de fraises (Melo *et al.*, 2016). Plusieurs travaux ont également été publiés sur la capacité des *Bacillus* à contrôler les phytopathogènes. Dans une étude menée par Castaldi *et al.* (2021), la rhizobactérie *B. vallismortis* RHFS10 a efficacement contrôlé le phytopathogène *Macrophomina phaseolina*, elle a également produit plusieurs composés impliqués dans le biocontrôle et la promotion de la croissance des plantes comme les siderophores, l'acide indole 3-acétique (AIA), la protéase, la lipase et la chitinase. L'isolat *B. subtilis* SCB-1 a été rapporté pour son potentiel antifongique contre divers pathogènes fongiques incluant les genres *Saccharicola*, *Cochliobolus*, *Alternaria* et *Fusarium* (Hazarika *et al.*, 2019). L'isolat *Bacillus* sp. BS-20 a significativement inhibé la croissance de Foc et a également produit nombreux composés antifongiques tel que les siderophores, la lipase, la protéase, la b-1,3-glucanase, et le cyanure d'hydrogène (HCN) (Anusha *et al.*, 2019).

Autre que leur usage individuel pour le contrôle des phytopathogènes, les rhizobactéries ont également été utilisées en consortiums. Dans une étude menée par Syed *et al.* (2020), un consortium composé de *P. aeruginosa* souche Kasamber 11, *Bacillus* sp. ADMK68, et *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* strain KCTC 13429 s'est montré antagoniste envers *Aspergillus niger*,

*Aspergillus flavus*, et *Fusarium oxysporum* (Fo), le mélange a également exhibé une multitude de caractéristiques impliquées dans la promotion de la croissance des plantes tel que la solubilisation du phosphate, la production d'HCN et d'AIA. Dans une autre étude, trois bactéries ; *P. fluorescens* LPK2, *S. fredii* KCC5, et *Azotobacter chroococcum* AZK2 ont été utilisées en consortium et ont montré leur potentiel de biocontrôle contre *F. udum* (Choure et Dubey, 2012). Singh *et al.* (2013) ont montré que l'application d'un consortium composé de *Pseudomonas* fluorescent (PHU094), *Trichoderma* (THU0816) et *Rhizobium* (RL091) a conduit à une augmentation des réponses de défense physiologique chez le pois chiche infecté par *Sclerotium rolfsii*.

Se basant sur la littérature précédente concernant les dégâts infligés par le Foc au pois chiche, et la pertinence révélée de la lutte biologique contre ce fléau, on a établi notre stratégie de recherche qui consiste à :

- L'isolement et l'identification de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* à partir des plantes de pois chiche atteintes de fusariose.
- L'isolement et la caractérisation de *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. à partir de la rhizosphère du pois chiche.
- L'étude du pouvoir antagoniste (individuel et en consortium avec *Sinorhizobium*) des *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. contre le *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* *in vitro*.
- La recherche des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance des plates chez les isolats bactériens.
- L'évaluation de l'effet (individuel et en consortium avec *Sinorhizobium*) des *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. sur la croissance du pois chiche.
- L'étude du pouvoir antagoniste (individuel et en consortium avec *Sinorhizobium*) des *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. contre le *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* *in vivo*.

Le présent manuscrit est structuré en trois chapitres :

- Le premier chapitre qui est la synthèse bibliographique, comporte trois parties : généralités sur le pois chiche, généralités sur le *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, et les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes.

- Le deuxième chapitre qui est matériels et méthodes, comporte quatre parties : isolement et caractérisation de l'agent pathogène, isolement et caractérisation des PGPR, évaluation de l'activité promotrice de la croissance des plantes, et effet des bactéries sur la croissance du pois chiche et le contrôle de la fusariose.
- Le troisième chapitre qui est résultats et discussion comporte également quatre parties : isolement et caractérisation de l'agent pathogène, isolement et caractérisation des PGPR, évaluation de l'activité promotrice de la croissance des plantes, et effet des bactéries sur la croissance du pois chiche et le contrôle de la fusariose.

*Chapitre 1 : Synthèse  
bibliographique*

## Partie 1 Généralités sur le pois chiche

### 1. 1 Origine et histoire

Du latin *cicer* proviennent les mots *cicero*, pois chiche, chickpea et en espagnol «chícharo», qui paraît avoir été un nom assez commun pour certains grains secs de légumineuses, y compris certains *Lathyrus*. Le mot espagnol «garbanzo» paraît être par conséquent un nom autochtone préromain, puisqu'il ne se rapporte ni au grec ni à l'arabe. L'ancienneté de cette culture en Espagne paraît évidente (Cubero, 1994). Les preuves botaniques et archéologiques montrent que le pois chiche a été domestiqué pour la première fois au Moyen-Orient. Largement cultivé en Inde, dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Éthiopie depuis l'Antiquité (Duke, 1981). le pois chiche est arrivé en Europe avec les premières vagues de migration de céréales du sud-ouest de l'Asie (Zohary *et al.*, 2012). Le pois chiche a été transféré vers les deux Amériques par les espagnoles et les portugais (Muehlbauer et Rajesh, 2008).

### 1. 2 Systématique

Le pois chiche (*Cicer arietinum*) appartient au règne des *Plantae*, division des *Magnoliophyta*, à la classe des *Magnoliopsida*, ordre des *Fabales* et à la famille des *Fabaceae*, sous-famille des *Faboideae*, au genre *Cicer* et à l'espèce *Cicer arietinum* Linnaeus (Mula *et al.*, 2011).

### 1. 3 Description de la plante

Le pois chiche est une plante annuelle, ayant une hauteur allant de 30 à 70 cm, avec des ramifications primaires, secondaires et tertiaires ressemblant un petit buisson (Beyene *et al.*, 2015). Il est caractérisé par une tige anguleuse, velue, dressée et ramifiée, de couleur verte foncée à verte bleutée et un système racinaire qui peut atteindre jusqu'à 2m de profondeur. Les feuilles sont imparipennées, pubescente à poils glandulaires avec 3-8 paires de folioles et une foliole supérieure (rachis se terminant par une foliole) de forme ovales à elliptiques mesurant 0,6-2,0 cm de longueur et 0,3-1,4 cm de largeur. Les fleurs sont solitaires, parfois 2 à 3 par inflorescence, axillaires avec des pédoncules de 0,6-3 cm de long, pédicelles de 0,5-1,3 cm de long, les bractées sont triangulaires ou tripartites atteignant jusqu'à 2 mm de long, la corolle est blanche, rose, violacée (fanée à bleu) ou bleue. Les gousses sont rhomboïdes-ellipsoïdes mesurant 1,4-3,5 cm de long et 0,8-2 cm de large, gonflées à poils glandulaires. Les graines sont

obovoïdes angulaires de couleur crème, jaune, marron, noire ou verte, mesurant 0,4-1,4 sur 0,4-1 cm, à surface lisse, ridée ou tuberculée, la germination est cryptocotylaire (hypogée) (Duke, 1981).

#### 1. 4 Type de cultivars

Le pois chiche est caractérisé par trois types, le type Desi et le type Kabuli, et un troisième type intermédiaire, appelé Gulabi (Figure 1), qui sont produits à l'échelle commerciale (Chavan *et al.*, 1989). Le type Desi a des graines petites, anguleuses et de couleur foncée tandis que le type Kabuli, a des graines grosses, lisses et beiges (Gil *et al.*, 1996). Cependant, il y a quelques nouvelles variétés de pois chiche qui présentent une coloration noire ou verte (Singh *et al.*, 2015). Le type Desi (microsperma) se caractérise par des fleurs roses et une pigmentation d'anthocyanine sur la tige, ses graines pèsent entre 0,1 et 0,3 g, alors que le type Kabuli (macrosperma) a des fleurs blanches et ne présente aucune pigmentation d'anthocyanine sur sa tige, ses graines pèsent entre 0,2 et 0,6 g (Jukanti *et al.*, 2012). Ces deux cultivars ont une distribution géographique différente ; Desi est d'origine indienne et Kabuli est d'origine méditerranéenne, comme il peut provenir du moyen orient (Ghribi *et al.*, 2015).



**Figure 1.** Aspect des trois types cultivés de pois chiche : A (Gulabi), B (Desi) et C (Kabuli) (Chavan *et al.*, 1989).

## **1. 5 Caractéristiques agronomiques**

### **1. 5. 1 Les exigences climatiques**

#### **1. 5. 1. 1 Les exigences hydriques**

Le pois chiche est une espèce cultivée sous conditions pluviales et généralement dans des zones à climat semi-aride, la sécheresse et la mauvaise répartition des pluies constituent la majeure contrainte abiotique de la production (Chafika *et al.*, 2014). Les besoins en eau diffèrent selon le type de pois chiche, le type Kabuli croit mieux dans les régions où les précipitations sont entre 400 et 600 mm par an, tandis que le type Desi croit mieux dans les régions où les précipitations sont de 300 mm par an (Imtiaz *et al.*, 2011).

#### **1. 5. 1. 2 Les exigences thermiques**

La température optimale de croissance du pois chiche est située entre 19 à 29 °C le jour, et à 20 °C la nuit (Manjunath et Chimmad, 2014). La température de germination optimale est entre 10 °C et 15 °C (Ellis *et al.*, 1986). Pour les pois chiches Desi, la température moyenne minimale recommandée du sol pour le semis est de 7 °C, tandis que pour les pois chiches Kabuli, elle doit être de 10 °C (Fleury, 2016).

#### **1. 5. 1. 3 Les exigences en luminosité**

Plusieurs expériences ont montré que les plantes qui n'ont pas été suffisamment exposé au soleil, présentent une réduction dans le nombre de graines par gousse et que la diminution de l'intensité de la lumière à elle seule peut conduire à l'avortement des structures de reproduction et par conséquent une diminution du rendement (Verghis *et al.*, 1999).

### **1. 5. 2 Les exigences édaphiques**

#### **1. 5. 2. 1 Type de sol**

Le pois chiche est cultivé sur différents types de sol, sur du sol sableux (dunes du Pakistan), sol sableux limoneux (nord de l'Inde), sols profonds (Inde centrale, ouest de l'Asie, et en Ethiopie), il est également cultivé sur des sols calcaires avec une couche de sous-sol de CaCO<sub>3</sub> dans l'Asie de l'Ouest. Les meilleurs sols pour la croissance du pois chiches sont les sols profonds limoneux ou d'argile limoneuse dépourvus de sels solubles (Singh et Diwakar, 1995). Un sol concentré en NaCl (supérieur à 34 mM) peut considérablement diminuer la capacité germinative ainsi que la vitesse de germination du pois chiche (Hajlaoui *et al.*, 2007).

### 1. 5. 2. 2 pH du sol

Les stress biotiques et abiotiques entraînent des pertes économiques importantes pour la culture de pois chiche. Les stress abiotiques dus à l'acidité du sol constituent l'un des principaux facteurs qui entravent la productivité du pois chiche (Datta *et al.*, 2008).

Le pH du sol est probablement le paramètre chimique le plus important du sol, il reflète l'état chimique global du sol et influe sur toute une gamme de processus chimiques et biologiques se produisant dans les sols. La plupart des plantes et des organismes du sol préfèrent une gamme de pH comprise entre 6,0 et 7,5 (Hall, 2008 ; Hazelton et Murphy, 2016). Le pois chiche peut tolérer des pH allant de 6 à 9 (Fabre, 2008).

### 1. 5. 2. 3 Nutrition minérale

La croissance et le rendement en pois chiche dépendent largement des éléments minéraux. Le nitrogène, le phosphore, et le potassium constituent les macronutriments primaires. Le soufre (S), le calcium (Ca), et le magnésium (Mg) sont des éléments nutritifs secondaires (macronutriments secondaires) des plantes qui proviennent principalement du sol et se trouvent en grande quantité dans le pois, la lentille, le pois chiche et la féverole. Les huit micronutriments essentiels à la croissance du pois chiche sont le bore (B), le chlore (Cl), le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo) et le zinc (Zn). Les micronutriments sont présents dans légumineuses à grains à des concentrations généralement inférieures à 200  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Mahler *et al.*, 1988). Parmi les nutriments primaires, l'azote et le phosphore augmentent efficacement la croissance et le rendement des cultures lorsqu'ils sont appliqués à un taux approprié (Lehmann *et al.*, 2003).

### 1. 6 Cycle et saison de culture

La durée du cycle de culture du pois chiche varie selon la date de semis, de huit mois pour un semis d'automne (pois chiche d'hiver) à trois mois seulement pour un semis de printemps (pois chiche de printemps). Avec un semis d'automne, la culture d'hiver pourrait profiter des pluies hivernales, relativement importantes, permettant une considérable accumulation des réserves et une augmentation du rendement en graines (Ben Mbarek *et al.*, 2011). Pour le pois chiche du printemps, il est souvent soumis à d'importantes variations climatiques et à une importante microflore parasitaire, le stress hydrique et les hautes

températures, fréquentes en fin de cycle de culture, limitent fortement la production d'où l'idée d'avancer la date du semis à l'hiver (El aoufir, 2001). Le cycle de croissance peut être divisé en quatre parties :

### **1. 6. 1 Émergence des plantules**

Les plantules de pois chiches ont une émergence hypogée, c'est-à-dire que leurs cotylédons restent sous terre, tout en fournissant de l'énergie aux racines et aux pousses à croissance rapide. Selon la température du sol et de la profondeur de semis, l'émergence peut prendre entre 7 à 15 jours après le semis (Gaur *et al.*, 2010).

### **1. 6. 2 Croissance de la plante**

Le pois chiche a un mode de croissance indéterminé ou la croissance végétative se poursuit même après le début de la floraison, par conséquent, il y a souvent une séquence de développement de feuilles, de boutons floraux, de fleurs et de gousses le long de chaque branche. La durée de la croissance végétative avant la floraison varie généralement de 40 à 80 jours, en fonction de la variété, de l'emplacement du taux d'humidité du sol et des conditions climatiques (Gaur *et al.*, 2010).

### **1. 6. 3 Pollinisation et fertilisation**

Le pois chiche a des fleurs typiquement papilionacées, la plupart des cultivars produisent une seule fleur à chaque nœud de floraison, on trouve également quelques cultivars à deux fleurs par nœud. L'anthèse chez le pois chiche se déroule tout au long de la journée, la déhiscence des anthères a lieu à l'intérieur du bouton 24 h avant l'ouverture de la fleur, ainsi, les fleurs de pois chiche sont véritablement cleistogames et autofécondées, après la déhiscence, les anthères se ratatinent tandis que les pétales sont complètement développés. Dans des conditions favorables, le délai entre la fécondation et la première apparition d'une gousse (nouaison) est d'environ 6 jours (Gaur *et al.*, 2010).

### **1. 6. 4 Maturité**

Après la formation des gousses, la paroi de la gousse se développe rapidement pendant les 10 à 15 premiers jours, tandis que la croissance de la graine se produit plus tard. Peu de temps après le développement des gousses et leur remplissage en graines, la sénescence des feuilles sous-jacentes commence. S'il y a beaucoup d'humidité dans le sol, la floraison et la formation de

gousses se poursuivront sur les nœuds supérieurs. Le pois chiche peut tolérer des températures élevées s'il y a suffisamment d'humidité dans le sol. Le pois chiche est prêt à être récolté lorsque 90 % des tiges et des gousses perdent leur couleur verte et deviennent jaunes pâles (Gaur *et al.*, 2010).

### 1. 7 Distribution et production du pois chiche

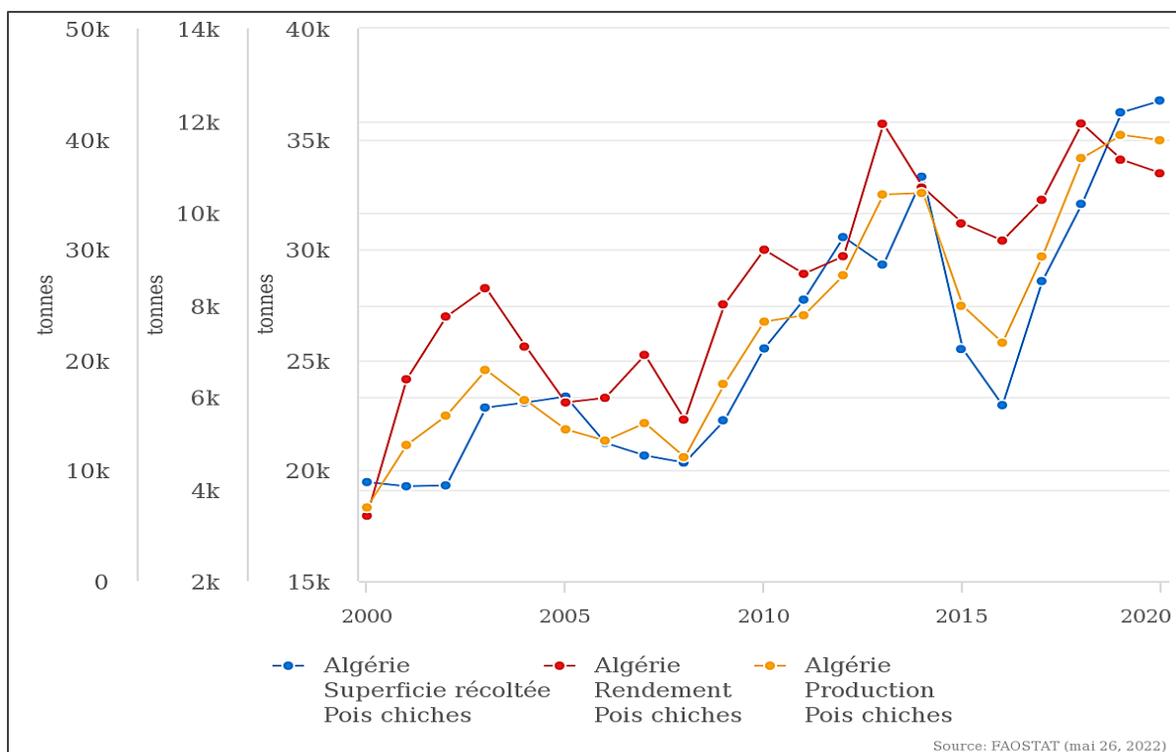
En 2020, le pois chiche a occupé la troisième position parmi les légumineuses produites dans le monde, et ce en termes de zone récoltées avec une superficie de 14841940 hectares, et la deuxième position en termes de production avec 15083871 tonnes. En termes de production par région, l'Europe produit 1,99 %, l'Océanie 1,86 %, l'Afrique 4,67 %, l'Amérique 4,72 % et l'Asie 86,75 % (FAOSTAT, 2020). L'Inde occupe incontestablement la première place parmi les pays producteurs de pois chiche (Tableau 1).

**Tableau 1.** Principaux pays producteurs de pois chiches dans le monde (FAOSTAT, 2020)

Région	Pays	Superficie (ha)	Production (tonnes)	Rendement (q/ha)
Asie	Inde	10948882	11080000	10,12
	Pakistan	943860	497608	5,272
	Iran	514284	226595	4,406
	Turquie	511493	630000	12,317
Océanie	Australie	263000	281200	10,692
	Éthiopie	220719	457319	20,72
	Malawi	2201	1050	4,771
	Maroc	53599	49714	9,275
	Algérie	36743	39889	10,856
Europe	Russie	335261	291133	8,684
Amérique	USA	106390	193820	18,218
	Mexique	62383	125823	20,169
	Canada	119900	214400	17,882
	Argentine	112549	177061	15,732
Total mondial		14841940	15083871	10,163

## 1. 8 Situation du pois chiche en Algérie

En Algérie, la culture de pois chiche est présente dans nos systèmes agricoles, associée aux céréales depuis fort longtemps. Le pois chiche est actuellement cultivé dans les zones de culture du blé dur, c'est-à-dire les zones où la pluviométrie annuelle moyenne est supérieure à 400 mm. Il s'agit de la zone Nord-Ouest (Ain Témouchent, Tlemcen, Sidi Bel-Abbès, Mostaganem, Mascara), du Nord-Est (Guelma, Skikda) et le Centre (Bouira, Chlef, Ain Defla) (Zine-Zikara *et al.*, 2015). La superficie nationale totale de la culture de pois chiche a connu une progression continue depuis le début des années 2000. Elle est passée de 19 480 ha durant la campagne agricole 2000/2001 à une superficie de 36 743 ha en 2020. L'évolution des superficies s'est accompagnée également par l'augmentation des niveaux de production passant de 66 610 q à 398 890 q. Concernant les rendements, les valeurs ont passé d'une moyenne nationale de 3,42 q/ha à plus de 10,85 q/ha (Figure 2). Malgré l'évolution positive des indicateurs de la culture, la production nationale reste faible, comparativement aux besoins nationaux, et ne peut satisfaire qu'une petite partie de la consommation locale croissante. En conséquence, afin de combler le déficit de la production en pois chiche, l'Algérie fait recours à des importations massives, de l'ordre de 64 729 tonnes, soit plus de 150 % de sa production (FAOSTAT, 2020).



**Figure 2.** Evolution des superficies, productions et des rendements du pois chiche durant la période 2000 – 2020 en Algérie (FAOSTAT, 2020)

## 1. 9 Importance du pois chiche

### 1. 9. 1 Intérêt alimentaire

Les légumineuses à grains sont une importante source de protéine pour l'alimentation humaine et animale (Derbyshire *et al.*, 1976), en plus de leur apport en protéines, elles sont riches en vitamines et en sels minéraux (Tableau 2).

**Tableau 2.** Profil nutritionnel du pois chiche pour 100 g (Wallace *et al.*, 2016)

Catégorie	Nutriments	Pois chiche sec	Pois chiche cuit	
Énergie et macronutriments	Energie (Kcal)	378	164	
	Protéines (g)	20,47	8,86	
	Matière grasse (g)	6,04	2,59	
	Fibres (g)	12,2	7,6	
	Sucres (g)	10,7	4,8	
Minéraux	Calcium (mg)	57	49	
	Fer (mg)	4,31	2,89	
	Magnésium (mg)	79	48	
	Phosphore (mg)	252	168	
	Potassium (mg)	718	291	
	Sodium (mg)	24	7	
	Zinc (mg)	2,76	1,53	
	Cuivre (mg)	0,656	0,352	
	Manganèse (mg)	21,306	1,030	
	Sélénium (µg)	0	3,7	
Vitamines	Vitamine C (mg)	4,0	1,3	
	Thiamine (vit B <sub>1</sub> ) (mg)	0,477	0,116	
	Riboflavine (vit B <sub>2</sub> ) (mg)	0,212	0,063	
	Niacine (vit B <sub>3</sub> ) (mg)	1,541	0,526	
	Acide pantothénique (vit B <sub>5</sub> ) (mg)	1,588	0,286	
	Vitamine B <sub>6</sub> (mg)	0,535	0,139	
	Folate (vit B <sub>9</sub> ) (µg)	557	172	
	Choline (vit B <sub>4</sub> ) (mg)	99,3	42,8	
	Vitamine B <sub>12</sub> (µg)	0	0	
	Vitamine A (IU)	67	27	
	Vitamine D (µg)	0	0	
	Vitamine K (µg)	9,0	4,0	
	Vitamine E (mg)	0,82	0,35	
	Lipides	Lipides saturés (g)	0,603	0,269
		Lipides mono insaturés (g)	1,377	0,583
Lipides polyinsaturés (g)		2,731	1,156	

### 1. 9. 2 Intérêt agronomique

Grace à leur capacité à établir une symbiose avec les bactéries de la famille des rhizobiacées (exprimée par la formation de nodules sur les racines), les légumineuses peuvent assimiler l'azote atmosphérique fixé et transformé par celles-ci, cette capacité se reflète positivement sur l'environnement puisqu'elle permet de réduire les apports d'engrais azoté et sur les autres plantes à travers l'enrichissement du sol en azote (utilisation dans les rotations culturales et décomposition des résidus de légumineuses) (Dupraz, 2009).

### 1. 10 Organismes nuisibles et maladies courantes

Dans plusieurs pays, la production du pois chiche est limitée par l'action de plusieurs facteurs de stress dont les plus importants restent les maladies causées par une large gamme d'organismes phytopathogènes, parmi lesquels on cite :

#### 1. 10. 1 L'antracnose

L'antracnose du pois chiche résulte de l'infection par l'espèce cryptogamique *Ascochyta rabiei*, toutes les parties aériennes de la plante sont attaquées ; sur les folioles, les lésions sont rondes ou allongées avec des points bruns irrégulièrement déprimés, et entourées d'une marge rouge brunâtre, sur les gousses vertes, les lésions sont généralement circulaires avec des marges noirâtres et ont des pycnides disposées en cercles concentriques. Souvent, les graines infectées portent des lésions, sur la tige et les pétioles, les lésions sont brunes, allongées (3 à 4 cm), lorsque les lésions ceignent la tige, la partie au-dessus du point d'attaque meurt rapidement, si la tige principale est ceinturée au niveau du collet, la plante entière meurt. À mesure que la maladie progresse, le nombre de plantes touchées augmente jusqu'à ce que la totalité du champ soit infectée (Nene, 1982).

#### 1. 10. 2 Complexe de la pourriture radiculaire

Le complexe inducteur de la pourriture radiculaire du pois chiche comprend *Rhizoctonia solani* agent de la pourriture molle des racines, cette maladie est le plus souvent observée au début de la saison quand le taux d'humidité du sol est souvent élevé ; cependant, elle peut être observée à tout moment de la saison. Les symptômes caractéristiques comprennent la pourriture des racines, souvent originaire de l'extrémité distale de la jeune racine et le jaunissement et le flétrissement progressifs du feuillage. Les tissus pourris et décolorés seront également mous et

humides. L'infection provient de sclérotites ou de fragments mycéliens issus des débris de plantes infectés. Les températures du sol nécessaires à l'infection varient entre 18 °C et 29 °C, avec des niveaux d'humidité modérés à élevés (Harveson, 2011).

*F. solani* est l'agent causale de la pourriture noire des racines, les plantes touchées deviennent jaunes, flétrissent et sèchent prématurément. Le système racinaire est pourri et la plupart des racines les plus fines sont détruites, tandis que la racine pivotante reste intacte, mais sombre et nécrotique. Cet agent pathogène est similaire à *Fusarium oxysporum* (Fo), le champignon du flétrissement, en étant capable de survivre pendant de nombreuses années dans le sol sous forme de chlamydospores. L'infection est fortement favorisée par les conditions de stress imposées aux cultures (Harveson, 2011).

*Rhizoctonia bataticola* est l'agent pathogène responsable de la pourriture sèche des racines, la maladie apparaît généralement autour du stade de formation des fleurs et gousses sous forme de plantes séchées dispersées, les plantules peuvent également être infectées. La sensibilité de la plante à la maladie augmente avec l'âge. Les retombées de pétioles et de folioles se limitent à celles situées tout en haut de la plante, parfois, lorsque le reste de la plante est sèche, les feuilles les plus hautes sont décolorées. Les feuilles et les tiges des plantes atteintes ont généralement une couleur de paille, mais dans certains cas, les feuilles et les tiges inférieures sont brunes. La partie inférieure de la racine pivotante reste généralement dans le sol lorsque les plantes sont déracinées. La racine pivotante est sombre, montre des signes de pourriture et est dépourvue de la plupart de ses racines latérales et plus fines (Nene *et al.*, 2012).

### 1. 10. 3 Flétrissement vasculaire

Le flétrissement du pois chiche causé par Foc se produit généralement à deux stades de croissance, au début de formation des plantules ou au stade de floraison. Les premiers symptômes de la maladie sont le flétrissement des plantes suivi d'une mort subite. Les feuilles peuvent également jaunir et tomber prématurément. Des coupes transversales de la tige basale ou des racines révèlent une décoloration des cellules vasculaires (Bashir et Malik, 1988).

#### 1. 10. 4 Les virus

En plus des attaques fongiques, il y a aussi les attaques par les virus, parmi lesquelles on cite : virus du nanisme buissonneux du pois chiche, virus associé au rabougrissement du pois chiche et virus filiforme du pois chiche (Maladie filiforme) (Street *et al.*, 2008).

#### 1. 10. 5 Nématodes, parasites

Il y a aussi les maladies d'origine parasitaire, comme la fonte des semis causé par *Pythium debaryanum*, *Pythium irregulare* et *Pythium ultimum*, ainsi que les maladies causées par des nématodes, comme la galle des racines (*Rotylenchulus reniformis*), les racines perlées (*Heterodera ciceri*, *Heterodera rosii*), les nœuds des racines (*Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne artiellia*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*) et les lésions des racines (*Pratylenchus brachyurus*, *Pratylenchus thornei*) (Street *et al.*, 2008).

#### 1. 10. 6 Insectes

Le pois chiche peut être la cible de beaucoup d'insectes comme la mouche des nodules, charançons de type *Sitona*, vers gris, pucerons, mineuses des feuilles, légionnaires, borers des cosses, chenilles de noctuidés, et bruchidés (Street *et al.*, 2008).

## Partie 2 Généralités sur *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceris*

### 2. 1 Introduction

*Fusarium oxysporum* (Fo) est l'un des champignons du sol les plus connus, c'est un champignon cosmopolite, toutes ses souches sont saprophytes et peuvent croître et survivre pendant de longues périodes sur la matière organique dans le sol et dans la rhizosphère de nombreuses espèces végétales (Fravel *et al.*, 2003). Fo est anamorphique et comprend à la fois des souches pathogènes et non pathogènes (Gordon et Martyn, 1997).

De nombreux isolats de Fo présentent une spécificité vis-à-vis de leur hôte, ce qui s'est traduit par la subdivision de l'espèce en formes spéciales (*formae speciales*) et races, plus de 100 formes spéciales et races de Fo ont été décrites. Le Fo peut être dispersé par de nombreux moyens différents, y compris le vent, le sol, les graines ou le matériel de plantation infecté (Garibaldi *et al.*, 2004; Leslie et Summerell, 2008).

## 2. 2 Formae Speciales, races et compatibilité végétative

Le *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Emend. Snyder et Hansen est un champignon qui appartient à la division des *Ascomycètes*, à la classe des *Sordariomycetes*, à l'ordre des *Hypocreales*, à la famille des *Nectriaceae* et au genre *Fusarium* (Michielse et Rep, 2009).

Les espèces pathogènes et non pathogènes de Fo ne peuvent être distinguées morphologiquement que si des tests de pathogénicité sont effectués. Les isolats pathogènes de Fo présentent un haut niveau de spécificité envers leur hôte (Fravel *et al.*, 2003). La catégorisation des souches par gamme d'hôtes différentiels peut ou non conduire à une subdivision naturelle au sein de l'espèce. L'hypothèse souvent avancée est que les isolats ayant une gamme d'hôtes partagée, et donc au sein de la même forma specialis, sont plus similaires génétiquement que les isolats ayant d'autres spécificités d'hôte. L'interprétation évolutive résultant de cette hypothèse est que les formae speciales sont monophylétiques et que les isolats avec une gamme d'hôtes partagée sont probablement dérivés d'un génotype pathogène unique (Kistler, 1997).

Le concept de race physiologique a été proposé en 1913 par Stakman et a été défini comme « un biotype ou un groupe de biotypes, au sein d'une espèce ou d'un taxon inférieur, qui peut être distingué avec une facilité et une certitude raisonnable des autres biotypes ou groupes de biotypes par des caractères physiologiques, y compris la pathogénicité » (Stakman *et al.*, 1962).

Comme la forma specialis, la race n'est pas un rang taxonomique formel et n'est pas codifiée par le code international de nomenclature pour les algues, les champignons et les plantes. Par conséquent, il n'y a pas de procédure normalisée pour nommer les races. Ils sont généralement numérotés par ordre chronologique de découverte (Edel-Hermann et Lecomte, 2019). Huit races pathogènes (races 0, 1A, 1B / C, 2, 3, 4, 5 et 6) peuvent être identifiées dans Foc, basée sur les réactions de la maladie sur un ensemble de cultivars différentiels de pois chiche (Haware et Nene, 1982; Correll, 1991). Les races 0 et 1B / C induisent les symptômes de jaunissement (pathotype de jaunissement), tandis que les races restantes provoquent le flétrissement (pathotype de flétrissement), en Inde on trouve les races 1A, 2, 3 et 4, au Maroc les races 1A, 5 et 6, en Espagne les races 0, 1A, 5 et 6, en Syrie 0, 1B/C (Jiménez-Gasco *et al.*, 2001; Jiménez-Gasco *et al.*, 2004) et en Algérie les races 0, 5 et 6 (Bouznad *et al.*, 1992 ; Bekkar, 2007).

Autres que les *formae speciales* et les races, les isolats de Fo peuvent être regroupés en groupes de compatibilité végétative (GCV), la compatibilité végétative signifie que deux hyphes peuvent s'anastomoser et fusionner pour former un hétérocaryon stable. On dit que les souches qui peuvent former un hétérocaryon stable sont compatibles sur le plan végétatif et appartiennent au même GCV, tandis que celles qui ne peuvent pas former de tels hétérocaryons sont incompatibles sur le plan végétatif et se trouvent dans différents GCV (Leslie et Summerell, 2008).

Les GCV sont identifiés à l'aide de mutants auxotrophes (nit) non utilisateurs de nitrate qui présentent une croissance rase sur un milieu minimal avec du nitrate comme seule source d'azote. Les isolats sont considérés comme végétativement compatibles lorsque les mutants nit appariés présentent une croissance plus dense là où les colonies des deux mutants se rencontrent (Puhalla, 1985). Il existe une corrélation entre la *forma specialis*, le GCV et les races pathogènes. Un seul GCV peut comprendre plusieurs races et une race donnée peut appartenir à plusieurs GCV, par exemple, dans le cas de *Fusarium oxysporum lycopersici*, trois races connues forment un seul GCV et les isolats d'une race donnée sont placés dans plusieurs GCV (Elias et Schneider, 1991).

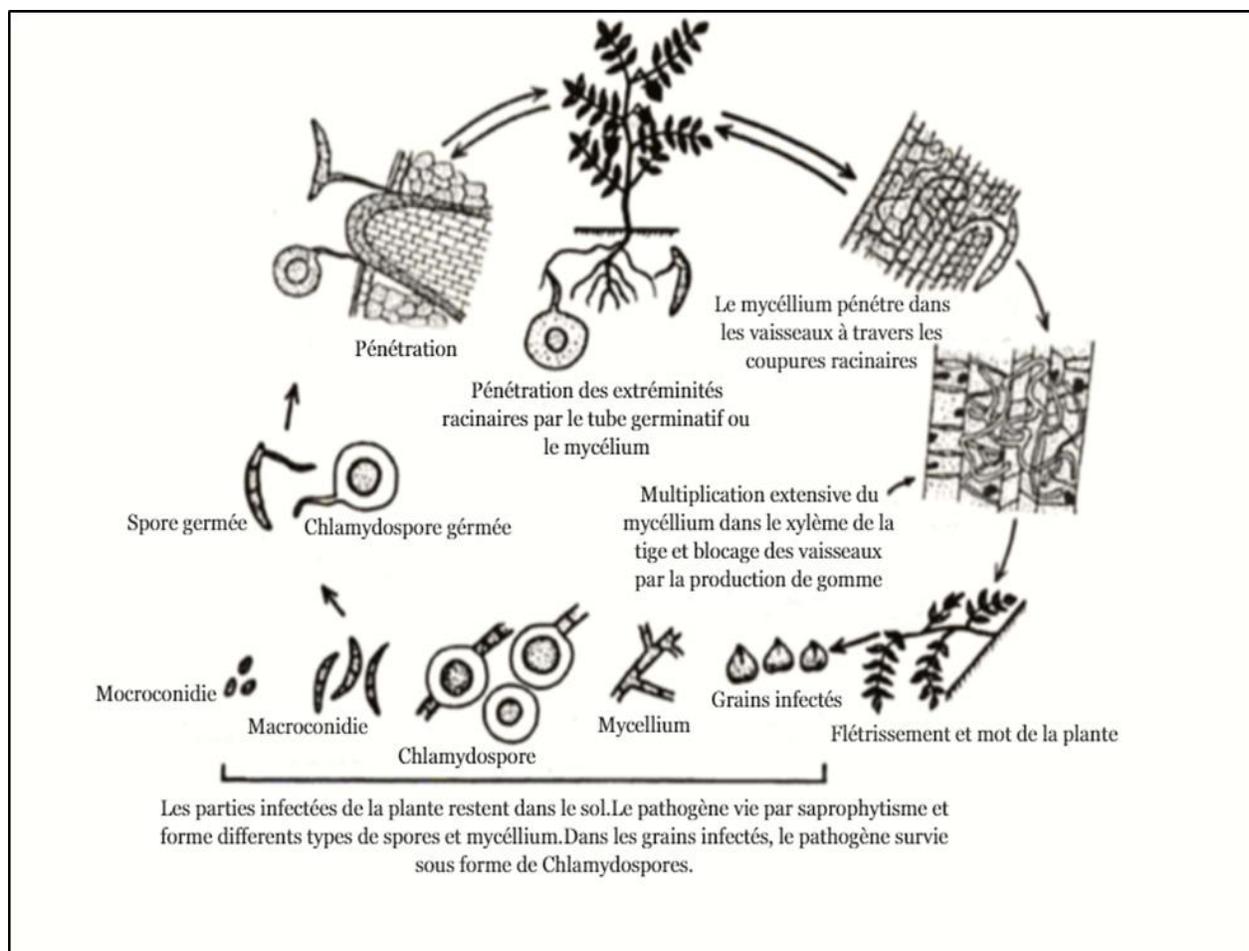
### 2. 3 Description et identification du *Fusarium oxysporum*

L'identification de Fo peut se faire à un certain degré en se basant sur des caractéristiques macroscopiques et microscopiques de culture pure. L'examen microscopique permet l'observation de microconidies qui sont abondantes, portées sur de fausses têtes sur de courts monophialides, généralement de forme unicellulaire, ovale ou réniforme, de macroconidies qui sont également abondantes, ressemblant une faucille, à paroi mince et délicate, avec une cellule apicale atténuée et une cellule basale en forme de pied, la présence de chlamydospores individuelles ou en paires qui se forment facilement et abondamment dans la plupart des isolats. Sur gélose PDA, la croissance est rapide et la couleur du mycélium aérien peut virer du blanc vers le pourpre, bleu, crème ou l'orange, La surface inférieure peut être incolore à bleu foncé ou violet foncé, et ces couleurs peuvent être visibles à travers le mycélium vu de dessus (Nelson *et al.*, 1983).

## 2. 4 Cycle évolutif du flétrissement vasculaire

Le flétrissement vasculaire du pois chiche est une maladie fongique causée par le Foc, l'un des facteurs les plus limitant de la production du pois chiche à travers le monde (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015). Généralement, la maladie se manifeste à travers les grains infectés et les sols infestés par le pathogène (Pande *et al.*, 2007). Le champignon peut survivre dans le sol et sur les débris de plantes en tant que chlamydospores pendant au moins 6 ans (Haware *et al.*, 1992 ; Singh *et al.*, 2008). La propagation à courte distance du pathogène peut se faire à travers la dispersion de sol infesté ou fragments de plante par l'eau, le vent, les machines ou l'activité humaine, les grains infectés jouent un rôle important dans la propagation à longue distance vers de nouvelles régions (Chen *et al.*, 2011).

La germination des chlamydospores peut être stimulée par les exsudats de racines de plantes hôtes ou non hôtes ou par contact avec les débris frais de plantes non colonisées (Nelson, 1981). Le tube germinatif des spores ou le mycélium pénètre dans les extrémités des racines de plantes saines poussant dans un sol contaminé, l'entrée est soit directe, par les blessures, soit opportuniste au point de formation des racines latérales. Le mycélium emprunte un chemin intercellulaire à travers le cortex et pénètre dans les vaisseaux du xylème par les perforations. L'agent pathogène est principalement confiné aux vaisseaux du xylème dans lesquels le mycélium se ramifie et produit des microconidies, ces dernières se détachent et sont transportées vers le haut dans le système vasculaire jusqu'à l'arrêt du mouvement, moment auquel elles germent et le mycélium pénètre dans la paroi du vaisseau adjacent, le mouvement latéral entre les vaisseaux se fait par les perforations. Les ressources en eau des plantes infectées finissent par être gravement touchées par le blocage des vaisseaux, ce qui entraîne la fermeture stomatique, le flétrissement et la mort des feuilles, souvent suivis de la mort de la plante entière, le champignon envahit ensuite tous les tissus de la plante pour atteindre la surface où il sporule abondamment (Cunnington *et al.*, 2016).



**Figure 3.** Cycle d'infection du *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Jalali et Chand, 1992 ; Lodhi *et al.*, 2016)

## 2. 5 Contrôle de la maladie

La gestion intégrée du flétrissement nécessite de nombreuses stratégies pour maintenir la santé des plantes, les stratégies comprennent l'utilisation minimale de fongicides chimiques pour réduire la population du pathogène, l'encouragement de l'utilisation d'agents biologiques bénéfiques pour lutter contre le champignon, la modification des méthodes de culture et l'utilisation de variétés résistantes de pois chiche (Haware *et al.*, 1990).

### 2. 5. 1 Les mesures agronomiques

Dû à sa nature persistante dans le sol, il est difficile d'éliminer le pathogène du champ, il serait mieux d'éviter de planter dans des champs fortement infestés quand la disponibilité de la terre n'est pas un facteur limitant (Haware, *et al.*, 1990).

Le temps optimal pour semer le pois chiche dépendra de l'interaction entre l'environnement et le germoplasme variétal disponible, les génotypes actuels de pois chiches ont une excellente tolérance au gel lorsqu'ils sont à l'état végétatif, mais présentent à l'inverse l'un des niveaux de température les plus élevés lors du développement des grains en comparaison avec les légumineuses de saison froide (hiver) (Leigh et Rohan, 2011). Il a été démontré que des températures minimales moyennes inférieures à 15 °C provoquent l'avortement des fleurs (Siddique et Sedgley, 1986 ; Clarke et Siddique, 2004), l'initiation de la floraison chez les pois chiches est influencée par les conditions photo-thermiques (Roberts *et al.*, 1985), mais dans la plupart des environnements, la température est le principal déterminant.

Concernant la date du semis, les cultures semées tôt attirent généralement plus de maladies. Plusieurs études ont suggéré que le contrôle de la maladie et le rendement sont plus élevés lorsque la plantation est retardée jusqu'à la dernière semaine d'octobre, la faible incidence de la maladie dans les cultures semées tardivement a été considérée comme étant due à la basse température régnant pendant la période des cultures semées tardivement (Chand et Khirbat, 2009).

La manière de semer peut aussi influencer l'exposition à la maladie, les plantes espacées de 15 à 20 cm ont une incidence de maladie beaucoup plus élevée que celles espacées de 7,5 cm ; cela a été attribué au système racinaire moins profond des plantes largement espacées qui sont susceptibles de flétrir lorsqu'elles sont soumises à un stress hydrique (Chand et Khirbat, 2009). La plantation des grains à une profondeur appropriée (10-12 cm) aide à réduire l'incidence de la maladie tandis que les cultures semées à une faible profondeur semblent attirer davantage de maladies.

Les cultures intercalaires / mixtes du blé, de l'orge, du lin et de la moutarde avec le pois chiche permettent de réduire l'incidence du flétrissement et d'augmenter le rendement en pois chiche, le taux le plus faible de flétrissement a été obtenu avec la culture intercalaire et la culture mixte avec des graines de lin. L'élimination des déchets infectés peut réduire les niveaux d'inoculum fusarien du pois chiche dans le sol (Asrat, 2017). Il a été démontré que la solarisation du sol en couvrant le sol avec une feuille de polyéthylène (100µm) transparente pendant 6-8 semaines durant les mois d'été contrôle efficacement le flétrissement fusarien du pois chiche et

améliore la croissance et le rendement des plantes, cependant, cette méthode de contrôle n'est pas pratique pour les systèmes agricoles de grande superficie (Chauhan *et al.*, 1988).

### 2. 5. 2 L'utilisation de cultivars résistants

L'utilisation de cultivars résistants peut améliorer l'efficacité des autres mesures de contrôle utilisées dans une stratégie de gestion intégrée, la résistance aux races de Foc a été identifiée principalement dans le germoplasme Desi et dans une moindre mesure chez le pois chiche Kabuli, ainsi que chez des *Cicer* spp sauvages. Une résistance combinée contre les races 0 et 5 a été identifiée dans les accessions de *C. bijugum*, *C. cuneatum*, *C. judaicum*, tandis que les accessions de *C. canariense* et *C. chorassanicum* et *C. pinnatifidum* étaient résistantes à la race 0 mais sensibles à la race 5 (Kaiser *et al.*, 1994).

Plus de 13500 accessions de germoplasme de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) provenant de 40 pays ont été évaluées pour la résistance à la race 1 de Foc à l'institut international de recherche sur les cultures des régions tropicales semi-arides (ICRISAT), Patancheru, Inde, cent soixante accessions ont été trouvées résistantes par criblage sur le terrain et en pot. Beaucoup de ces accessions résistantes provenaient de l'Inde et de l'Iran, cent cinquante lignes résistantes au flétrissement étaient de types Desi contre dix de types Kabuli (Haware *et al.*, 1992).

De même, 110 lignées résistantes ont été identifiées parmi 5174 germoplasme testées pour la résistance au flétrissement fusarien à l'ICARDA (Centre international de recherche agricole dans les zones sèches), 5 lignes du type Kabuli ; FLIP 84-43 C, ILC-127, ILC-129, ILC-237 et ILC-513 ont montré une haute résistance aux races 0 et 5 (Jiménez-Díaz *et al.*, 1991 ; Singh, 1997).

Des programmes de sélection de pois chiches au Mexique, ont mis au point plusieurs cultivars de Kabuli à grandes graines très résistants au flétrissement fusarien. Les cultivars Surutato 77 et Sonora 80 ont été développés en transférant des gènes de résistance de la lignée Desi L 1186 aux cultivars sensibles Macarena et Breve Blanco. Plus tard, des variétés très résistantes : Gavilan, Kino et Tubutama ont été dérivés de croisements dont Surutato 77 comme parent résistant. Autres cultivars à grandes graines et à haut rendement tel que UC 15 et UC 27 résistants aux races 0, 1A, 3, 4, 5 et 6 ont été obtenus à partir de croisements de Sonora X UC 5 (sensibles) en Californie (Chen *et al.*, 2011 ; Jimenez-Diaz *et al.*, 2013). En Tunisie, le cultivar

de kabuli à grandes graines résistant à la flétrissure Amdoun 1 a été développé par criblage et sélection à partir d'une variété locale (Halila et Harrabi, 1990).

La mesure de contrôle la plus pratique et la plus rentable est l'utilisation de variétés résistantes (Chen *et al.*, 2011) mais leur emploi reste limité à cause de leurs caractéristiques agronomiques qui peuvent être indésirables d'un côté et de la variabilité du pathogène qui les rend inefficaces d'un autre côté (Jiménez-Gasco *et al.*, 2004).

### 2. 5. 3 La lutte chimique

La lutte chimique est largement utilisée dans le passé et le présent pour contrôler le flétrissement fusarien du pois chiche, l'emploi de différentes catégories de fongicide seul ou en combinaison a fait l'objet de plusieurs études (Lodhi *et al.*, 2016). Selon Hossain *et al.* (2013), l'utilisation du Provax-200 à une concentration de 100 ppm provoque une inhibition de 100 % de la croissance des colonies fongiques. D'après l'étude menée par Andrabi *et al.* (2011), le traitement des semences par le même fongicide réduit significativement la maladie et augmente le rendement en graines

Le traitement des semences avec du Carbendazime augmente la germination des graines (71,24 %), un effet comparable a été obtenu avec du Carbendazime + Mancozèbe (62,21 %) et du Mancozèbe (61,46 %). Le rendement maximum (10,10 q / ha) a été enregistré avec l'application de Carbendazime, suivi de Carbendazime + Mancozèbe (9,77 q / ha). L'efficacité de 13 fongicides (Thiophanate-methyl, Carbendazim, Aliette, Dithane M-45, Copper oxychloride, Curzate, Nativo, Hombre-excel, Dividend star, Metalaxyl+Mancozeb, Antracol, Acrobat-Mz, et Baytanfoliar) à diminuer le développement de la maladie et à augmenter la croissance des plantes ainsi que le rendement en graines a été démontrée par Maitlo *et al.* (2014).

Les travaux de Patra et Biswas (2016) ont aussi démontré l'effet des fongicides sur le pathogène, l'utilisation in-vitro du Carbendazim à 1000 et 1500ppm a permis d'inhiber la croissance fongique à 100 %, l'application in-vivo pendant deux années consécutives a donné un minimum d'incidence égale à 9,66 % suivi par 10,12 % après l'utilisation de la combinaison Tebuconazole + Trifloxystrobin. Les résultats d'un dépistage en laboratoire de différents fongicides ont démontré que parmi les fongicides systémiques ; le Tébuconazole à 25,9 % s'est révélé assez efficace pour inhiber la croissance radiale du pathogène, tandis que dans le groupe

de fongicides non systémique, l'oxychlorure de cuivre à 50 % s'est révélé le plus performant, quant aux fongicides de combinaison ; Carbendazime 12 % + Mancozèbe 63 % ont significativement inhibé la croissance du champignon. Les fongicides les plus efficaces in-vitro ont été testés en serre (en culture de pot) ; la combinaison de Carbendazim 12 % + Mancozeb 63 % a montré une incidence minimale suivi de Carbendazim 50 %. (Golakiya *et al.*, 2018). Thaware *et al.* (2016) ont également démontré l'efficacité de divers fongicides (Carbendazim, Carboxin, Benomyl, Carbendazim + Mancozeb, Benomyl+ Thiram et Carbendazim + Thiram) à inhiber complètement la croissance du Foc.

Malgré leur efficacité en tant qu'agent de contrôle, la gestion du flétrissement fusarien par les fongicides est peu économique et difficile à réaliser en raison de la nature du pathogène à persister dans le sol et les graines (Ahmad *et al.*, 2010), de plus, leur application provoque la pollution des eaux souterraines, la perte de la flore bénéfique non ciblée et l'évolution de variétés résistantes aux fongicides. La recontamination par le pathogène des sols traités par des fongicides est souvent plus rapide en raison de l'absence de microflore compétitive conduisant à une incidence plus élevée de la maladie chez l'hôte sensible (Hossain *et al.*, 2013).

#### 2. 5. 4 La lutte par les plantes

Les fongicides d'origine végétale sont sans danger pour l'environnement et non phytotoxiques et peuvent être facilement préparés par les agriculteurs (Okigbo et Nmeko, 2005). L'effet antifongique d'extraits aqueux de quatre espèces végétales à savoir ; *Azadaracta indica* A. Juss., *Datura metel* L. var. *quinquecupida* Torr., *Ocimum sanctum* L. et *Parthenium hysterophorus* L. a été observé lors d'études *in vitro*, il a été constaté que les quatre extraits à une concentration de 40 % étaient efficaces pour contrôler la croissance mycélienne du Foc (Lodhi *et al.*, 2016). L'effet de l'extrait aqueux de feuilles d'ail sur le Foc a été étudié par Singh *et al.* (1979), la croissance du champignon en milieu liquide a été considérablement réduite par l'ajout d'une concentration de 7000 ppm de l'extrait. Les graines traitées à l'extrait et semées dans un sol infecté par l'agent pathogène ont produit des plantules sans flétrissement alors que toutes celles issues de graines non traitées ont montré des symptômes de flétrissement. L'huile de Neem (Margousier) a montré un effet inhibiteur maximum sur le Foc, *in vitro* ainsi que *in vivo* (Singh *et al.*, 1980). L'extrait de feuille d'*Azadirachta indica* à une concentration de 100 % a complètement inhibé la germination des spores pathogènes (Surender et Hari, 2004).

### 2. 5. 5 La lutte par les microorganismes

En tenant compte de l'effet néfaste des fongicides sur l'environnement et le développement de la résistance par le pathogène, et devant l'intérêt croissant pour l'agriculture durable, la recherche d'une autre alternative, comme la lutte biologique qui permet de supprimer le flétrissement vasculaire du pois chiche, mérite considération (Anjaiah *et al.*, 2003).

Des agents biologiques potentiels ont été identifiés pour le contrôle du flétrissement, comme *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma koningii* qui ont montré une antibiose et un mycoparasitisme envers le pathogène, d'autres résultats ont aussi montré la capacité de *Trichoderma* spp à réduire la mortalité des plantes causée par le Foc lorsqu'elles sont appliquées sur les semences et semées au champ (Asrat, 2017).

Le prétraitement des semis de pois chiches avec les isolats de *Rhizobium* spp active les gènes impliqués dans la promotion de l'accumulation de composés phénoliques/phytoalexines qui peuvent limiter le développement de la maladie (Arfaoui *et al.*, 2007). Selon Anjaiah *et al.* (2003), l'inoculation avec la souche PNA1 de *P. aeruginosa* permet de diminuer significativement l'incidence du flétrissement fusarien chez les géotypes sensibles ou modérément résistants du pois chiche. Plusieurs isolats de *Bacillus* spp ont également montré un fort effet antagoniste contre différentes races de Foc (Landa *et al.*, 1997).

## Partie 3 Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes

### 3. 1 Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes

Le concept de rhizosphère a été introduit pour la première fois par Hiltner pour décrire la fine zone de sol entourant les racines où les populations microbiennes sont stimulées par les activités racinaires. Le concept original a maintenant été étendu pour inclure le sol entourant les racines dont les propriétés physiques, chimiques et biologiques ont été modifiées par la croissance et l'activité des racines.

Les microorganismes qui colonisent la rhizosphère peuvent être classés en fonction de leurs effets sur les plantes et de la façon dont ils interagissent avec les racines, certains étant pathogènes tandis que d'autres exercent des effets bénéfiques de manière directe ou indirecte. Ainsi, les bactéries habitant la rhizosphère et qui sont bénéfiques pour les plantes sont appelées

rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (l'abréviation anglaise PGPR pour Plant Growth Promoting Rhizobacteria est souvent utilisée) (Saharan et Nehra, 2011).

Les racines des plantes offrent une niche pour la prolifération des bactéries du sol qui se développent sur les exsudats et les lysats racinaires. Bien que ces bactéries utilisent les nutriments libérés par l'hôte pour leur croissance, elles sécrètent également des métabolites dans la rhizosphère (Van Loon, 2007).

Les bactéries peuvent favoriser la croissance et le développement des plantes directement et indirectement. La stimulation directe comprend la fixation biologique de l'azote, la production de phytohormones comme les auxines, les cytokinines et les gibbérellines, la solubilisation de minéraux comme le phosphore et le fer, la production de siderophores et d'enzymes et l'induction d'une résistance systémique. Tandis que la stimulation indirecte est essentiellement liée au biocontrôle ; elle comprend la production d'antibiotiques, la chélation du Fe présent dans la rhizosphère, la synthèse d'enzymes extracellulaires impliquées dans l'hydrolyse de la paroi cellulaire fongique et la compétition pour des niches dans la rhizosphère (Kloepper *et al.*, 1980 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009 ; Ortíz-Castro *et al.*, 2009).

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes peuvent être utilisées de diverses manières lorsque l'amélioration de la croissance des plantes est nécessaire. Leur usage le plus fréquent est dans l'agriculture et l'horticulture. Plusieurs formulations PGPR sont actuellement disponibles en tant que produits commerciaux pour la production agricole. Les domaines d'utilisation des PGPR les plus récents comprennent la régénération des forêts et la phytoremédiation des sols contaminés (Lucy *et al.*, 2004).

## **3. 2 Genre *Bacillus***

### **3. 2. 1 Classification et systématique des *Bacillus***

Les premières tentatives de classification des espèces de *Bacillus* (B) étaient basées sur deux caractéristiques : la croissance aérobie et la formation d'endospores. Cela a entraîné le rattachement de nombreuses bactéries possédant différents types de physiologie et occupant une variété d'habitats. Par conséquent, l'hétérogénéité de la physiologie, de l'écologie et de la génétique a rendu difficile la catégorisation du genre *Bacillus* ou sa généralisation.

Dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1<sup>ère</sup> édition, 1986), le pourcentage en G+C d'espèces connues de *Bacillus* variait de 32 à 69 %, cette observation, ainsi que des tests d'hybridation d'ADN ont révélé l'hétérogénéité génétique du genre. Non seulement il y avait une variation d'une espèce à l'autre, mais il y avait parfois de profondes différences dans le pourcentage en G+C au sein des souches d'une même espèce, par exemple le cas du groupe *B. megaterium* dont la teneur en G+C variait de 36 à 45 % (Todar, 2020).

Dans le Manuel de bactériologie systématique de Bergey (2<sup>ème</sup> édition, 2004), les schémas de classification phylogénétique ont regroupé les types les plus importants de bactéries formatrices d'endospores en deux classes différentes de *Firmicutes* : *Clostridia* et *Bacilli*. La classe des *Clostridia* comprend l'ordre des *Clostridiales* et la Famille des *Clostridiaceae* avec 11 genres dont *Clostridium*. La classe des *Bacilli* comprend l'ordre *Bacillales* et la Famille *Bacillaceae*. Dans cette famille, il y a 37 nouveaux genres au même niveau que *Bacillus*. Ceci explique l'hétérogénéité de la teneur en G+C observée dans le genre *Bacillus* de 1986. (Todar, 2020).

Deux facteurs sont principalement responsables de cette augmentation rapide des espèces nommées de la systématique actuelles, l'une est l'application de méthodes d'enrichissement et d'isolement plus diverses et plus efficace qui permettent de mieux tenir compte de la variabilité physiologique et des besoins nutritionnels et culturels de ces organismes ubiquitaires. L'autre est le développement de méthodes nouvelles et toujours plus sophistiquées pour la caractérisation et l'identification des souches bactériennes, notamment au niveau génétique, dont l'analyse des séquences ARNr / ADN 16S qui a permis, d'une part, de séparer des espèces du genre central *Bacillus* pour former de nouveaux genres et, d'autre part, de définir de nouveaux genres afin d'être attribuer aux nouveaux isolats (Stackebrandt et Swiderski, 2002 ; Fritze, 2004).

Aujourd'hui, *Bacillus* n'est qu'un parmi toute une série de genres BAFE (bactéries aérobies formatrices d'endospores) dont le nombre d'espèces validées continue d'augmenter. La description de ces genres et espèces est basée à un certain degré sur les traits morphologiques, biochimiques, physiologiques et chimiotaxonomiques et sur les résultats de diverses techniques de génétique moléculaire. Cependant, bien que la structure systématique de base est aujourd'hui déterminée par la comparaison des séquences de l'ARNr / ADN 16S, les méthodes classiques

restent toujours utiles quand les résultats obtenus par séquençage sont insuffisantes ou insatisfaisantes (Stackebrandt et Swiderski, 2002 ; Fritze, 2004).

### 3. 2. 2 Principales caractéristiques des *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est constitué de bactéries sporulées en forme de bâtonnets. En 2020, 293 espèces/sous-espèces de *Bacillus* ont été identifiées, c'est 149 de plus que ce qui est indiqué dans la version la plus récente du Manuel de bactériologie systématique de Bergey. Cette grande différence dans le nombre d'espèces entre ces deux sources est due d'un côté à la diversité des *Bacillus* et d'un autre côté au développement d'outils moléculaires tel que le séquençage d'ADN qui ont permis la découverte de ces nouvelles espèces.

Les espèces de *Bacillus* sont principalement Gram-positives avec quelques exceptions qui ont été caractérisées comme Gram-négatives (*B. azotoformans*, *B. farraginis*, *B. fordii*, *B. fortis*, *B. oleronius* et *B. subterraneus*). Elles peuvent être mobiles ou non mobiles, aérobies ou anaérobies facultatives (quelques anaérobies stricts), avec des colonies de morphologie différentes, elles sont ubiquistes et comprennent les halophiles, les alcaliphiles, les psychrophiles, les thermophiles, les phototrophes et les autotrophes (Cote *et al.*, 2015 ; Patel et Gupta, 2020).

Les spores permettent aux *Bacillus* de résister à la chaleur, sécheresse et autres facteurs qui sont destructifs à la forme végétative (Gordon *et al.*, 1973 ; Turnbull, 1996), la forme de la spore varie d'une espèce à l'autre, le genre peut être divisé en 03 groupes selon la morphologie du sporange et de la spore :

Groupe 1 : les bactéries produisent des spores centrales ou terminales, ellipsoïdales ou cylindriques qui ne distendent pas le sporange. Il comprend deux sous-groupes :

- Le sous-groupe à grandes cellules (largeur des cellules bacillaires  $\geq 1\mu\text{m}$ ), comprend *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* et *B. megaterium*.
- Le sous-groupe à petites cellules, comprend *B. pumilus*, *B. subtilis* et *B. licheniformis*.

Groupe 2 : les bactéries ont des sporanges gonflés avec des spores ellipsoïdes centrales ou terminales, ce groupe contient principalement *B. circulans*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. popilliae*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. alvei*, *B. stearothermophilus* et *B. brevis*.

Groupe 3 : les bactéries ont des sporanges gonflés avec des spores terminales ou subterminales, exemple, *B. sphaericus* (Drobniewski, 1993).

Généralement, les *Bacillus* sont catalase positive, chimio-hétérotrophes capables de respirer en utilisant une variété de composés organiques simples (sucres, acides aminés, acides organiques). Dans certains cas, elles fermentent également les glucides dans une réaction mixte qui produit généralement du glycérol et du butanediol. Quelques espèces, comme *B. megaterium*, ne nécessitent aucun facteur de croissance organique ; d'autres peuvent nécessiter des acides aminés, des vitamines B ou les deux (Todar, 2020).

La majorité est mésophile, avec des optima de température entre 30 et 45 degrés, mais certains sont des thermophiles avec des optima pouvant atteindre 65 degrés. D'autres sont de vrais psychrophiles, capables de croître et de sporuler à 0 degré. On les trouve en croissance sur une plage de pH de 2 à 11. En laboratoire, dans des conditions optimales de croissance, les espèces de *Bacillus* présentent des temps de génération d'environ 25 minutes (Breed *et al.*, 1948 ; Todar, 2020).

### 3. 2. 3 Usage industriel des *Bacillus*

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont les championnes de la sécrétion enzymatique. En biotechnologie de la production des protéines, les espèces *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. licheniformis* sont devenues les plus populaires grâce à leurs excellentes propriétés fermentatives avec des rendements élevés allant de 20 à 25g/L ainsi qu'à l'absence totale de sous-produits toxiques. *B. subtilis*, en particulier a fait l'objet d'études approfondies pendant de nombreuses années et par conséquent, elle est actuellement la bactérie Gram-positive la mieux caractérisée (van Dijl et Hecker, 2013).

La capacité de différentes espèces à fermenter dans les gammes de pH acide, neutre et alcalin, combinée à la présence de thermophiles dans le genre, a conduit au développement d'une variété de nouveaux produits enzymatiques commerciaux avec la température, le pH et la stabilité souhaités qui répondent à une variété d'applications spécifiques (van Dijl et Hecker, 2013).

La production de pesticides microbiens comme les delta-endotoxines produites lors de la sporulation par *B. thuringiensis*, *B. popilliae* et *B. lentimorbus* contre les insectes de l'ordre

*Lépidoptère* ou *Diptère* représente une solution qui permet potentiellement de diminuer l'usage des pesticides chimiques et leurs effets toxiques sur l'homme et l'environnement (Harwood, 1989 ; Martin et Travers, 1989).

Le genre *Bacillus* est probablement la source bactérienne la plus importante de protéases et est capable de produire des rendements élevés d'enzymes protéolytiques neutres et alcalines avec des propriétés remarquables (une stabilité élevée aux températures extrêmes, au pH, aux solvants organiques, aux détergents et aux composés oxydants). Ces protéases peuvent être utilisées dans différents secteurs industriels, dans l'élimination des fibres de laine (industrie du textile), comme détergents (élimination des taches du sang), dans la production de peptides bioactifs et dans l'affinage du fromage (secteur alimentaire). Parmi les espèces les plus connues pour la production de protéases on cite : *B. polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* (Contesini *et al.*, 2018).

L'usage de *Bacillus*-DFM (direct-fed microbials) produisant un ensemble variable d'enzymes et de composés antimicrobiens, peut contribuer à l'amélioration de la digestibilité des nutriments, à la réduction de la viscosité intestinale, à la conservation d'un microbiote intestinal bénéfique et à la promotion d'une intégrité intestinale saine chez les volailles (Latorre *et al.*, 2016).

En industrie alimentaire, la pullulanase sécrétée par *B. subtilis* ATCC6051 est utilisée pour la solubilisation d'amidon (Liu *et al.*, 2018), l'amylase et  $\beta$ -glucanase sécrétées par *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* sont également utilisées en fabrication des boissons. Le D-ribose est fréquemment utilisé comme exhausteur de goût dans les aliments. Plusieurs souches de *B. subtilis* et *B. pumilus* et leurs mutants auraient produit des quantités importantes de D-ribose. Les récents développements en génie génétique et en technologie de fermentation ont contribué à l'amélioration de la productivité du D-ribose par les fermentations de *Bacillus* (De Wulf et Vandamme, 1997).

Les *Bacillus* sont également utilisés dans le secteur pharmaceutique et plus précisément dans la fabrication des antibiotiques. Les colistines, polymixines, et circulines sont des antibiotiques synthétisés par *Bacillus* spp. et qui interfèrent avec la fonction de la membrane, la

bacitracine est un autre antibiotique produit par *Bacillus*, il est responsable de l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Schallmey *et al.*, 2004).

### 3. 2. 4 *Bacillus* comme agent de biocontrôle

L'amélioration de la santé et de la productivité des plantes se font à travers l'introduction de bactéries comme *Bacillus*. Les *Bacillus* se présentent sous différentes formes ; comme bio-fertilisateurs ; qui sont des produits contenant des microorganismes vivants. Leur application se fait sur la semence, la surface de la plante ou le sol. Les microorganismes colonisent la rhizosphère et favorisent la croissance des plantes grâce à un apport accru en nutriments primaires (fixation de l'azote, solubilisation du phosphate). Comme phytostimulants à travers la production des phytohormones comme l'acide indole acétique (AIA), l'acide gibbérellique, les cytokinines et l'éthylène ou comme biopesticides qui permettent de contrôler les pathogènes par la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, d'HCN, siderophores et d'antibiotiques (Vessey, 2003 ; McSpadden Gardener, 2004 ; Bhattacharyya et Jha, 2012).

En général, les *Bacillus* ont un large spectre d'activité antagoniste contre les bactéries, les champignons et les virus pathogènes des plantes. Parmi les molécules produites les plus importantes, les lipopeptides circulaires de la famille de surfactine, d'iturine et de fengycine qui affectent les cellules cibles au niveau de la membrane. Les souches de *Bacillus* expriment leur capacité de lutte biologique principalement par leur activité inhibitrice de la croissance des agents phytopathogènes, ainsi que par l'induction d'une résistance systémique chez les plantes et par la concurrence pour des niches écologiques avec les agents pathogènes des plantes (Fira *et al.*, 2018).

Plusieurs études ont été menées pour tester l'effet des *Bacillus* contre les phytopathogènes, selon Ntushelo *et al.* (2019) diverses espèces de *Bacillus* ont démontré leur potentiel en tant qu'agents de biocontrôle à travers la production de composés bioactifs qui permettent l'inhibition de la croissance de *F. graminearum*. Par ailleurs, une réduction considérable de la sévérité du flétrissement chez les plantes infectées par Fo a été observée après l'emploi de plusieurs souches de *Bacillus* (*B. simplex* 30N-5, *B. simplex* 11, *B. simplex* 237, and *B. subtilis* 30VD-1) (Khan *et al.*, 2018).

*B. amyloliquefaciens* SYBC H47 a montré une activité antifongique importante contre *Aspergillus niger*, *Mucor racemosus*, *F. oxysporum* et *Penicillium citrinum* grâce à la production de substances antifongiques primaires telles que la bacillomycine L, la fengycine et la surfactine (Li *et al.*, 2016). *B. subtilis* CaB5 permet l'inhibition de la croissance du Foc jusqu'à 72 % (présence de gènes de synthèse d'antibiotiques) comme elle stimule la croissance de la plante (Smitha *et al.*, 2017). *B. aneurinilyticus* et *B. firmus* ont également démontré leur pouvoir antifongique contre Foc à travers la production de substances antifongiques (diffusibles et volatiles) (Abed *et al.*, 2016). *B. amyloliquefaciens* MF352007, *B. subtilis* MF352017 et *B. tequilensis* MF352019 ont induit une résistance contre le Foc ainsi qu'une réduction du flétrissement jusqu'à 98-100 %, leur application a permis d'améliorer efficacement la croissance des plantes (Bekkar *et al.*, 2018).

Kumari et Khanna (2016) ont montré que les espèces de *Bacillus* peuvent réduire significativement la croissance du Foc à travers la synthèse de substances antifongiques comme  $\beta$ -1,4 glucanase, chitinase, siderophores, cyanure d'hydrogène. Outre l'amélioration de la tolérance au Foc, l'isolat *B. subtilis* K18 a montré un effet PGPR sur les génotypes sensibles autant que résistants par une amélioration considérable de la longueur des pousses, la longueur des racines, le poids frais et le volume des racines par rapport aux génotypes de pois chiches témoins (Suthar *et al.*, 2017).

Les *Bacillus* agissent en se fixant aux parois des cellules mycéliennes, la chitosanase, la protéase, la cellulase, la glucanase, les siderophores et le HCN fissurent et déforment les hyphes, ce qui entraîne une modification de la structure et des fonctions cellulaires en raison de la vacuolisation et des fuites de protoplasmiques. Les peptides antifongiques synthétisés, tels que l'iturine, la fengycine, la mixirine, la pumilacidine, la surfactine ainsi qu'un nouveau peptide cyclique d'un poids moléculaire de 852,4 Da, sont impliqués dans la destruction des champignons pathogènes dans les rhizosphères. *Bacillus* spp. diminuent le stress biotique induit par les agents pathogènes via des changements physiologiques dans les voies photosynthétiques, respiratoires et la régulation du métabolisme des glucides, des phénylpropanoïdes, de l'azote et des protéines liées à la défense dans les plantes malades (Radhakrishnan *et al.*, 2017).

### 3. 3 Genre *Pseudomonas*

#### 3. 3. 1 Classification et identification des *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* fait partie de la division des *Proteobacteria*, de la classe des *Gammaproteobacteria*, de l'ordre *Pseudomonadales* et de la famille des *Pseudomonadaceae*. Il a été décrit à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle par Migula (1894), lorsque les descriptions des genres étaient basées sur les morphologies macro et microscopiques, une pratique universellement acceptée par les taxonomistes microbiens. Au 20<sup>ème</sup> siècle, les caractéristiques physiologiques ont été proposées comme critères de base pour la taxonomie bactérienne (Brenner *et al.*, 2005).

Dans le manuel de Bergey publié en 1923, plusieurs caractéristiques phénotypiques ont été ajoutées à la morphologie, à la coloration de Gram, au type de flagellation et au métabolisme par rapport à l'oxygène, afin de différencier les espèces du genre *Pseudomonas*. Lorsque les techniques basées sur l'ADN ont commencé à permettre l'utilisation d'approches génétiques dans la taxonomie bactérienne (Schildkraut *et al.*, 1961 ; Peix *et al.*, 2018), la composition en base d'ADN (G+C) et l'hybridation d'ADN-ADN ont été les premières techniques appliquées à la taxonomie de *Pseudomonas* (Colwell *et al.*, 1965). Les changements les plus profonds de la taxonomie bactérienne se sont produits dans les années 1980, lorsque Woese et ses collaborateurs ont proposé l'analyse des séquences de l'ARN ribosomal 16S pour la classification des bactéries plaçant le genre *Pseudomonas* dans les *GammaProteobacteria* (Woese *et al.*, 1984).

Plusieurs critères phénotypiques et chimiotaxonomiques ont prouvé leur utilité dans la classification et l'identification des *Pseudomonas* mais malgré cela, les techniques les plus précises sont les procédures basées sur la génomique, qui comprennent les empreintes génétiques d'acide nucléique; particulièrement utilisées pour l'analyse de la biodiversité, et l'analyse de la séquence des gènes ; qui peuvent être utilisées pour l'analyse de la biodiversité et pour les études phylogénétiques et taxonomiques (Peix *et al.*, 2018). En ce qui concerne l'analyse des gènes, le gène de l'ARNr 16S continue d'être la base de la classification bactérienne permettant la différenciation du genre *Pseudomonas* des genres de bactéries rémanentes (Palleroni, 2005).

### 3. 3. 2 Principales caractéristiques des *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* (P) sont très abondantes dans la nature et peuvent être isolées à partir de différentes matières naturelles. Les caractéristiques morphologiques de base communes à presque toutes les espèces sont la forme bacillaire droite et la présence d'un ou plusieurs flagelles polaires. Aucune spore n'est produite et la réaction de Gram est négative (Palleroni, 2009). Les *Pseudomonas* sont Aérobies, à métabolisme strictement respiratoire avec l'oxygène comme accepteur d'électrons final ; dans certains cas, le nitrate peut être utilisé comme un accepteur d'électrons alternatif. Presque toutes les espèces ne poussent pas dans des conditions acides (pH 4,5 ou moins). Oxydase positive ou négative et catalase positive. Les *Pseudomonas* sont des bactéries chimio-organotrophes qui peuvent croître sur différents substrats organiques (à l'exception des composés mono-carbonés) (Stolp et Gadkari, 1981).

Les *Pseudomonas* peuvent produire une variété de pigments allant du bleu, rouge, jaune jusqu'au vert, certaines sont capables de diffuser des pigments fluorescents sous UV. Les *Pseudomonas* sont typiquement mésophiles, mais certaines espèces peuvent croître à différentes températures comme *P. fluorescens* qui peut croître à 4 °C et *P. aeruginosa* qui pousse à 41 °C (Palleroni, 2009).

### 3. 3. 3 Usage industriel des *Pseudomonas*

Plusieurs études ont été effectuées sur les diverses applications des *Pseudomonas* dans différents secteurs industriels, en médecine, *P. aeruginosa* produit une large gamme de composés ayant une activité bactériostatique ou bactéricide, qui sont essentiels dans le contrôle des bactéries multi-résistantes (BMR). Il a été démontré qu'une souche de *P. aeruginosa* est capable de sécréter un composé organométallique ayant une activité inhibitrice contre les BMR comme *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (Cardozo *et al.*, 2013).

Lors de la colonisation des souches de *P. aeruginosa*, ces dernières produisent des composés nommés Pyocines qui éliminent les microorganismes à travers l'endommagement de l'ADN et la dépolarisation cellulaire (Michel-Briand et Baysse, 2002). *P. aeruginosa* peut produire un rendement élevé d'hydroxytyrosol, une molécule qui a suscité un intérêt élevé de l'industrie pharmaceutique en raison de ses effets antimicrobiens, anti-inflammatoires, de

neuroprotection, antitumoraux et de chimiomodulation ainsi qu'à son rôle contre les maladies cardiovasculaires et le syndrome métabolique (Allouche *et al.*, 2004 ; Anayo *et al.*, 2019).

La pyocyanine est le pigment responsable de la coloration bleue-verte caractéristique de certaines *Pseudomonas* spp. Diverses études antimicrobiennes expliquant la bio-activité des souches de *P. aeruginosa* sécrétrices de pyocyanine ont été menées. Des études ont également été menées sur la capacité de la pyocyanine à cibler les cellules tumorales. Dans l'industrie textile, les pigments phénaziniques peuvent être appliqués comme colorants textiles, ce qui permet de réduire les coûts de production et de favoriser la sensibilisation à l'utilisation durable des produits naturels dans les processus industriels (Anayo *et al.*, 2019).

La pâte à papier (pulpe) qui est une matière première importante en industrie du papier est généralement préparée de manière chimique ou mécanique, Jia (2015) a introduit une nouvelle méthode biologique qui fait usage d'une solution constituée d'un complexe bactérien comprenant entre autres *P. fluorescens*.

La lipase sécrétée par *P. aeruginosa* a des applications biotechnologiques spécifiques dans divers secteurs industriels tels que la cosmétologie, la gestion des déchets environnementaux, la production des aliments et la production de biodiesel (Sharma *et al.*, 2001). La vanilline synthétisée par *P. aeruginosa* est l'un des composants les plus importants des arômes naturels, elle est largement utilisée dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Ashengroph *et al.*, 2011).

Actuellement, les Rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* constituent la classe la plus essentielle des bio-surfactants, ils sont utilisés en industrie alimentaire, en particulier pour augmenter la durée de vie des produits, pour contrôler la consistance des crèmes glacées et des boulangeries, pour solubiliser les huiles aromatiques et pour stabiliser les graisses (Pornsunthorntawee *et al.*, 2008 ; Irfan-Maqsood et Seddiq-Shams, 2014). Afin de dégrader l'hydrocarbure de pétrole, les *Pseudomonas* libèrent des bio-surfactants qui permettent de réduire le pétrole brut de haut poids moléculaire en pétrole à bas poids moléculaire, ce qui permet aux bactéries d'utiliser l'hydrocarbure de pétrole (Zhang *et al.*, 2012).

Les micro-organismes du sol, y compris les *Pseudomonas*, qui sont fréquemment exposés aux pesticides, peuvent développer de nouvelles capacités qui permettent de dégrader ces

produits chimiques. Des recherches ont révélé que le processus de dégradation microbienne pour détoxifier les contaminations par les pesticides peut être utilisé efficacement pour surmonter les problèmes de pollution (Anayo *et al.*, 2019).

### 3. 3. 4 *Pseudomonas* comme agent de biocontrôle

L'inoculation des plantes par certaines souches de *Pseudomonas* spp s'accompagne en effet d'une augmentation significative du rendement de la culture. Celle-ci résulte de la stimulation de la croissance des plantes et de leur protection contre des microorganismes pathogènes (Lemanceau, 1992).

Deux types de mécanismes sont responsables de ces effets bénéfiques. L'un concerne la modification des équilibres microbiens au niveau de la rhizosphère, l'autre la modification du métabolisme et de la physiologie de la plante. Ainsi, la compétition et l'antibiose exercées par les *Pseudomonas* spp réduisent la densité et l'activité néfaste de microorganismes pathogènes. Elles affectent également la croissance des plantes en améliorant leur alimentation minérale et en synthétisant des substances de croissance. Ces bactéries peuvent enfin provoquer une augmentation du niveau de résistance des plantes aux maladies (Lemanceau, 1992).

Plusieurs souches de *P. fluorescens* ont été rapportées pour leur effet solubilisant du phosphate, Les souches CLW17, JW-JS1 et FXW-HS7A sont capables de dissoudre le phosphate insoluble à partir de différentes sources comme le phosphate tricalcique, phosphate de fer, phosphate d'aluminium et l'hydroxyapatite et le rendre disponible pour être absorbé par la plante. *P. fluorescens* N21.4 peut stimuler la plante pour augmenter sa teneur en isoflavones, anthocyanes qui peuvent à leur tour renforcer le mécanisme de défense de la plante pour résister à l'attaque pathogène (Kalita et Ram, 2019). *P. putida* a été rapporté pour sa capacité à produire l'AIA, une phytohormone qui augmente la croissance des racines, résultant en une plus grande surface racinaire qui permet une meilleure absorption des nutriments (Mayak *et al.*, 1999).

Plusieurs espèces de *Pseudomonas* stimulent la relation symbiotique entre les légumineuses et les rhizobia, une inoculation du pois par *P. fluorescens* et de la luzerne par *P. syringae* ont produit une augmentation du taux de nodulation (Knight et Langston-Unkefer, 1988 ; Andrade *et al.*, 1998). *P. putida* joue un rôle important dans le biocontrôle du complexe de la pourriture racinaire du pois chiche (causé par *Meloidogyne incognita* et *Macrophomina*

*phaseolina*), L'inoculation du pois chiche avec la bactérie a augmenté de manière significative la croissance de la plante, le nombre de gousses, la chlorophylle, l'azote, le phosphore et le potassium et a réduit l'indice de la maladie (Akhtar et Siddiqui, 2007).

Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont été évaluées pour leur effet antagoniste contre le flétrissement fusarien du pois chiche, les résultats ont révélé qu'elles inhibent la germination des spores fongiques, réduisent l'incidence de la maladie, favorisent la croissance des plantes et augmentent significativement la germination des grains (Kaur *et al.*, 2007).

L'application de *P. fluorescens* au niveau des champs atteints de fusariose a permis de contrôler de manière efficace la maladie (Ramezani, 2009). Une amélioration nette de l'état de la plante (une augmentation de la hauteur et du poids frais et sec) a été observée après une application *in vivo* de *P. aeruginosa* (Karimi *et al.*, 2012). Une autre étude menée par Landa *et al.* (2004) a démontré l'effet bénéfique de *P. fluorescens* dans la suppression de la maladie et l'augmentation du rendement en grains. La souche *P. chlororaphis*-66 a également inhibé la croissance du Foc à travers la production de composés antifongiques comme l'HCN, l'ACC-désaminase et les enzymes hydrolytiques (chitinase, cellulase, protéase) (Shurigin *et al.*, 2018).

L'acide salicylique (AS) est un composé phénolique qui affecte une variété d'activités biochimiques et moléculaires associées à l'induction d'une résistance aux maladies. Dans une étude menée par Saikia *et al.* (2003); une augmentation considérable dans la longueur des pousses et des racines a été enregistrée avec les plantes de pois chiche malades traitées par *P. fluorescens*, cette bactérie a induit une résistance systémique contre le flétrissement causé par le Foc, l'analyse HPLC a démontré que l'amélioration de l'état de la plante est due à la production d'AS par la bactérie. Une diminution de l'incidence du flétrissement de 96 % a été observée chez les plantes de pois chiche après l'application de diverses souches de *P. fluorescens* (Inam-ul-Haq *et al.*, 2003).

### **3. 4 Les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote**

#### **3. 4. 1 Classification et systématique**

La fixation de l'azote, la réduction du diazote moléculaire en ammoniac, est exclusivement une caractéristique procaryote. De nombreuses plantes en bénéficient grâce aux associations symbiotiques plante-procaryote. L'une de ces associations est celle entre les

bactéries *Rhizobiaceae*, qui infectent les hôtes végétaux d'une famille taxonomique particulière, les *fabaceae* (Long, 1989). Le terme de « rhizobia », ou bactérie nodulaire racinaire, est le nom collectif commun donné à diverses bactéries du sol symbiotiques fixatrices d'azote qui peuvent former des nodules racinaires et / ou de tige sur les légumineuses (Wang *et al.*, 2019).

La taxonomie de ces bactéries est en constante évolution, en grande partie à cause du développement rapide de techniques de biologie moléculaire raffinées. L'isolement et la caractérisation de nouvelles bactéries, souvent différentes, qui forment des nodules sur une variété d'hôtes végétaux a conduit à nommer de nombreuses nouvelles espèces de rhizobiums (rhizobia) (Shamseldin *et al.*, 2017).

Au début du XXe siècle, la nodulation de diverses espèces de légumineuses a été largement étudiée et la spécificité de la symbiose entre les isolats rhizobia et les plantes hôtes a été reconnue. Sur la base de cette spécificité, des groupes de nodulation croisée ont été décrits pour les rhizobia isolés à partir d'un spectre d'espèces de légumineuses où les plantes peuvent partager leurs micro-symbiotes pour la nodulation (Wang *et al.*, 2019).

Ce concept a été abandonné suite aux études ultérieures qui ont démontré les grandes similitudes phénotypiques entre des souches appartenant à différents groupes de nodulation. Après la nodulation croisée, la taxonomie numérique a été introduite dans la taxonomie des rhizobia. Il s'agit d'une technique qui utilise des ordinateurs pour comparer un nombre important de caractères phénotypiques, couvrant la morphologie, les conditions de croissance (pH, température et salinité), les spectres des ressources C et N, les caractéristiques métaboliques (production d'acide / alcali, respiration / fermentation) et la résistance aux antibiotiques et autres produits chimiques (Graham, 1964 ; Moffett et Colwell, 1968), les taux GC ont également été utilisés pour la classification des rhizobia (De Ley et Rassel, 1965).

Après les années 1970, de nombreuses analyses de séquences d'ADN ont été introduites dans les études taxonomiques des rhizobiums. Ces analyses ont été utilisées pour estimer les relations génétiques et phylogénétiques. La phylogénie du gène de l'ARNr 16S est largement utilisée comme critère principal pour la définition des espèces rhizobia, des genres et des niveaux taxonomiques supérieurs. Jusqu'à récemment, la définition des espèces rhizobia était principalement basée sur l'approche polyphasique, qui couvre les relations évolutives issues des

données de séquence génique (gène d'ARNr 16S et gènes domestiques), les caractéristiques chimiotaxonomiques, physiologiques et culturelles. Cependant, le développement du séquençage du génome entier a ouvert une nouvelle ère de taxonomie bactérienne. L'analyse du génome d'au moins des souches types de chaque espèce pourrait être utilisée pour la définition du genre (Wang *et al.*, 2019).

Appartenant à la division des *Proteobacteria*, à la classe des *Alphaproteobacteria*, et l'ordre des *Rhizobiales*, la famille des *Rhizobiaceae* comprend actuellement 14 genres dont *Rhizobium* est le genre type, les différents genres avec le nombre d'espèce de l'année 2020 sont présentés dans le tableau 3 (Shamseldin *et al.*, 2017 ; Parte, 2020).

**Tableau 3.** Genres de la famille des *Rhizobiaceae* avec nombre d'espèces.

Genres	Nombre d'espèces
<i>Agrobacterium</i>	09
<i>Allorhizobium</i>	07
<i>Carbophilus</i>	01
<i>Ciceribacter</i>	03
<i>Gellertiella</i>	01
<i>Georhizobium</i>	01
<i>Kaistia</i>	09
<i>Liberibacter</i>	01
<i>Neorhizobium</i>	03
<i>Pararhizobium</i>	06
<i>Pseudorhizobium</i>	01
<i>Rhizobium</i>	90
<i>Shinella/ Crabtreella</i>	08
<i>Ensifer/ Sinorhizobium</i>	20

### 3. 4. 2 Principales caractéristiques des rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries de taille moyenne et de forme bacillaire. Gram négative et ne forme pas d'endospore. Mobiles par un seul flagelle polaire ou deux à six flagelles péritriches.

Selon l'âge de la bactérie les rhizobia peuvent présenter une coloration de Gram inégale. Les cellules d'une jeune culture et les bactéroïdes nodulaires présentent généralement une coloration de Gram uniforme tandis que les cellules plus anciennes donnent une apparence en bandes avec des zones non colorées. Les rhizobia sont des chimio-organotrophes principalement aérobies et sont relativement faciles à cultiver, elles se développent bien en présence d'O<sub>2</sub> et utilisent des glucides et des composés aminés relativement simples. La croissance optimale de la plupart des souches se réalisent dans un intervalle de température compris entre 25 à 30 °C et un pH entre 6,0 à 7,0. Malgré leur métabolisme aérobie habituel, de nombreuses souches peuvent bien se développer dans des conditions micro-aérophiles à des pressions d'O<sub>2</sub> inférieures à 0,01 atm. La plupart des rhizobia n'absorbent que faiblement le colorant rouge Congo, lorsqu'elles sont cultivées sur milieux d'isolement, généralement CRYEMA (Congo Red Yeast Extract Mannitol Agar) (Somasegaran et Hoben, 1994).

*Rhizobium* et *Ensifer* sont les deux genres des *Rhizobiaceae* les plus étudiés avec le nombre d'espèces le plus élevé, 90 et 20 espèces respectivement. Le tableau 4 résume les caractéristiques morphologiques, microbiologiques, biochimiques et moléculaires les plus importantes des deux genres.

**Tableau 4.** Principales caractéristiques de *Rhizobium* et *Ensifer* (Alves et al., 2014)

Caractéristiques	<i>Rhizobium</i>	<i>Ensifer</i>
Aspect microscopique	Bacilles avec 1,2-3µm de longueur et 0,5-1µm de largeur	Bacilles libres ou en paire avec 1-1,9µm de long et 0,7-1,1µm de large
ADN G+C %	57-66	63
Aspect macroscopique	Colonies circulaires et convexes, opaques ou semi-translucides, blanches ou beiges, 2-4mm de diamètre (après 3 à 5 jours)	Colonies blanches grisâtres, circulaires avec marges ondulées, convexes, visqueuses et opaques, 10-15mm de diamètre (après 6 jours)
Caractéristiques métaboliques et culturelles	Ne peut pas croître dans un milieu avec 2 % NaCl	Peut croître dans un milieu avec 2,5 % NaCl mais pas dans un milieu avec 4 % NaCl.

### 3. 4. 3 Usage industriel des rhizobia

Certains polymères produits par les bactéries appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* peuvent avoir des applications industrielles, notamment les polysaccharides extracellulaires dénommés exopolysaccharides (EPS) (Sutherland, 2001 ; Skorupska *et al.*, 2006).

L'intérêt pour les EPS a considérablement augmenté ces dernières années car ces composés ont de nombreuses applications commerciales, notamment dans les produits alimentaires, pharmaceutiques, les bioémulsifiants, les biofloculants (Alves *et al.*, 2014) et comme agents antibiofilms (Rendueles *et al.*, 2013).

Les EPS peuvent être appliquées comme épaississants, stabilisants, émulsifiants, coagulants, biofilms, gélifiants, dispersants et agents de suspension (Sutherland, 1998). Abd-Alla *et al.* (2012) ont rapporté que l'isolat *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* peut être utilisé dans la technologie de bio-remédiation comme alternative peu coûteuse et efficace pour éliminer et récupérer les ions de métaux lourds ( $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$ ) d'une solution aqueuse. *Mesorhizobium amorphae* isolée de la racine de *Robinia pseudoacacia* poussant dans le sol contenant les résidus de la mine d'or de Taibai, Gansu province, nord-ouest de la Chine peut être utilisée dans l'assainissement des métaux lourds en particulier la contamination par le cuivre (Mohamad *et al.*, 2009).

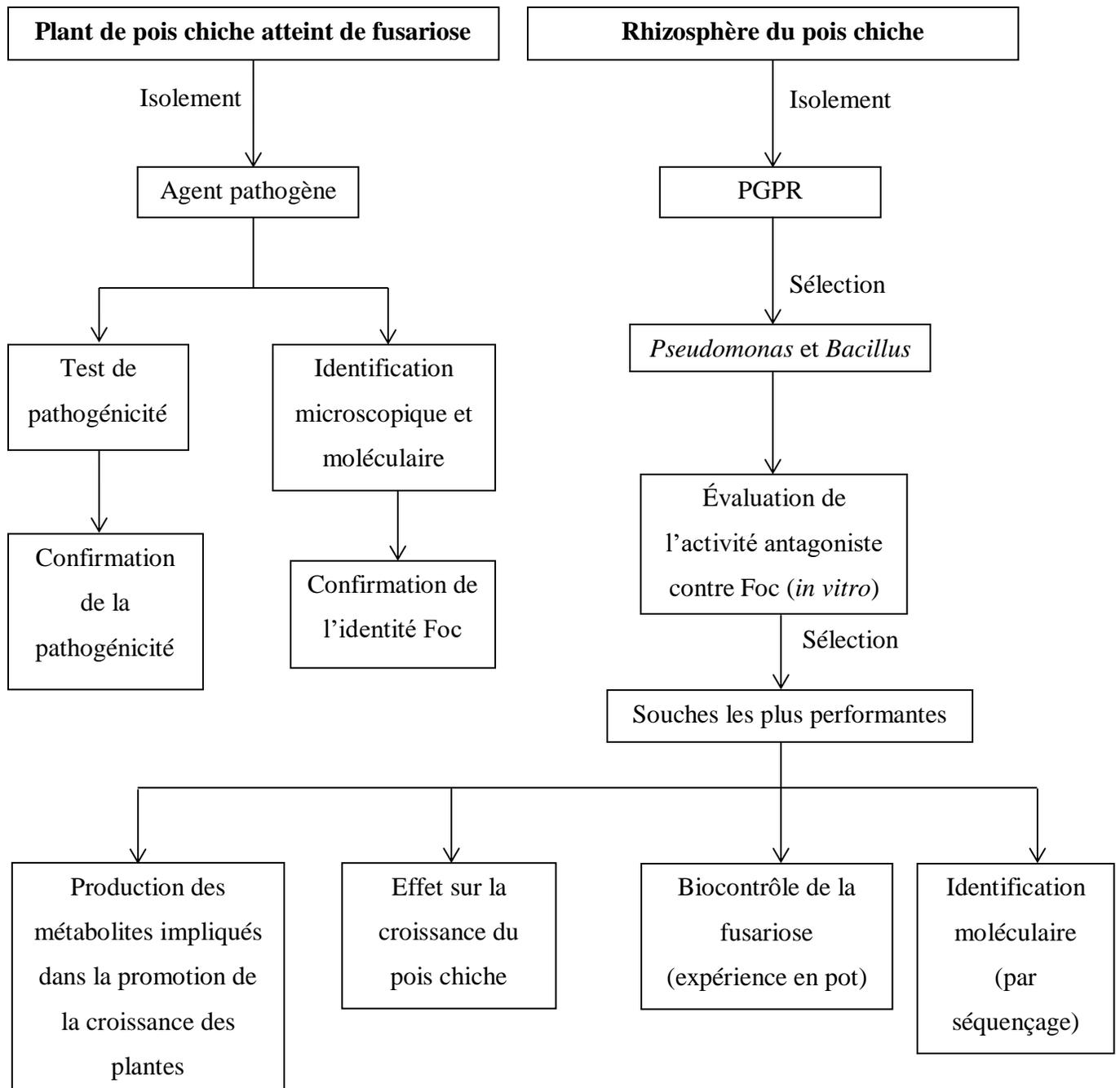
Les bactéries appartenant au genre *Ensifer* sont capables de dégrader le Thiamethoxam (THIA), un insecticide utilisé à travers le monde. Des études environnementales ont révélé que la dégradation microbienne est le principal mode d'élimination de ce pesticide du sol (Alves *et al.*, 2014). *Ensifer adhaerens*, a la capacité de produire de l'alliinase, une enzyme ayant un pouvoir fongicide en utilisant l'alliine comme précurseur (Yutani *et al.*, 2011). Une étude menée par Oliveira *et al.* (2007) a révélé que plusieurs souches de rhizobiums d'Amazonie centrale peuvent produire de l'amylase en utilisant diverses substances féculentes comme sources de carbone. Ces bactéries présentent une source prometteuse d'amylase pour des applications biotechnologiques, en particulier dans l'industrie de l'amidon. La fixation d'azote par les rhizobia dans les légumineuses offre des avantages économiques importants pour la production agricole en réduisant le coût des engrais azotés (Allito *et al.*, 2015).

### 3. 4. 4 Rhizobia comme agent de biocontrôle

Plusieurs souches rhizobia ont des propriétés de lutte biologique. L'utilisation de ces souches contre les agents pathogènes transmis par le sol peut conduire à un contrôle potentiel. L'utilisation de *Rhizobium leguminosarum* RPN5, isolée des nodules racinaires d'haricot commun, s'est avérée efficace contre Fo, *Macrophomina phaseolina*, *F. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* et *Colletotrichum* sp. et ce par confrontation directe et par l'utilisation de filtrat de culture acellulaire. Il a été démontré que *Mesorhizobium* en combinaison avec *Xanthomonas maltophilia* améliore la croissance et la productivité du pois chiche, augmente le nombre de nodules et leur biomasse. Par ailleurs, l'application de *Pseudomonas* sp. CDB 35 et BWB 21 en co-inoculation avec *Rhizobium* sp. IC59 et IC76 a diminué l'incidence de la pourriture du collet du pois chiche (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Une étude menée par Arfaoui *et al.* (2005) a démontré l'effet bénéfique de deux isolats *Rhizobium* sur le flétrissement fusarien du pois chiche. Le traitement des semences des cultivars ILC482 et INRAT87/1 par les isolats PchDMS et Pch43 a permis une nette diminution du taux de mortalité (de 79,16 % à 12,5 % et 33,33 % respectivement pour le cultivar ILC482 et de 54,16 % à 8,33 % et 12,5 % pour INRAT87/1), une stimulation des activités peroxydasiques et polyphénolixidasiques ainsi qu'une accumulation des composés phénoliques impliqués dans les défenses de la plante ont été enregistrés.

L'utilisation de biofilm *Trichoderma viride* – *Mesorhizobium ciceri* en tant qu'agent de lutte biologique a montré une amélioration significative de plusieurs paramètres favorisant la croissance des plantes, y compris une augmentation de 13 à 21 % de la germination des graines, de la production d'ammoniac, de l'AIA et plus d'une multiplication par deux de la solubilisation du phosphate, par rapport à l'usage individuel du *Mesorhizobium*, une augmentation de 10 à 11 % de l'activité antifongique contre le Foc a également été enregistrée. L'activation d'enzymes liées à la défense comme la L-phénylalanine ammoniac lyase, la peroxydase et le polyphénol oxydase était plus élevée dans les plantes traitées par le biofilm que dans les plantes non inoculées dans un sol infecté (Das *et al.*, 2017).

# *Chapitre 2 : Matériels et méthodes*



**Figure 4.** Schéma général des différents tests effectués dans la présente étude

## Partie 1 Isolement et caractérisation de l'agent pathogène

### 1. 1 La collecte des échantillons infectés

Les échantillons de pois chiche utilisés dans cette étude ont été prélevés à partir des sites suivants : l'institut technique des grandes cultures (36°09'49.6"N 5°22'13.3"E) et l'université Ferhat Abbas de Sétif (36°11'52.1"N 5°22'05.2"E). L'échantillonnage a été réalisé durant l'année 2017, les plantes présentant les symptômes typiques du flétrissement vasculaire (jaunissement des feuilles, décoloration du système vasculaire et flétrissement (Jiménez-Gasco *et al.*, 2001)), ont été arrachées du sol et placées dans des sachets puis conservées à 4 °C en vue d'utilisation ultérieure.

### 1. 2 Isolement et purification de l'agent pathogène

Les parties de la tige et de la racine atteintes par la maladie ont été coupées aseptiquement en petits fragments et désinfectées à l'aide d'alcool 95 % pendant 3 minutes, puis rincées soigneusement avec de l'eau distillée stérile. Après séchage en conditions de stérilité, les fragments de tiges et de racines ont été déposés dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose PDA (potato dextrose agar) à raison de six fragments par boîte. Les boîtes ont été ensuite incubées à l'obscurité à 30 °C pendant cinq jours. Après incubation, les boîtes ont été retirées de l'étuve et les hyphes émergés à partir des extrémités des fragments ont été transférés dans des nouvelles boîtes contenant de la gélose PDA, les boîtes ont été ensuite remises à l'étuve jusqu'au développement de colonies fongiques (pendant sept jours) (Rapilly, 1968).

La purification des isolats fongiques a été effectuée par la culture monosporelle (single spore culture). Un volume de 10 ml d'eau distillée stérile a été ajouté aux colonies fongiques puis les boîtes ont été doucement agitées par des mouvements circulaires pour libérer les spores, la suspension sporale ainsi obtenue a été utilisée pour la préparation des dilutions décimales (de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-8}$ ). Un volume de 0.1 ml de chaque dilution a été ensuite étalé sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose agar 2 %. Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 24 h à 48 h puis elles ont été inspectées sous stéréomicroscope pour vérifier la germination des spores. Les spores germées ont été prélevées et transférées dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose PDA à raison d'une spore par boîte. Les boîtes ont été ensuite incubées à 30 °C pendant sept jours. Les cultures pures ainsi obtenues ont été conservées à 4 °C en vue d'utilisation ultérieure (Nelson *et al.*, 1983).

### **1. 3 Identification et caractérisation des isolats fongiques**

#### **1. 3. 1 Caractérisation macroscopique**

La caractérisation des isolats fongiques a été effectuée en premier lieu par l'observation à l'œil nu de l'apparence du mycélium aérien (longueur et densité), de la couleur du mycélium des deux côtés de la boîte de Pétri (recto verso) et des différents pigments libérés dans le milieu (Nelson *et al.*, 1983).

#### **1. 3. 2 Caractérisation microscopique**

Cet examen permet l'identification des pathogènes à travers l'observation de la morphologie des différentes structures qui sont spécifiques à chaque espèce (forme des spores, hyphes septé ou non, aspect des phialides), ce test est réalisé en déposant un fragment du mycélium entre lame et lamelle en présence ou en absence de colorant (bleu coton) (Nelson *et al.*, 1983).

#### **1. 3. 3 Etude de la pathogénicité des isolats fongiques**

Afin de confirmer la pathogénicité des isolats, un test de pathogénicité a été effectué en suivant le protocole d'Hassan *et al.* (2014) :

##### **1. 3. 3. 1 Préparation de l'inoculum fongique**

Les isolats ont été repiqués chacun dans une boîte de Pétri contenant de la gélose PDA puis incubés à 30 °C pendant quatre jours, après développement des cultures fongiques, cinq disques de gélose ont été prélevés de chaque boîte et transférés dans des flacons contenant un mélange préalablement stérilisé (par autoclavage) d'orge et d'eau distillée (100 g d'orge mélangé avec 100 ml d'eau distillée), puis incubés à 30 °C pendant 14 jours avec agitation.

##### **1. 3. 3. 2 Préparation du matériel végétal**

Les grains de pois chiche de la lignée ILC 482 (susceptible au Foc) (Zemouli-Benfreha *et al.*, 2014), fournis par l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA) ont été désinfectés à l'aide d'hypochlorite de sodium 12° pendant 3 min puis lavés soigneusement avec de l'eau distillée stérile avant de les mettre à germer à température ambiante entre deux papiers filtre stérilisés et humidifiés.

### 1. 3. 3. 3 Infection par l'inoculum fongique

Le substrat de culture utilisé a été préparé en mélangeant un tiers de sol, un tiers de sable et un tiers de terreau, l'ensemble a été stérilisé par autoclavage à 121 °C pendant 1 h. le mélange a été ensuite divisé sur des pots en plastic perforés d'une contenance de 1500 ml auxquels l'inoculum fongique préalablement préparé a été rajouté à une concentration finale de 2 %.

Les grains de pois chiche germés ont été transférés dans les pots infectés à raison de trois grains par pot, trois pots ont été utilisés pour chaque isolat et des pots contenant de l'orge non infectés ont servi de témoin. Les plantes ont été examinées pendant une période de 45 jours et les symptômes (présence ou absence de jaunissement et / ou flétrissement) ont été notés.

### 1. 3. 4 Identification moléculaire des isolats fongiques

#### 1. 3. 4. 1 Extraction de l'ADN

L'identification a été réalisée au sein du laboratoire des Grandes Cultures de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT). L'extraction de l'ADN a été effectuée selon la méthode de Möller *et al.* (1992) avec quelques modifications :

- Collecte du mycélium par grattage de la surface de la gélose PDA recouverte par la culture fongique.
- Broyage du mycélium par addition progressive de petites quantités d'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre.
- Transfert de la poudre résultante dans un microtube.
- Addition de 500 µl de tampon d'extraction TES (TRIS-HCl 0,10 M, EDTA 0,01 M et SDS à 2 %).
- Incubation du mélange à 60 °C pendant 30 min.
- Addition de 140 µl de NaCl (5 M) et 65 µl de CTAB (10 %).
- Incubation à 65 °C pendant 10 min.
- Homogénéisation du mélange avec 700 µl de chloroforme-alcool isoamylique (24: 1).
- Centrifugation pendant 5 min à 13500 tr / min.
- Transfert du surnageant dans un nouveau microtube.
- Addition de 150 µl d'acétate d'ammonium.
- Incubation sur glace pendant 30 min.

- Centrifugation du mélange pendant 30 secondes à 13500 tr / min.
- Transfert de 500 µl de surnageant dans un nouveau microtube.
- Addition de 500 µl d'isopropanol.
- Centrifugation pendant 5 min à 13500 tr / min.
- Elimination du surnageant.
- Lavage du culot deux fois avec 100 µl d'éthanol froid à 70 %.
- Séchage du culot.
- Mise en suspension de l'ADN précipité dans 100 µl de tampon TE (Tris-HCl 0,01 M, EDTA 0,001 M).

### 1. 3. 4. 2 Amplification par Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Les champignons isolés ont été caractérisés à l'aide de deux ensembles spécifiques d'amorces PCR. Le premier ensemble développé par Mishra *et al.* (2003) qui permet l'identification du Fo, à travers l'amplification d'un fragment de 340 pb (FOF : 5'-ACATAC-CACTTGTTGCCTCG-3' et FOR : 5'-CGCCAATCAATTTGAGGAACG-3'). Le deuxième ensemble, développé par Jiménez-Gasco et Jiménez-Díaz (2003), qui permet l'identification du Foc à travers l'usage d'amorces spécifiques (Foc12F : 5'-GGCGTTTCGCAGCCTTACAATGAAG-3' et Foc12R : 5'-GACTCCTTTTTCCCGAGGTAGGTCAGAT-3') qui génèrent des bandes de 1503 pb. Les PCR ont été réalisées dans un volume de 25 µl contenant : 1 µl de chaque amorce, 2,5 µl de la matrice ADN, 8 µl d'H<sub>2</sub>O ultra-pure et 12,5 µl du mélange réactionnel CSL-JADNA PCR. Les amplifications d'ADN ont été réalisées dans un thermocycleur SimpliAmp, selon le cycle spécifique à chaque ensemble (Tableau 5).

**Tableau 5.** Les conditions des cycles PCR des paires d'amorces Fo et Foc

Conditions de PCR	PCR Fo	PCR Foc
Dénaturation initiale	94 °C pendant 1 min	94 °C pendant 2 min
Nombre de cycle	25	28
Dénaturation	94 °C pendant 1 min	94 °C pendant 30 s
Hybridation	58 °C pendant 30 s	58 °C pendant 1 min
Élongation	72 °C pendant 1 min	72 °C pendant 30 s
Élongation finale	72 °C pendant 7 min	72 °C pendant 4 min

### 1. 3. 4. 3 Electrophorèse

Les gels de migration ont été d'abord préparés en dissolvant de l'agarose dans du tampon TBE à une concentration de 2 % (p/v), 3 µl du colorant bromure d'éthidium ont été ajoutés aux gels qui ont été ensuite versés dans les plaques de manière à entourer les peignes, une fois les gels refroidis les peignes ont été retirés et les produits PCR ont été remplis dans les puits formés. Les plaques avec les gels chargés par les amplifiats PCR ont été transférées dans les cuves d'électrophorèse qui ont été ensuite remplies avec le tampon TBE. L'échelle d'ADN GeneOn 100bp Plus Blue a été utilisée comme marqueur de poids moléculaire. Après migration des amplifiats, les gels ont été récupérés puis examinés sous lumière UV dans Vilbert Lourmat™ Ebox, les bandes développées ont été comparées à celles du marqueur (Turenne *et al.*, 1999).

## Partie 2 Isolement et caractérisation des PGPR

### 2. 1 Prélèvement des échantillons

Dans le but de l'obtention des rhizobactéries, des échantillons de pois chiche ont été collectés aléatoirement à partir des parcelles de pois chiche localisées au département d'agronomie de l'université Ferhat Abbas de Sétif. Les plantes ont été prélevées de manière à conserver la masse de sol adhérente aux racines (rhizosphère). Les échantillons ont été ensuite placés dans des sacs en plastique et réservés au froid (4 °C) en vue d'utilisation ultérieure.

### 2. 2 Isolement des *Pseudomonas*

L'isolement des *Pseudomonas* à partir de la rhizosphère du pois chiche a été effectué en suivant le protocole de Gowsalya *et al.* (2014) ; les plantes ont été légèrement secouées afin de libérer le sol entourant les racines. 1 g de sol a été transféré dans un tube contenant 10 ml d'eau distillée stérile, des dilutions décimales ont été préparées en prélevant 1 ml de la solution qui précède et le mélanger avec 9 ml d'eau distillée stérile pour constituer la solution qui suit et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-5}$ . Les tubes ont été bien vortexés avant la préparation de chaque dilution. 1 ml de chaque dilution a été étalé sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose King B (KB) et incubé à 30 °C pendant 48 h. Après incubation, les colonies individuelles ont été ensemencées sur de nouvelles boîtes de Pétri jusqu'à l'obtention de cultures pures.

### 2. 3 Isolement des *Bacillus*

Pour l'isolement des *Bacillus*, la méthode de Travers *et al.* (1987) avec quelques modifications a été appliquée. 1 g de sol récupéré de la zone rhizosphère a été mélangé avec 10 ml d'eau distillée stérile. La solution obtenue est transférée dans un bain-Marie pour subir un traitement thermique à une température de 65 °C pendant 30 min, les dilutions décimales ont été préparées comme décrit précédemment. Un volume de 0,1 ml de chaque dilution a été étalé sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (GN), les boîtes ont été ensuite incubées à 30 °C pendant 48 h. Les colonies individuelles développées sur le milieu ont été repiquées jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

### 2. 4 Identification préliminaire des isolats *Pseudomonas* et *Bacillus*

Afin de pouvoir sélectionner les *Pseudomonas* spp. et les *Bacillus* spp. à partir des rhizobactéries qui ont poussé sur KB et GN, une série de tests macroscopiques, microscopiques et biochimiques a été effectuée en se basant sur les critères d'identification de chaque genre décrits par Cowan et Steel (1961).

#### 2. 4. 1 Identification préliminaire des isolats *Pseudomonas*

L'identification des isolats *Pseudomonas* s'est basée sur les critères suivants :

- a) Production de pigments : plusieurs espèces de *Pseudomonas* peuvent produire des pigments, la majorité d'entre elles produisent la pyoverdine, un pigment fluorescent de couleur jaune-verte. D'autres pigments tels que la pyocyanine (bleu), la pyorubine (marron rougeâtre) et la pyomélanine (brun à noir) peuvent également être produits (Hossain, 2014).
- b) Gram négatif : la mise en évidence des bactéries à Gram négatif a été réalisée par la coloration de Gram, ces bactéries apparaissent roses lors de l'examen microscopique. Un test à la potasse a également été effectué afin de confirmer les résultats, il consiste à déposer quelques colonies bactériennes sur une lame à laquelle on ajoute quelques gouttes de la solution KOH (3 %). Les colonies sont ensuite mélangées avec la solution par des mouvements circulaires à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. L'obtention d'un mélange visqueux qui forme un filament quand on soulève la pipette indique que la bactérie testée est une bactérie à Gram négatif (Suslow *et al.*, 1982).

- c) Bacille mobile : la forme et la mobilité des bactéries ont été déterminées par l'observation microscopique à l'état frais.
- d) Catalase positive : ce test a été réalisé en transférant des colonies bactériennes sur une lame à laquelle on ajoute quelques gouttes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 %). La formation de bulles d'oxygène, indique que la bactérie est catalase positive (Hussain *et al.*, 2013).
- e) Oxydase positive : ce test consiste à humidifier du papier filtre avec quelques gouttes de tetraméthyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1 %). L'apparition d'une couleur violette après l'ensemencement de la bactérie sur le papier est un signe d'oxydase positive (Hussain *et al.*, 2013).
- f) Oxydation du glucose : ce test permet de distinguer entre la dégradation aérobie et anaérobie (fermentation) du glucose. Les bactéries ont été ensemencées sur 2 tubes contenant le milieu Hugh Leifson, puis une quantité d'huile minérale a été ajoutée à l'un des deux tubes (condition d'anaérobiose). Les deux tubes ont été ensuite incubés à 30 °C et le changement de la couleur du milieu a été noté. le virage de la couleur du rouge vers le jaune uniquement dans le tube dépourvu d'huile minérale (condition d'aérobiose) est considéré comme un signe d'oxydation du glucose (Tille, 2015).

#### 2. 4. 2 Identification préliminaire des isolats *Bacillus*

L'identification des isolats *Bacillus* s'est basée sur les critères suivants :

- a) Gram positif : la mise en évidence des bactéries à Gram positif a été réalisée par la coloration de Gram, ces bactéries apparaissent violettes lors de l'examen microscopique. La confirmation des résultats a été effectuée par le test de la potasse qui ne donne pas lieu à la formation d'un filament visqueux (Suslow *et al.*, 1982).
- b) Bacille : la forme des bactéries a été déterminée par l'observation microscopique.
- c) Sporulée : la mise en évidence de l'endospore a été réalisée par la méthode de Schaeffer-Fulton. Elle consiste à inonder le frottis bactérien par une solution de vert malachite, le frottis est ensuite chauffé à la vapeur pendant quelques minutes avant d'être rincé à l'eau, une solution de safranine est appliquée puis rincée à son tour avec de l'eau, après séchage, la lame est observée au microscope. Les endospores apparaissent vertes alors que les cellules végétatives sont colorées en rose (Tille, 2015).
- d) Catalase positive : ce test a été réalisé de la même manière décrite pour les *Pseudomonas*.

## Partie 3 Evaluation de l'activité promotrice de la croissance des plantes

### 3. 1 Etude de l'activité antagoniste *in vitro*

Ce test permet de vérifier si les bactéries isolées possèdent une activité antifongique vis-à-vis des isolats fongiques. Cette activité est révélée in-vitro à travers l'inhibition de la croissance mycélienne des pathogènes. Les bactéries peuvent agir par la production de composés antifongiques diffusibles et/ou volatiles.

L'évaluation de l'activité antagoniste a été effectuée pour les isolats *Pseudomonas* et *Bacillus* ainsi que pour *Sinorhizobium meliloti* (*Ensifer meliloti*), une bactérie fixatrice d'azote isolée à partir des nodosités du pois chiche. La bactérie a été aimablement fournie par Dr. Dekkiche Samia de l'université de Batna.

#### 3. 1. 1 Production de composés antifongiques (test de co-culture)

La production de composés antifongiques par les bactéries a été évaluée en suivant un protocole modifié d'Erdogan et Benlioglu (2010) qui consiste à prélever un disque de 5 mm à partir d'une gélose PDA contenant la culture fongique âgée de 7 jours, et le placer sur un côté d'une boîte de Pétri contenant de la gélose PDA. De l'autre côté, un volume de 10 µl de la suspension bactérienne ( $1,5 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) a étéensemencé à une distance de 3 cm du disque fongique. Les boîtes ont été ensuite incubées à 30 °C pendant 7 jours. Les boîtes qui ont servi de témoin ont été préparées de la même manière mais elles ont étéensemencées avec de l'eau physiologique au lieu de la suspension bactérienne.

#### 3. 1. 2 Production de composés volatiles antifongiques (CVA)

L'évaluation de l'effet antifongique des composés volatiles libérés par les bactéries a été effectuée en suivant le protocole de Dilantha Fernando et Linderman (1995) avec quelques modifications, ce protocole consiste à utiliser des boîtes de Pétri divisées en deux compartiments, cette méthode assure qu'il n'y aura aucun contact physique entre le champignon et la bactérie, et donc l'action inhibitrice ne peut être causée que par les CVA libérés par les antagonistes. Un disque fongique de 5 mm âgé de 4 jours a été placé sur une moitié de la boîte contenant de la gélose PDA, sur l'autre moitié 10 µl de suspension bactérienne ( $1,5 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) ont étéensemencés sur la gélose KB (pour les isolats *Pseudomonas*), GN (pour les isolats *Bacillus*) et la

gélose yeast mannitol agar (YEMA) (pour *S. meliloti*). Les boîtes sans bactérie ont servi de témoin et la croissance fongique a été mesurée après 7 jours.

Trois répétitions ont été utilisées pour chaque isolat dans les deux tests d'antagonisme. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne a été calculé en utilisant la formule d'Etebarian *et al.* (2005):

$$I = \frac{(D_T - D_B)}{D_T} \times 100$$

I : pourcentage d'inhibition du champignon (%).

$D_T$  : diamètre du mycélium dans la boîte témoin (mm).

$D_B$  : diamètre du mycélium dans la boîte inoculée par la bactérie (mm).

### 3. 1. 3 Consortiums rhizobactéries-*Sinorhizobium*

L'effet antagoniste des bactéries a été également évalué par des consortiums avec *S. meliloti*. Avant d'entamer le test d'antagonisme, chaque bactérie a été soumise à un test de compatibilité avec *S. meliloti*, ce test consiste à ensemencer les 2 bactéries en stries singulières perpendiculaires l'une sur l'autre sur gélose PDA, après incubation pendant 48 h/30 °C, les boîtes sont observées pour l'apparition de zones d'inhibition. L'absence de zones d'inhibition entre les 2 bactéries indique qu'elles peuvent être utilisées en consortium (Yanti & Hamid, 2021).

Afin d'évaluer l'effet antagoniste du consortium, un volume de la suspension bactérienne *Pseudomonas* ou *Bacillus* ( $1,5 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) a été mélangé avec le même volume de la suspension *S. meliloti* ( $1,5 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>). 10 µl du mélange obtenu ont été ensemencés sur un côté de la gélose PDA, et sur l'autre côté, un disque fongique de 5 mm âgé de 7 jours a été placé à une distance de 3 cm. Les boîtes ont été ensuite incubées à 30 °C pendant 7 jours. Trois répétitions ont été utilisées pour chaque consortium (Yanti *et al.*, 2018). Le pourcentage d'inhibition du champignon a été calculé selon la formule d'Etebarian *et al.* (2005).

### 3. 1. 4 Effet des bactéries sur la morphologie des champignons

Afin d'examiner l'impact des bactéries sur les isolats Foc, un examen microscopique de la morphologie des hyphes des champignons a été réalisé. Ce test consiste à prélever des fragments de Foc à partir des boîtes du test d'antagonisme (Foc traités par les bactéries) et à partir des boîtes témoin (sans bactérie) et les placer entre lame et lamelle pour l'observation. La morphologie de l'hyphes des Foc inhibés par les bactéries est ensuite comparée à celle du témoin. Ce test a été effectué pour *S. meliloti* ainsi que pour les *Pseudomonas* et *Bacillus* qui ont enregistré les pourcentages d'inhibition fongique les plus élevés.

### 3. 2 Recherche des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance des plantes

*S. meliloti* ainsi que les *Pseudomonas* et *Bacillus* qui ont enregistré les pourcentages d'inhibition les plus élevés contre les isolats Foc ont été évalués pour leurs propriétés de promotion de la croissance des plantes. Trois répétitions ont été utilisées pour chacun des tests suivants :

#### 3. 2. 1 Production de la protéase

La production de protéase a été évaluée en suivant le protocole de Sheeba *et al.* (2017). Les bactéries ont été inoculées par spots sur de la gélose au lait écrémé composée de 1 g L<sup>-1</sup> de peptone et de 20 g L<sup>-1</sup> d'agar, auxquels du lait écrémé a été rajouté à une concentration de 10 % du volume final. Après inoculation des bactéries, les boîtes ont été incubées pendant trois jours à 30 °C. L'apparition d'une zone claire produite autour des colonies a été considérée comme un signe d'activité protéolytique.

#### 3. 2. 2 Production d' $\alpha$ -amylase

Les bactéries ont été ensemencées sur de la gélose à l'amidon préparée comme suit (g L<sup>-1</sup>) : extrait de bœuf (3), amidon soluble (10), agar (12), le pH a été ajusté à 7,5 ± 0,2, après incubation à 30 °C pendant 48 h, les boîtes ont été inondées avec une solution de Lugol, les isolats présentant une zone claire autour des colonies ont été marqués comme producteurs d' $\alpha$ -amylase (Zimbro *et al.*, 2009).

### 3. 2. 3 Production de la lipase

Les bactéries ont étéensemencées par piqure sur un milieu composé de (g L<sup>-1</sup>): peptone (10), NaCl (5), CaCl<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O (0,1), agar (18), auquel du Tween 80 pré-stérilisé a été ajouté à une concentration finale de 1 % (v/v), le pH du milieu a été ajusté à 7,4, les boites ont été ensuite incubés à 30 °C pendant six jours. L'apparition d'un halo opaque entourant les colonies a été notée comme une indication de l'activité lipolytique (Sierra, 1957).

### 3. 2. 4 Production de la cellulase

Les bactéries ont étéensemencées sur de la gélose carboxyméthylcellulose (CMC) préparée comme suit (g L<sup>-1</sup>): CMC (10), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1), MgSO<sub>4</sub> (0,4), NaCl (0,05), FeSO<sub>4</sub> (0,00125), Agar (18), avec un pH de 7, puis incubées à 30 °C pendant sept jours. Les isolats présentant un halo clair autour des colonies après l'application du Lugol ont été considérés comme cellulase positives (Khatiwada *et al.*, 2016).

### 3. 2. 5 Dégradation de la chitine

#### 3. 2. 5. 1 Préparation de la chitine colloïdale

Un protocole de Murthy et Bleakley (2012) a été employé pour la préparation de la chitine. Il consiste à dissoudre 20 g de paillettes de chitine dans 150 ml d'HCl concentré (12 M), l'addition de l'HCl s'est faite de manière progressive avec agitation continue pendant environ une heure et cela sous hotte chimique à température ambiante. Le mélange a été ensuite filtré à travers huit couches de compresse puis transféré dans un Erlenmeyer contenant 2 L d'eau distillée glacée et laissé précipiter pendant une nuit à 4 °C. Après précipitation de la chitine, l'eau a été éliminée et la chitine précipitée a été recueillie et filtrée à travers trois couches de papier filtre, de l'eau a été passée à travers les couches de papier filtre jusqu'à ce que le pH de la chitine atteigne 7. Après avoir éliminé l'excès d'eau, la chitine colloïdale obtenue a été stérilisée par autoclavage et conservée à 4 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

#### 3. 2. 5. 2 Production de la chitinase

Le milieu utilisé pour tester la production de la chitinase est constitué de (g L<sup>-1</sup>) : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,7), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,3), MgSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O (0,5), FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O (0,01), ZnSO<sub>4</sub> (0,001), MnCl<sub>2</sub> (0,001), chitine colloïdale (20) et de l'agar (20). Les bactéries ont étéensemencées sur la gélose puis

incubées à 30 °C pendant cinq jours, les isolats qui ont présentés une zone claire autour des colonies ont été marqués comme producteurs de chitinase (Murthy et Bleakley, 2012).

### 3. 2. 6 Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La production d'HCN a été évaluée en suivant la méthode de Bakker et Schippers (1987), elle consiste à tromper un papier filtre stérile dans une solution de détection d'HCN composée de 2 % de carbonate de sodium dans 0,5 % d'acide picrique, le papier est ensuite placé au fond du couvercle de la boîte de Pétri contenant de la GN supplémentée de 4,4 g L<sup>-1</sup> de glycine, la gélose a été ensuiteensemencée avec la souche bactérienne puis la boîte a été scellée et incubée à 30 °C pendant six jours. Le changement de la couleur du papier filtre du jaune vers du brun clair, brun ou brun orange a été considéré comme un signe de production d'HCN.

### 3. 2. 7 Production de l'Acide indole 3-acétique (AIA)

La production d'AIA a été évaluée par ensemencement des bactéries sur une gélose Luria-Bertani (LB) supplémentée de 5 mM de L-tryptophane, la gélose a été ensuite recouverte par du papier filtre stérile. Après incubation à 30 °C pendant trois jours, le papier a été récupéré et traité avec le réactif Salkowski (2 % de FeCl<sub>3</sub> à 0,5 M dans de l'acide perchlorique à 35 %) pendant 30 min, le changement de la couleur du papier filtre du blanc vers une couleur rougeâtre a été noté comme un signe de la production d'AIA (Bric *et al.*, 1991).

### 3. 2. 8 Solubilisation du Phosphate

Le phosphore est un élément très important pour la croissance et le développement des plantes, il entre dans la constitution de plusieurs composés de base comme les acides nucléiques (ADN et ARN), les phospholipides, les phosphoprotéines, les enzymes et l'ATP. Il existe sous formes insolubles dans le sol ce qui le rend inaccessible malgré sa disponibilité. La majorité du phosphate soluble issu de l'addition d'engrais phosphaté se lie rapidement à d'autres éléments du sol et devient inaccessible aux plantes. Plusieurs bactéries du sol sont capables de solubiliser le phosphate à travers la production d'acides organiques et de phosphatases, ce qui facilite son assimilation par les plantes et par conséquent permet d'améliorer le rendement (Ahemad *et al.*, 2009).

### 3. 2. 8. 1 Solubilisation du Phosphate sur milieu solide

La solubilisation du phosphate a été d'abord évaluée qualitativement sur la gélose NBRIP composé de (g L<sup>-1</sup>): Glucose (10), Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (5), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (5), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,25), KCl (0,2), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1), agar (15), avec un pH ajusté à 7. Les bactéries ont étéensemencées par piqure puis incubée à 30 °C pendant 14 jours. La solubilisation du phosphate est indiquée par la présence d'un halo clair entourant les colonies (Nautiyal, 1999).

### 3. 2. 8. 2 Solubilisation du Phosphate sur milieu liquide

L'estimation quantitative de la solubilisation du phosphate a été réalisée selon la méthode de Saravanakumar *et al.* (2013). 100 µl de la suspension bactérienne (1,5 x 10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>) ont été transférés dans 10 ml de bouillon NBRIP, les bactéries ont été ensuite incubées à 30 °C avec agitation à 180 rpm. Après 24h d'incubation, les bactéries ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 20 min, 750 µl du surnageant ont été mélangés avec 750 µl du réactif composé de ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 1,5 % (p/v), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,5 % (v/v) et FeSO<sub>4</sub> 2,7 % (p/v)), la densité optique du mélange a été mesurée à 700 nm. Les concentrations du phosphate soluble formé ont été extrapolées sur une courbe d'étalonnage réalisée en utilisant des concentrations connues de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

### 3. 2. 9 Production d'ammoniac

La production de l'ammoniac a été évaluée en transférant 100 µl de chaque suspension bactérienne dans des tubes contenant chacun 10 ml d'eau peptonée. Les tubes ont été ensuite incubés à 30 °C pendant quatre jours, après incubation, 500 µL du réactif de Nessler ont été ajoutés aux tubes. Le développement d'une couleur jaune à brune a été considéré comme un indice de la production d'ammoniac (Cappuccino et Sherman, 1992).

### 3. 2. 10 Production de sidérophores

Toute la verrerie utilisée dans la préparation de ce test a été nettoyée avec du HCl 6 M et lavée avec de l'eau ultra-pure, aucun métal n'a été utilisé.

La solution de colorant bleu a été préparée selon la méthode de Louden *et al.* (2011) en dissolvant 0,06 g de Chrome Azurol S (CAS) dans 50 ml d'eau ultra-pure, qui est ensuite mélangée avec 9 ml de la solution de fer (III) (0,0027 g de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O dans 10 ml d'HCl 10 mM), le mélange est rajouté lentement à une solution d'hexadécyltriméthylammonium

(HDTMA) (0,073 g de HDTMA dans 40 ml d'eau ultra-pure). La solution obtenue est stérilisée par autoclavage avant utilisation.

Un protocole modifié de Hu et Xu (2011) a été utilisé pour la préparation des boîtes. Une gélose CAS bleue a été d'abord préparée en mélangeant la solution de colorant bleu (solution CAS) avec de l'agar stérile à une concentration égale à 10 % du volume final. Les bactéries ont été ensuite ensemencées sur leurs milieux de croissance respectifs et incubées à 30 °C pendant une durée de 18 h à 24 h. Après incubation, les boîtes ont été recouvertes avec une couche de la gélose CAS bleue préalablement préparée. Après environ 30 min, les boîtes ont été examinées et le virage de la couleur du milieu du bleu vers le jaune-orange autour des colonies a été considéré comme un signe de production de sidérophores.

### 3. 3 Analyse statistique des résultats

L'analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée pour vérifier s'il existe une différence significative entre les moyennes des pourcentages d'inhibition enregistrées avec les souches bactériennes testées. L'analyse a été réalisée pour les moyennes obtenues avec les deux essais d'antagonisme (co-culture et production des CVA). L'ANOVA a été suivie par le test B de Tukey à  $p < 0,05$  comme test post-hoc afin de déterminer les souches qui présentent des moyennes différentes. Pour l'évaluation de la production des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance des plantes, les moyennes des concentrations de phosphate soluble enregistrées avec les souches sélectionnées ont également été traitées par l'ANOVA et le test B de Tukey pour déterminer les bactéries qui présentent des moyennes de concentration qui sont significativement différentes. Le test Student a été utilisé pour vérifier s'il existe une différence significative entre la moyenne des pourcentages d'inhibition enregistrée avec l'essai de co-culture et celle enregistrée avec l'essai de production des CVA. Tous les traitements statistiques ont été effectués en utilisant le logiciel SPSS 25.

## Partie 4 Effet des bactéries sur la croissance du pois chiche et le contrôle de la fusariose

En se basant sur les résultats des tests *in vitro* d'antagonisme, et de promotion de la croissance des plantes, les souches *Pseudomonas* et *Bacillus* qui se sont montrées les plus performantes ont été sélectionnées pour être évaluées *in-vivo*.

#### 4. 1 Effet des bactéries sur la croissance du pois chiche

Les grains de pois chiche de la lignée ILC 482 ont été désinfectés à l'aide d'hypochlorite de sodium 12° pendant 3 min puis lavés soigneusement avec de l'eau distillée stérile. La bactérisation des grains a été réalisée par trempage des grains de pois chiche désinfectés dans les suspensions bactériennes ( $1,5 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>) pendant une nuit. Deux types de suspension ont été utilisés, les suspensions individuelles, préparées à partir d'une seule bactérie (*Pseudomonas*, *Bacillus* ou *S. meliloti*) et les suspensions combinées, préparées en mélangeant un volume équivalent de la suspension *Pseudomonas* ou *Bacillus* avec la suspension de *S. meliloti* pour former un consortium. De la CMC a été ajoutée aux suspensions à une concentration de 1 % pour assurer l'adhérence des souches sur les grains (Kaur *et al.*, 2007).

Des pots désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium 3° ont été remplis par le même substrat de culture utilisé dans le test de pathogénicité. Les grains inoculés par les suspensions bactériennes ont été ensuite transférés dans les pots (trois grains par pot) et les grains trempés uniquement dans de l'eau distillée plus CMC ont été utilisés comme témoin. Trois répétitions ont été employées pour chaque traitement ainsi que pour le témoin. Après 30 jours, la longueur des tiges et des racines, ainsi que leurs poids sec (après séchage à 70 °C pendant une journée) ont été mesurés.

#### 4. 2 Biocontrôle de la fusariose

Une expérience en pot sous serre (cycle jour/nuit de 12/12 h, une température de  $20 \pm 2$  °C et  $60 \pm 2$  % d'humidité relative) a été réalisée pour évaluer l'effet des bactéries sur la fusariose du pois chiche. La préparation des inocula de Foc ainsi que l'infection du sol ont été réalisés de la même manière décrite pour le test de pathogénicité. L'inoculation des grains par les bactéries a été effectuée de la même manière décrite pour le test de l'évaluation de l'effet des bactéries sur la croissance du pois chiche. Les grains inoculés ont été transférés dans les pots contenant le substrat de culture infecté (trois grains par pot), trois pots ont été utilisés pour chaque traitement. Les pots semés par les grains non inoculés (trempés uniquement dans de l'eau distillée plus CMC) ont servi de témoins. Les plantes ont été examinées de façon régulière pendant une période de 45 jours et leur comportement vis-à-vis des traitements a été noté. Afin de pouvoir évaluer l'effet de chaque traitement sur la maladie, une échelle a été attribuée à chaque plante en

fonction de la gravité des symptômes observés, l'échelle comporte quatre niveaux qui sont les suivants (Zemouli-Benfrehha *et al.*, 2014):

0 : aucun symptôme,

1 : jaunissement ou flétrissement de 1/3 de la plante,

2 : jaunissement ou flétrissement des 2/3 de la plante,

3 : jaunissement ou flétrissement de la plante entière,

4 : Plante morte.

Sur la base de cette échelle, deux indices ont été calculés, le premier est le pourcentage de la gravité de la maladie (GM), il est calculé selon la formule de Townsend et Heuberger (1943) :

$$GM (\%) = [(\sum v \times n) / (N \times V)] \times 100$$

v : le niveau de l'échelle,

n : le nombre de plantes dans chaque niveau d'échelle,

N : Le nombre total de plantes observées,

V : le niveau d'échelle maximum.

Le deuxième indice est le pourcentage de la réduction de la maladie (RM), calculé selon la formule suivante (Bektas et Kusek, 2021) :

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

A : le pourcentage de maladie chez les plantes non traitées (témoin),

B : le pourcentage de maladie chez les plantes traitées.

La longueur de la tige et de la racine ainsi que leur poids sec ont été également mesurés pour chaque plante.

### 4. 3 Identification moléculaire des bactéries

Les isolats *Pseudomonas* et *Bacillus* qui ont enregistrés les meilleurs pourcentages d'inhibition ont été identifiés moléculairement au niveau du laboratoire Gene Life Sciences de Sidi Bel Abbes comme suit :

#### 4. 3. 1 Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN a été effectuée à l'aide du kit commercial NucleoMag DNA Bacteria pour la purification de l'ADN à partir des bactéries et des levures (Macherey-Nagel Allemagne) en suivant les instructions du fabricant.

#### 4. 3. 2 PCR

Le fragment de gène de l'ARNr 16S a été amplifié par PCR en utilisant les amorces 27 f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et 1492r (5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3') (Lane, 1991) dans 25 µl de mélange réactionnel (Tableau 6). Les conditions de la PCR étaient les suivantes : dénaturation initiale à 95 °C / 5 min suivie de 35 cycles de dénaturation à 95 °C / 30 s, hybridation à 53 °C / 30 s, et extension à 72 °C / 45 s, et une extension finale à 72 °C / 7 min.

**Tableau 6.** Composition du mélange réactionnel de la PCR

Réactifs	Concentrations initiales	Concentrations finales	Volume à prélever
Eau ultra pure			14,1 µl
Tampon du Taq Promega	5 X	1 X	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	1,5 µl
dNTP	25 mM	0,2 mM	0,2 µl
Amorce F	10 µM	0,5 µM	1 µl
Amorce R	10 µM	0,5 µM	1 µl
Taq polymérase Promega	5 U	1 U	0,2 µl
ADN génomique			2 µl

### 4. 3. 3 Électrophorèse

Les produits d'amplification ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % après coloration au bromure d'éthidium ( $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). L'échelle « 100 bp DNA ladder » a été utilisée comme marqueur de taille et les fragments ont été visualisés puis photographiés sous UV en utilisant le système Gel doc de Biorad (USA).

### 4. 3. 4 Séquençage

Les amplifiats de PCR ont été purifiés en utilisant le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel en suivant le protocole du fabricant. Le séquençage a été effectué selon la méthode de Sanger *et al.* (1977) en utilisant le kit BigDye v3.1 de « Applied Biosystems » avec l'amorce sens utilisée en PCR.

## 4. 4 Analyse statistique des résultats

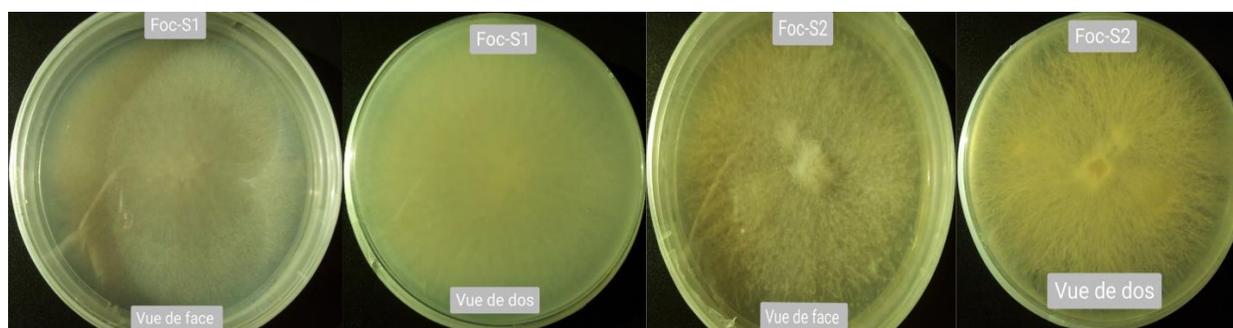
Les résultats de l'effet des traitements bactériens sur la croissance du pois chiche ont été traités par l'ANOVA et le test B de Tukey à  $p < 0,05$  afin de déterminer s'il existe une différence significative entre l'effet des traitements bactériens pour chacun des paramètres de croissance mesurés (longueur de la tige, longueur de la racine, poids sec de la tige, et poids sec des racines). L'ANOVA et le test B de Tukey à  $p < 0,05$  ont également été utilisés pour analyser les résultats du test de biocontrôle afin de vérifier s'il existe une différence significative entre les moyennes des GM ainsi que pour les moyennes des RM enregistrées avec les traitements bactériens. Tous les traitements statistiques ont été effectués en utilisant le logiciel SPSS 25.

# *Chapitre 3 : Résultats et discussion*

## Partie 1 Isolement et caractérisation de l'agent pathogène

### 1. 1 Isolement et caractérisation macroscopique

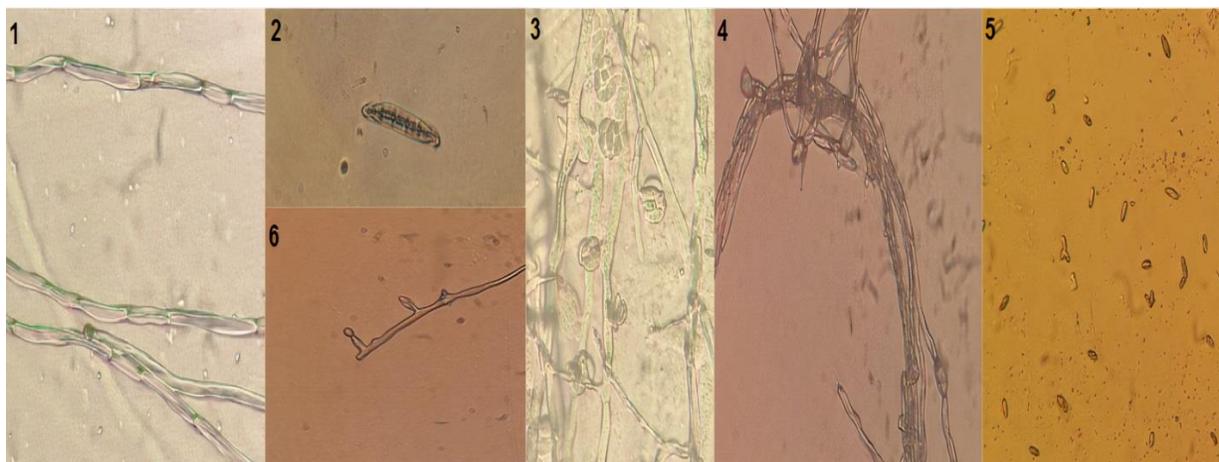
Deux champignons codés Foc-S1 et Foc-S2 ont été isolés à partir des plantes de pois chiche infectées. Les deux isolats se distinguent l'un de l'autre par leur aspect macroscopique. Foc-S1 a un morphotype ras muqueux qui se caractérise par un mycélium aérien presque inexistant alors que Foc-S2 à un morphotype duveteux qui se caractérise par mycélium aérien court mais dense (Henni *et al.*, 1994). Concernant la couleur du mycélium, Foc-S1 a une couleur crème sur les deux côtés de la boîte tandis que Foc-S2 a une couleur crème sur le devant et une couleur jaunâtre sur le dos de la boîte (Figure 5).



**Figure 5.** Observation macroscopique des isolats Foc (vue de face et de dos)

### 1. 2 Caractérisation microscopique

L'observation microscopique des deux isolats fongiques a montré la présence de mycélium septé, de microconidies ovales à réniformes accumulées en fausses têtes sur des monophialide courts, de macroconidies légèrement incurvées avec une cellule basale en forme de pied, et de Chlamydozspores. Ces caractéristiques correspondent à la description de *F. oxysporum* mentionnée par Nelson *et al.* (1983) (Figure 6).



**Figure 6.** Observation microscopique des isolats Foc : 1 (mycélium septé), 2 (macroconidies), 3 (microconidies en fausse tête), 4 (chlamydospores), 5 (microconidies), 6 (monophialide).

### 1. 3 Etude de la pathogénicité des isolats fongiques

Les résultats du test de pathogénicité ont révélé que l'isolat Foc-S1 a provoqué un jaunissement progressif des folioles du bas de la plante vers le haut, une chute des folioles et un flétrissement après quelques jours. Une nécrose du collet et des décolorations vasculaires ont également été observées. Pour l'isolat Foc-S2, les symptômes sont apparus à un stade plus précoce, commençant par le jaunissement des folioles, le flétrissement de la plante, la décoloration vasculaire, nécrose du collet, jusqu'à la dessiccation complète et finalement la mort (Figure 7). Ces symptômes correspondent à ceux observés avec les plantes de pois chiche infectées par Foc (Jimenez-Diaz *et al.*, 1993).



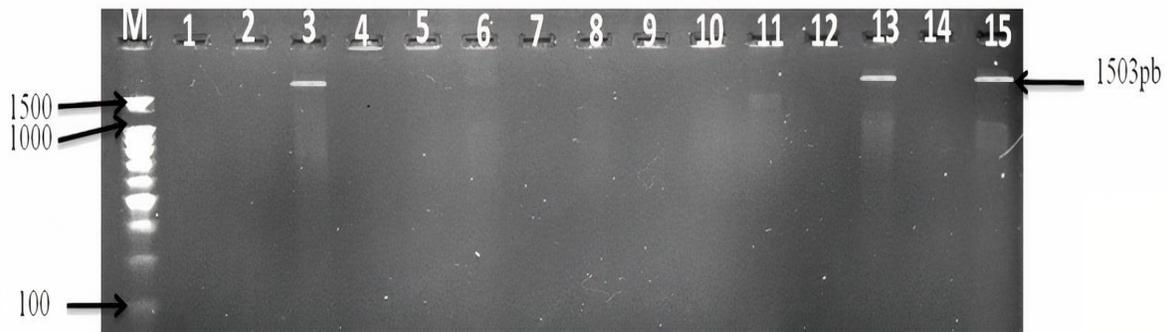
**Figure 7.** Test de pathogénicité : 1 (témoin), 2 (plant flétri), 3 (jaunissement progressive des folioles), 4 (nécrose du collet), 5 (décoloration vasculaire), 6 (plant mort)

#### 1. 4 Identification moléculaire des isolats fongiques

Les résultats de l'identification moléculaire ont révélé que les deux isolats fongiques ont montré lors de l'examen du gel sous lumière UV, la bande spécifique de FO (340 pb) et la bande spécifique de Foc (1503 pb). Ces résultats ont permis de confirmer l'identité Foc des deux agents pathogènes (Figures 8 et 9).



**Figure 8.** Examen du gel sous lumière UV de la bande spécifique FO : M (marqueur de taille), 12 ; 13 et 17 (témoins positifs), 14 (Foc-S1), 15 (Foc-S2)



**Figure 9.** Examen du gel sous lumière UV de la bande spécifique Foc : M (marqueur de taille), 3 (témoin positif), 13 (Foc-S1), 15 (Foc-S2).

## Partie 2 Isolement et caractérisation des PGPR

### 2. 1 Identification préliminaire des isolats *Pseudomonas*

Trente quatre bactéries ont été isolées à partir de la rhizosphère du pois chiche, parmi lesquelles, 17 bactéries ont été sélectionnées et conservées (dans du glycérol 25 %) en tant que *Pseudomonas* et cela en se basant sur les résultats des tests de l'identification préliminaire des *Pseudomonas*. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

**Tableau 7.** Résultats de l'identification préliminaire des *Pseudomonas*.

Isolats <i>Pseudomonas</i>	Critères d'identification						
	Gram	forme	Motilité	Catalase	Oxydase	Glu O/F	Pigmentation
E2PP3	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(-)
E1PP14	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(-)
E1FP14	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(-)
E2PP4	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(+)
E1PP15	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(-)
E2PP7	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(+)
E2PP5	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(+)
E1FP8	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(+)
E2PP8	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(+)
E1FP9	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(+)
E1PP2	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(+)
E2PP6	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(+)
E1PP7	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(-)
E1FP4	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(-)
E2PP2	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(+)
E1PP6	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(-)
E1FP13	(N)	Bacille	(+)	(+)	(+)	(O)	(-)

(N) négative, (+) présence du critère testé, (-) absence du critère testé, (Glu O/F) oxydation ou fermentation du glucose. (O) oxydation.

## 2. 2 Identification préliminaire des isolats *Bacillus*

Cinquante-trois bactéries ont été isolées à partir de la rhizosphère du pois chiche, parmi lesquelles 23 bactéries ont été sélectionnées et conservées (dans du glycérol 25 %) en tant que *Bacillus* et cela en se basant sur les résultats des tests de l'identification préliminaire des *Bacillus*. Les résultats sont présentés dans le tableau 8.

**Tableau 8.** Résultats de l'identification préliminaire des *Bacillus*.

Isolats <i>Bacillus</i>	Critères d'identification			
	Forme	Gram	spore	Catalase
E1PB4	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1PB10	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1PB15	Bacille	(P)	(+)	(+)
E2FB2	Bacille	(P)	(+)	(+)
E2FB1	Bacille	(P)	(+)	(+)
E2FB5	Bacille	(P)	(+)	(+)
E2FB10	Bacille	(P)	(+)	(+)
E2PB3	Bacille	(P)	(+)	(+)
E2PB1	Bacille	(P)	(+)	(+)
E2PB7	Bacille	(P)	(+)	(+)
E2PB10	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1FB13	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1FB15	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1PB6	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1PB9	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1FB19	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1PB1	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1PB11	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1FB17	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1FB29	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1FB8	Bacille	(P)	(+)	(+)
E1FB18	Bacille	(P)	(+)	(+)
E2FB14	Bacille	(P)	(+)	(+)

(P) positive, (+) présence du critère testé.

## Partie 3 Evaluation de l'activité promotrice de la croissance des plantes

### 3. 1 Etude de l'activité antagoniste *in vitro*

Les résultats de l'activité antifongique des *Pseudomonas* ont révélé une nette différence entre les pourcentages d'inhibition enregistrés avec chaque essai d'antagonisme. La croissance de Foc-S1 a été significativement plus réduite dans le test de production de CVA ( $p < 0,0001$ ) avec un taux d'inhibition moyen égal à 44,31 % contre 20,40 % dans le test de co-culture. En ce qui concerne Foc-S2, il n'y avait pas de différence significative entre les deux essais ( $p = 0,085$ ) avec une inhibition moyenne égale à 26,75 % dans l'essai de co-culture contre 19,91 % dans l'essai de production de CVA (Tableau 9).

Les isolats E1FP13, E1FP4 et E1PP7 ont donné les pourcentages d'inhibition les plus élevés contre Foc-S1 avec des valeurs égales à 52,77 %, 48,37 % et 47,97 % respectivement. Ces trois valeurs ont été enregistrées avec le test de production de CVA. Dans le cas de Foc-S2, les isolats E1PP6, E1FP13 et E1PP15 ont enregistré les pourcentages d'inhibition les plus élevés, soit : 52,20 %, 52,09 % et 45,38 % respectivement, et ce lors du test de co-culture (principalement par l'action des composés diffusibles) pour E1PP6 et E1FP13 et lors du test de production de CVA pour E1PP15 (Tableau 9).

**Tableau 9.** Pourcentages d'inhibition de la croissance radiale de Foc par les isolats *Pseudomonas* dans chaque essai.

Isolats	Foc-S1		Foc-S2	
	Co-culture	CVA	Co-culture	CVA
E2PP3	4,66 ± 2,48 <sup>a</sup>	44,70 ± 4,09 <sup>b</sup>	17,13 ± 4,32 <sup>abc</sup>	23,62 ± 3,25 <sup>bcd</sup>
E1PP14	11,81 ± 5,59 <sup>abc</sup>	44,51 ± 2,14 <sup>b</sup>	14,96 ± 4,38 <sup>ab</sup>	12,57 ± 7,62 <sup>ab</sup>
E1FP14	9,36 ± 3,64 <sup>ab</sup>	24,89 ± 4,09 <sup>a</sup>	22,98 ± 2,78 <sup>abcd</sup>	32,69 ± 5,85 <sup>cde</sup>
E2PP4	17,43 ± 1,06 <sup>bcd</sup>	43,95 ± 8,90 <sup>b</sup>	17,81 ± 0,24 <sup>abc</sup>	22,69 ± 5,80 <sup>abcd</sup>
<b>E1PP15</b>	21,85 ± 3,27 <sup>cdef</sup>	47,43 ± 8,58 <sup>b</sup>	14,69 ± 1,23 <sup>ab</sup>	<b>45,38 ± 4,68<sup>e</sup></b>
E2PP7	24,10 ± 3,90 <sup>def</sup>	44,22 ± 2,29 <sup>b</sup>	13,24 ± 6,67 <sup>a</sup>	19,37 ± 6,75 <sup>abc</sup>
E2PP5	20,49 ± 1,29 <sup>bcde</sup>	44,61 ± 0,09 <sup>b</sup>	17,18 ± 8,82 <sup>abc</sup>	19,17 ± 7,68 <sup>abc</sup>
E1FP8	22,16 ± 2,02 <sup>cdef</sup>	45,01 ± 0,41 <sup>b</sup>	22,75 ± 5,54 <sup>abcd</sup>	14,25 ± 4,86 <sup>ab</sup>
E2PP8	17,08 ± 3,38 <sup>bcd</sup>	43,51 ± 0,37 <sup>b</sup>	28,72 ± 5,28 <sup>cdef</sup>	18,56 ± 8,86 <sup>abc</sup>
E1FP9	24,59 ± 2,97 <sup>def</sup>	44,89 ± 0,51 <sup>b</sup>	23,97 ± 1,99 <sup>abcde</sup>	13,09 ± 2,64 <sup>ab</sup>
E1PP2	22,95 ± 3,31 <sup>cdef</sup>	43,77 ± 2,47 <sup>b</sup>	27,36 ± 0,19 <sup>bcde</sup>	20,49 ± 6,92 <sup>abc</sup>
E2PP6	30,10 ± 8,48 <sup>ef</sup>	45,00 ± 1,34 <sup>b</sup>	21,12 ± 5,74 <sup>abcd</sup>	12,26 ± 4,34 <sup>ab</sup>
<b>E1PP7</b>	25,61 ± 2,81 <sup>def</sup>	<b>47,97 ± 5,04<sup>b</sup></b>	32,33 ± 4,67 <sup>def</sup>	35,55 ± 3,37 <sup>de</sup>
<b>E1FP4</b>	23,24 ± 1,41 <sup>cdef</sup>	<b>48,37 ± 6,31<sup>b</sup></b>	40,52 ± 4,43 <sup>f</sup>	6,88 ± 0,24 <sup>a</sup>
E2PP2	33,03 ± 8,54 <sup>f</sup>	44,19 ± 2,26 <sup>b</sup>	35,70 ± 3,68 <sup>ef</sup>	19,88 ± 4,57 <sup>abc</sup>
<b>E1PP6</b>	19,06 ± 0,73 <sup>bcde</sup>	43,44 ± 6,67 <sup>b</sup>	<b>52,20 ± 4,51<sup>g</sup></b>	7,02 ± 2,18 <sup>a</sup>
<b>E1FP13</b>	19,24 ± 1,00 <sup>bcde</sup>	<b>52,77 ± 2,32<sup>b</sup></b>	<b>52,09 ± 2,65<sup>g</sup></b>	15,06 ± 6,13 <sup>ab</sup>
Moyennes	20,40 ± 7,66	44,31 ± 6,52	26,75 ± 12,56	19,91 ± 10,88

Les valeurs indiquées sont des moyennes de trois répétitions ± écart type, Les moyennes d'une même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

Comme pour les *Pseudomonas*, les résultats de l'activité antifongique des *Bacillus* ont également révélé une claire différence entre les pourcentages d'inhibition enregistrés avec chaque essai d'antagonisme. La croissance de Foc-S1 a été significativement plus réduite dans le test de la production de CVA ( $p < 0,003$ ) avec un taux d'inhibition moyen égal à 41,01 % contre 22,95 % pour le test de co-culture. En ce qui concerne Foc-S2, il n'y avait pas de différence significative entre les deux essais ( $p = 0,104$ ) avec une inhibition moyenne égale à 37,22 % quant à l'essai de co-culture contre 45,92 % en ce qui concerne l'essai de la production de CVA. Les

isolats E1PB6, E1PB10 et E2PB1 ont donné les pourcentages d'inhibition les plus élevés contre les deux Foc. Concernant Foc-S1, E1PB6 a enregistré le pourcentage d'inhibition le plus élevé égal à 78,39 % suivi par E1PB10 (69,17 %) et E2PB1 (67,43 %), ces valeurs ont été enregistrées avec l'essai de co-culture. Dans le cas de Foc-S2, il n'y avait pas une différence significative entre les pourcentages d'inhibition enregistrés avec les trois isolats avec des valeurs égales à 72,39 %, 67,90 % et 71,81 % pour E1PB6, E1PB10 et E2PB1 respectivement. Ces valeurs ont été enregistrées avec le test de co-culture (Tableau 10).

**Tableau 10.** Pourcentages d'inhibition de la croissance radiale de Foc par les isolats *Bacillus* dans chaque essai.

Isolats	Foc-S1		Foc-S2	
	Co-culture	CVA	Co-culture	CVA
E1FB13	9,84 ± 1,55 <sup>abc</sup>	39,21 ± 1,98 <sup>cdefgh</sup>	56,44 ± 2,31 <sup>jk</sup>	23,72 ± 3,67 <sup>ab</sup>
E1FB15	64,42 ± 3,41 <sup>f</sup>	47,39 ± 1,86 <sup>fghi</sup>	64,40 ± 2,17 <sup>kl</sup>	45,95 ± 3,24 <sup>def</sup>
E1FB17	5,98 ± 4,44 <sup>abc</sup>	44,00 ± 7,20 <sup>defghi</sup>	52,55 ± 3,06 <sup>ij</sup>	42,16 ± 3,34 <sup>cde</sup>
E1FB18	7,43 ± 5,88 <sup>abc</sup>	28,16 ± 7,84 <sup>abc</sup>	45,72 ± 6,38 <sup>hi</sup>	51,82 ± 0,42 <sup>efgh</sup>
E1FB19	6,84 ± 7,51 <sup>abc</sup>	43,25 ± 7,20 <sup>defghi</sup>	56,44 ± 2,54 <sup>jk</sup>	56,87 ± 2,71 <sup>fgh</sup>
E1FB29	5,26 ± 3,08 <sup>abc</sup>	33,39 ± 1,30 <sup>bcd</sup>	25,29 ± 3,25 <sup>de</sup>	46,12 ± 3,17 <sup>def</sup>
E1FB8	9,49 ± 0,02 <sup>abc</sup>	42,37 ± 3,48 <sup>defghi</sup>	21,02 ± 1,46 <sup>cd</sup>	56,94 ± 5,13 <sup>fgh</sup>
E1PB1	21,11 ± 1,74 <sup>d</sup>	44,22 ± 0,17 <sup>defghi</sup>	7,86 ± 3,87 <sup>ab</sup>	33,64 ± 8,36 <sup>bc</sup>
<b>E1PB10</b>	<b>69,17 ± 2,94<sup>f</sup></b>	46,30 ± 2,91 <sup>fghi</sup>	<b>67,90 ± 2,19<sup>l</sup></b>	46,33 ± 8,17 <sup>def</sup>
E1PB11	13,62 ± 1,84 <sup>bcd</sup>	33,95 ± 4,36 <sup>bcde</sup>	3,83 ± 2,66 <sup>a</sup>	43,47 ± 6,66 <sup>cde</sup>
E1PB15	31,88 ± 0,34 <sup>e</sup>	25,22 ± 1,88 <sup>ab</sup>	17,66 ± 2,71 <sup>bcd</sup>	35,37 ± 4,28 <sup>cd</sup>
E1PB4	3,32 ± 4,12 <sup>ab</sup>	21,90 ± 6,28 <sup>a</sup>	44,03 ± 8,48 <sup>ghi</sup>	16,27 ± 4,33 <sup>a</sup>
<b>E1PB6</b>	<b>78,39 ± 1,95<sup>g</sup></b>	53,95 ± 0,73 <sup>i</sup>	<b>72,39 ± 4,11<sup>l</sup></b>	53,41 ± 3,69 <sup>efgh</sup>
E1PB9	1,06 ± 5,21 <sup>a</sup>	36,60 ± 2,84 <sup>bcdefg</sup>	40,52 ± 7,74 <sup>fgh</sup>	51,00 ± 1,54 <sup>efgh</sup>
E2FB1	13,82 ± 0,21 <sup>cd</sup>	40,66 ± 4,23 <sup>defgh</sup>	13,21 ± 1,56 <sup>abc</sup>	57,61 ± 2,75 <sup>fgh</sup>
E2FB10	2,92 ± 0,83 <sup>a</sup>	41,15 ± 2,49 <sup>defgh</sup>	5,99 ± 0,74 <sup>a</sup>	49,80 ± 1,42 <sup>efgh</sup>
E2FB14	10,30 ± 1,40 <sup>abc</sup>	45,94 ± 4,13 <sup>efghi</sup>	43,92 ± 4,22 <sup>ghi</sup>	46,42 ± 2,21 <sup>def</sup>
E2FB2	39,21 ± 2,77 <sup>e</sup>	48,74 ± 0,58 <sup>ghi</sup>	35,06 ± 3,83 <sup>efg</sup>	54,11 ± 0,94 <sup>efgh</sup>
E2FB5	0,01 ± 0,39 <sup>a</sup>	35,09 ± 3,19 <sup>bcdef</sup>	8,73 ± 0,78 <sup>ab</sup>	53,41 ± 1,16 <sup>efgh</sup>
<b>E2PB1</b>	<b>67,43 ± 5,82<sup>f</sup></b>	49,93 ± 0,43 <sup>hi</sup>	<b>71,81 ± 4,08<sup>l</sup></b>	23,58 ± 0,96 <sup>ab</sup>
E2PB10	3,62 ± 4,82 <sup>abc</sup>	48,19 ± 0,65 <sup>ghi</sup>	26,82 ± 2,96 <sup>de</sup>	61,14 ± 5,54 <sup>h</sup>
E2PB3	40,82 ± 0,62 <sup>e</sup>	49,84 ± 0,77 <sup>hi</sup>	33,24 ± 1,53 <sup>ef</sup>	47,45 ± 3,57 <sup>efg</sup>
E2PB7	22,01 ± 5,11 <sup>d</sup>	43,90 ± 8,50 <sup>defghi</sup>	41,28 ± 2,12 <sup>fgh</sup>	59,48 ± 4,11 <sup>gh</sup>
Moyennes	22,95 ± 24,60	41,01 ± 8,84	37,22 ± 21,78	45,92 ± 12,36

Les valeurs indiquées sont des moyennes de trois répétitions ± écart type. Les moyennes d'une même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p < 0.05$ .

*S. meliloti* a réduit la croissance de Foc-S1 avec un pourcentage d'inhibition égale à  $46,46 \pm 1,89$ , et de Foc-S2 avec un pourcentage d'inhibition égale à  $44,58 \pm 1,6$ . Ces valeurs ont été enregistrées avec le test de co-culture. En ce qui concerne le test de la production de CVA, les taux d'inhibition étaient très faibles avec des valeurs égales à  $3,21 \pm 1,39$  et  $4,11 \pm 1,31$  contre Foc-S1 et Foc-S2 respectivement.

Dans ce test, les souches *Pseudomonas* et *Bacillus* ont réduit la croissance mycélienne des isolats Foc avec des pourcentages d'inhibition variables. Les résultats de leur effet antagoniste ont révélé que pour l'ensemble des souches testées, la croissance de Foc-S1 était significativement plus réduite dans l'essai de production de CVA que dans l'essai de co-culture, alors que pour Foc-S2, il n'y avait pas de différence significative entre les deux essais. Typiquement, on s'attendrait à un pourcentage d'inhibition plus élevé avec l'essai de co-culture plutôt qu'avec l'essai de la production de CVA, étant donné que dans l'essai de co-culture, Foc est exposé à la fois aux composés diffusibles antifongiques (CDA) et CVA, alors que dans l'essai de production de CVA, Foc n'est exposé qu'aux métabolites antifongiques volatils. Cependant, nos résultats mentionnés ci-dessus ont révélé le contraire. Cela peut être expliqué par la diffusion de métabolites antibactériens par Foc dans le milieu durant l'essai de co-culture, ce qui a affecté négativement la capacité des souches *Pseudomonas* et *Bacillus* à inhiber la croissance fongique, entraînant ainsi un pourcentage d'inhibition plus faible. Par ailleurs, dans l'essai de production de CVA, la cloison dans la boîte de Pétri protège les souches des composés antibactériens potentiels diffusés par Foc. Le métabolite le plus connu est l'acide fusarique, c'est une mycotoxine produite par plusieurs espèces du genre *Fusarium* (Bacon *et al.*, 1996). La production d'acide fusarique par Foc a été rapportée par Türkkan et Dolar (2010). Cette mycotoxine est capable de diminuer la production de 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG), un métabolite antifongique synthétisé par la souche antagoniste *P. protegens* Pf-5 (Quecine *et al.*, 2016). Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par Kumari et Khanna (2018).

L'évaluation *in vitro* de l'activité antagoniste des *Pseudomonas* a révélé que plusieurs souches ont inhibé la croissance fongique des isolats Foc. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études qui ont montré l'efficacité des *Pseudomonas* à contrôler une large gamme de phytopathogènes. Dans une étude menée par Al-Ghafri *et al.* (2020), deux souches de *P. aeruginosa*, codées ISO1 et ISO2, ont enregistré des taux significatifs d'antagonisme envers

*Pythium aphanidermatum* et *F. solani*. Dans une autre étude, la croissance de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* (l'agent pathogène responsable du flétrissement du cumin) a été hautement inhibée par *P. fluorescens*-5 (Rathore *et al.*, 2020). La souche *P. stutzeri* PSIISS-1 a considérablement supprimé la prolifération de Foc et *Rhizoctonia solani* sur PDA (Kumar *et al.*, 2022).

Les résultats de l'antagonisme *in vitro* ont montré que plusieurs souches *Bacillus* ont également inhibé la croissance des isolats Foc. La capacité des *Bacillus* à contrôler les phytopathogènes est déjà largement documentée par plusieurs auteurs ; dans une étude réalisée par Ben Khedher *et al.* (2021), la souche *B. subtilis* V26 a efficacement inhibé la croissance de *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. graminearum* et *F. sambucinum*. Haddoudi *et al.* (2021) ont également rapporté, dans une autre étude, que *B. cereus*, *B. mojavensis*, *B. velezensis*, *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* possèdent une activité antifongique considérable contre *F. equiseti*. De même Medeiros et Bettiol. (2021) ont montré que plusieurs souches *Bacillus* ont été capables de contrôler la croissance de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (l'agent pathogène responsable du flétrissement de la tomate).

L'évaluation de l'activité antagoniste de la bactérie *S. meliloti* a donné des résultats très faibles (inférieures à 5 %) durant le test de production de CVA, ce qui indique qu'elle est capable de produire des CVA mais avec des taux négligeables. Concernant le test de co-culture les taux d'inhibition enregistré avec les deux Foc étaient supérieurs à 40 %, ce qui montre que l'activité antifongique de *S. meliloti* est due principalement à la production des CDA. Généralement les bactéries symbiotiques telles que *S. meliloti* sont connues en tant que biofertilisateurs (Menbari *et al.*, 2017 ; Bolandnazar *et al.*, 2018 et Gou *et al.*, 2020), peu d'études ont rapporté leur activité antagoniste ; Hernandez *et al.* (2018) ont montré que la souche *Sinorhizobium* sp. CA-14 était capable d'inhiber la croissance de *F. solani*, par ailleurs, l'étude de Yang (2019) a révélé que la souche *S. adhaerens* DMK-17 a contrôlé la prolifération de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum* (agent causale du flétrissement de la pastèque), la souche *S. meliloti* TR1 a également été rapportée dans le travail de Kumar *et al.* (2011) pour avoir inhibé la croissance de *F. oxysporum*.

### 3. 2 Consortiums rhizobactéries-*Sinorhizobium*

Les tests de compatibilité entre *Pseudomonas* et *S. meliloti* ainsi que ceux entre *Bacillus* et *S. meliloti* n'ont pas donné lieu à des zones d'inhibition, ce qui indique que ces rhizobactéries peuvent être utilisées en consortium avec *S. meliloti* contre Foc.

Dans le cas des souches *Pseudomonas*, le pourcentage d'inhibition de Foc-S1 le plus élevé a été enregistré avec le consortium Sino-E1PP7 (65,91 %), suivi par Sino-E1FP13 (62,09 %) et Sino-E1FP4 (61,12 %) (Tableau 11). Ces valeurs sont significativement ( $p < 0,03$ ) plus élevées que celles obtenues avec l'application individuelle de ces mêmes souches. Concernant Foc-S2, Le pourcentage d'inhibition le plus élevé a été enregistré avec le consortium Sino-E1FP13 (67,17 %), suivi par Sino-E1PP6 (61,39 %) et Sino-E1PP15 (56,29 %) (Tableau 11). Ces valeurs sont également significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevées que celles obtenues avec l'application individuelle de ces mêmes souches. Les résultats de ce test indiquent que l'usage des *Pseudomonas* en consortium avec *S. meliloti* a un effet antagoniste plus élevé que leur usage individuel contre Foc-S1 et Foc-S2.

**Tableau 11.** Pourcentages d'inhibition de la croissance radiale de Foc par le consortium *Pseudomonas-Sinorhizobium*

Consortiums	Isolats Foc	
	Foc-S1	Foc-S2
<b>Sino-E1FP13</b>	<b>62,09 ± 2,8<sup>fg</sup></b>	<b>67,17 ± 2,50<sup>i</sup></b>
Sino-E1FP14	17,12 ± 0,8 <sup>a</sup>	11,73 ± 0,22 <sup>a</sup>
<b>Sino-E1FP4</b>	<b>61,12 ± 1,9<sup>fg</sup></b>	37,86 ± 2,91 <sup>d</sup>
Sino-E1FP8	58,29 ± 1,01 <sup>ef</sup>	47,26 ± 2,59 <sup>f</sup>
Sino-E1FP9	60,34 ± 0,72 <sup>ef</sup>	15,23 ± 0,61 <sup>a</sup>
Sino-E1PP14	46,90 ± 0,22 <sup>c</sup>	23,34 ± 2,70 <sup>b</sup>
<b>Sino-E1PP15</b>	55,26 ± 0,22 <sup>de</sup>	<b>56,29 ± 1,27<sup>g</sup></b>
Sino-E1PP2	58,16 ± 0,07 <sup>ef</sup>	44,41 ± 4,10 <sup>ef</sup>
<b>Sino-E1PP6</b>	49,69 ± 3,07 <sup>c</sup>	<b>61,39 ± 1,23<sup>h</sup></b>
<b>Sino-E1PP7</b>	<b>65,91 ± 3,43<sup>g</sup></b>	16,54 ± 0,72 <sup>a</sup>
Sino-E2PP2	55,66 ± 2,24 <sup>de</sup>	40,78 ± 1,44 <sup>de</sup>
Sino-E2PP3	47,61 ± 0,74 <sup>c</sup>	22,27 ± 0,48 <sup>b</sup>
Sino-E2PP4	51,38 ± 1,78 <sup>cd</sup>	37,78 ± 1,33 <sup>d</sup>
Sino-E2PP5	47,59 ± 2,03 <sup>c</sup>	31,25 ± 1,40 <sup>c</sup>
Sino-E2PP6	55,40 ± 3,77 <sup>de</sup>	49,39 ± 0,23 <sup>f</sup>
Sino-E2PP7	39,36 ± 0,88 <sup>b</sup>	32,02 ± 1,66 <sup>c</sup>
Sino-E2PP8	57,60 ± 0,44 <sup>ef</sup>	49,09 ± 2,78 <sup>f</sup>
Moyennes	52,32 ± 11,17	37,78 ± 16,10

Les valeurs indiquées sont des moyennes de trois répétitions ± écart type. Les moyennes d'une même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

Dans le cas des souches *Bacillus*. Les consortiums Sino-E1PB6, Sino-E1PB10 et Sino-E2PB1 ont donné les meilleurs taux d'inhibition contre les deux Foc. En ce qui concerne Foc-S1, il n'y avait pas une différence significative entre les pourcentages d'inhibition enregistrés avec ces trois traitements, avec des valeurs égales à 76,72 %, 78,62 % et 77,01 % respectivement (Tableau 12). La comparaison entre les pourcentages d'inhibition issus de l'application individuelle des *Bacillus* avec ceux issus de leur application en consortium avec *S. meliloti* a révélé que Foc-S1 est significativement ( $p < 0,05$ ) plus inhibé par les traitements Sino-E1PB10

et Sino-E2PB1 que par les traitements E1PB10 et E2PB1, cependant, il n'y avait pas une différence significative ( $p = 0,299$ ) entre l'effet antagoniste du traitement Sino-E1PB6 et E1PB6. En ce qui concerne Foc-S2, les consortiums Sino-E2PB1 (81,95 %) et Sino-E1PB10 (80,10 %) ont donné les meilleurs taux d'inhibition suivi par Sino-E1PB6 (73,44 %) (Tableau 12). La comparaison entre l'effet antagoniste individuel des *Bacillus* avec leur effet en combinaison avec *S. meliloti* a révélé que les traitements Sino-E1PB10 et Sino-E2PB1 étaient significativement ( $p < 0,05$ ) plus efficaces que les traitements E1PB10 et E2PB1, cependant, comme pour le Foc-S1, le traitement Sino-E1PB6 n'était pas significativement ( $p = 0,684$ ) différent du traitement E1PB6.

**Tableau 12.** Pourcentages d'inhibition de la croissance radiale de Foc par le consortium *Bacillus-Sinorhizobium*

Consortiums	Isolats Foc	
	Foc-S1	Foc-S2
Sino-E1FB13	40,45 ± 0,20 <sup>c</sup>	4,96 ± 1,70 <sup>a</sup>
Sino-E1FB15	68,33 ± 1,85 <sup>e</sup>	69,88 ± 2,87 <sup>h</sup>
Sino-E1FB17	17,38 ± 0,59 <sup>a</sup>	6,98 ± 1,34 <sup>ab</sup>
Sino-E1FB18	22,28 ± 0,69 <sup>a</sup>	8,14 ± 0,42 <sup>abc</sup>
Sino-E1FB19	54,29 ± 3,34 <sup>d</sup>	44,45 ± 0,05 <sup>f</sup>
Sino-E1FB29	44,55 ± 1,78 <sup>c</sup>	9,99 ± 0,69 <sup>bcd</sup>
Sino-E1FB8	19,93 ± 0,67 <sup>a</sup>	9,76 ± 1,41 <sup>abcd</sup>
Sino-E1PB1	54,93 ± 2,50 <sup>d</sup>	31,90 ± 1,15 <sup>e</sup>
<b>Sino-E1PB10</b>	<b>78,62 ± 1,47<sup>f</sup></b>	<b>80,10 ± 0,13<sup>i</sup></b>
Sino-E1PB11	21,53 ± 0,81 <sup>a</sup>	6,50 ± 0,26 <sup>ab</sup>
Sino-E1PB15	19,22 ± 1,98 <sup>a</sup>	10,44 ± 1,16 <sup>bcd</sup>
Sino-E1PB4	51,33 ± 6,56 <sup>d</sup>	10,16 ± 0,10 <sup>bcd</sup>
<b>Sino-E1PB6</b>	<b>76,72 ± 1,45<sup>f</sup></b>	<b>73,44 ± 0,57<sup>h</sup></b>
Sino-E1PB9	18,81 ± 1,52 <sup>a</sup>	9,70 ± 0,60 <sup>abcd</sup>
Sino-E2FB1	29,13 ± 1,60 <sup>b</sup>	9,18 ± 1,34 <sup>abcd</sup>
Sino-E2FB10	18,27 ± 2,02 <sup>a</sup>	7,46 ± 0,32 <sup>ab</sup>
Sino-E2FB14	19,37 ± 0,51 <sup>a</sup>	12,58 ± 0,66 <sup>cd</sup>
Sino-E2FB2	63,09 ± 0,98 <sup>e</sup>	64,04 ± 3,30 <sup>g</sup>
Sino-E2FB5	21,49 ± 3,17 <sup>a</sup>	9,08 ± 0,44 <sup>abcd</sup>
<b>Sino-E2PB1</b>	<b>77,01 ± 1,13<sup>f</sup></b>	<b>81,95 ± 0,87<sup>i</sup></b>
Sino-E2PB10	18,43 ± 3,37 <sup>a</sup>	7,61 ± 3,94 <sup>ab</sup>
Sino-E2PB3	17,61 ± 1,39 <sup>a</sup>	13,09 ± 4,11 <sup>d</sup>
Sino-E2PB7	53,57 ± 1,60 <sup>d</sup>	44,38 ± 0,15 <sup>f</sup>
Moyennes	39,38 ± 22,14	27,21 ± 27,21

Les valeurs indiquées sont des moyennes de trois répétitions ± écart type. Les moyennes d'une même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .



**Figure 10.** Activité antagoniste *in vitro* : 1 (test de co-culture), 2 (test par consortium), 3 (test de production des CVA).

Les souches utilisées dans la formulation des consortiums ont déjà montré leur capacité à inhiber la croissance fongique avec des taux supérieurs à 40 %, leur usage combiné devrait permettre d'obtenir des taux d'inhibition plus élevés que ceux observés avec leur usage individuel, c'est ce que la présente étude a confirmé ; l'évaluation de l'effet antagoniste des *Pseudomonas* et *Bacillus* en consortium avec *S. meliloti* a donné des pourcentages d'inhibition plus élevés que ceux observés avec leur usage individuel (sauf pour E1PB6). L'union de deux bactéries signifie l'union de deux mécanismes de contrôle, chaque bactérie produit des composés antifongiques qui agissent contre le Foc aboutissant ainsi à des niveaux d'antagonisme plus élevés. Récemment, plusieurs chercheurs se sont focalisés sur l'étude du potentiel antagoniste des différents consortiums bactériens ; dans le travail de Kuswinanti *et al.* (2019), une préparation formée par *P. fluorescens*, *Actinomycetes* sp. et *Streptomyces* sp a inhibé la croissance de *F. oxysporum* avec un taux égale à 60 %, tandis que l'étude de Nguyen *et al.* (2019) a rapporté que la formulation MICROTECH-1(NL), composée par *P. fluorescens*, *B. subtilis*, *Streptomyces* spp., *lacticaseibacillus casei*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Saccharomyces cerevisiae*, et *Azotobacter* sp. a inhibé la croissance de plusieurs souches de *F. proliferatum* avec des valeurs supérieures à 70 %, de même, Yang *et al.* (2014) ont montré que l'usage du consortium BBS (*B. cereus* AR156, *B. subtilis* SM21 et *Serratia* sp. XY21) était plus efficace contre *Verticillium dahliae* (agent du flétrissement verticillien) avec un taux d'inhibition égale à 88,40 % en comparaison avec l'usage individuel des bactéries.

Parmi toutes les souches testées, E1PB6 est la seule à donner les mêmes pourcentages d'inhibition durant l'évaluation individuelle et celle en consortium avec *S. meliloti*, ce résultat peut être expliqué par la diminution de l'activité antagoniste d'au moins une des deux bactéries,

c'est-à-dire, qu'au moins une des deux bactéries a un effet négatif sur la capacité de l'autre à inhiber la croissance fongique. Des résultats similaires aux notre ont été observé par Pellegrini *et al.* (2020) où le PGPR *Herbaspirillum seropedicae* a inhibé la croissance de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* et *Rhizoctonia solani* avec les même pourcentages durant l'évaluation individuelle et celle en consortium avec *Gluconacetobacter diazotrophicus* et *Burkholderia ambifaria*.

### 3. 3 Effet des bactéries sur la morphologie des Foc

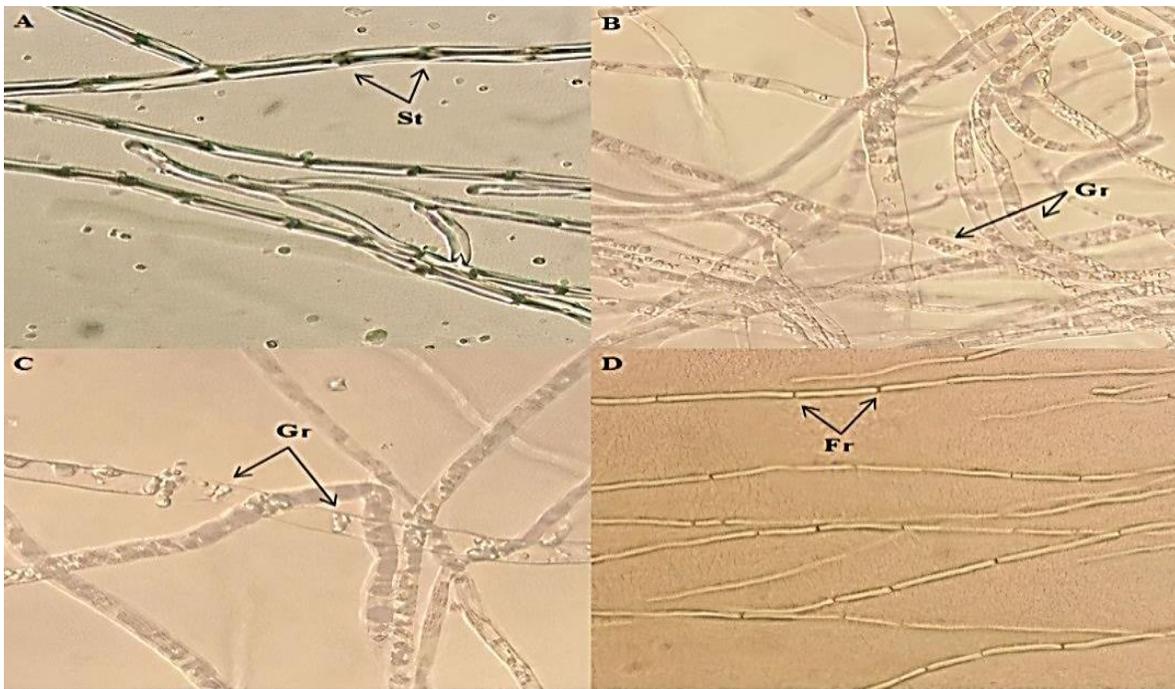
En se basant sur les résultats des tests de l'évaluation de l'activité antifongique contre chaque Foc, cinq *Pseudomonas* (E1FP13, E1FP4, E1PP7, E1PP6, et E1PP15) et trois *Bacillus* (E1PB10, E2PB1, et E1PB6) ont été sélectionnés pour avoir enregistré les meilleurs pourcentages d'inhibition. Ces rhizobactéries ont été examinées sous microscope pour observer l'impact de leur effet antagoniste sur Foc.

La comparaison entre la morphologie des isolats Foc traités avec les souches *Pseudomonas* et celle des isolats Foc non traités (témoins) a révélé une nette différence entre les deux. Dans le cas de Foc-S1, les hyphes issues des boites traitées avec E1FP13 sont apparues discontinues (fragmentées), vides et sans septa (Figure 11D), alors que pour les traitements E1PP7 et E1FP4, les hyphes sont apparues vides de leur contenu avec la présence de granulations (vésicules) ; les septa étaient aussi absents (Figures 11B, 11C). Dans le cas de Foc-S2, les hyphes issus des boites traités avec E1PP15 étaient dépourvus de septa avec un cytoplasme condensé (Figure 12D). En ce qui concerne les traitements E1FP13 et E1PP6, les hyphes sont apparus vides, dépourvus de septa pour la plupart, avec la présence de granulations ; certaines zones étaient également déformées (gonflées) (Figures 12B, 12C). Les deux témoins ont présenté l'aspect caractéristique du Foc sans aucun changement dans la morphologie des hyphes (figures 11A et 12A).

Le traitement par les souches *Bacillus* a également provoqué des altérations dans la morphologie des isolats Foc en comparaison avec les témoins. Le traitement E2PB1 a affecté les deux Foc de la même manière, les hyphes sont apparus discontinues (fragmentées), vides et sans septa (Figure 13B). Concernant les boites traitées par E1PB10, les hyphes sont apparus vides de leur contenu avec la présence de granulations (vésicules) ; les septa étaient aussi absents (Figure 13C), les même altérations ont été observées avec les deux Foc. Dans le cas des boites traitées

par E1PB6, les mêmes observations ont également été enregistrées avec les deux Foc où les hyphes sont apparus vides, dépourvus de septa avec la présence de granulations ; certaines régions ont également présentées des déformations (gonflement) (Figure 13D). Les deux témoins ont présenté l'aspect caractéristique du Foc sans aucun changement dans la morphologie des hyphes (figures 13A et 13F).

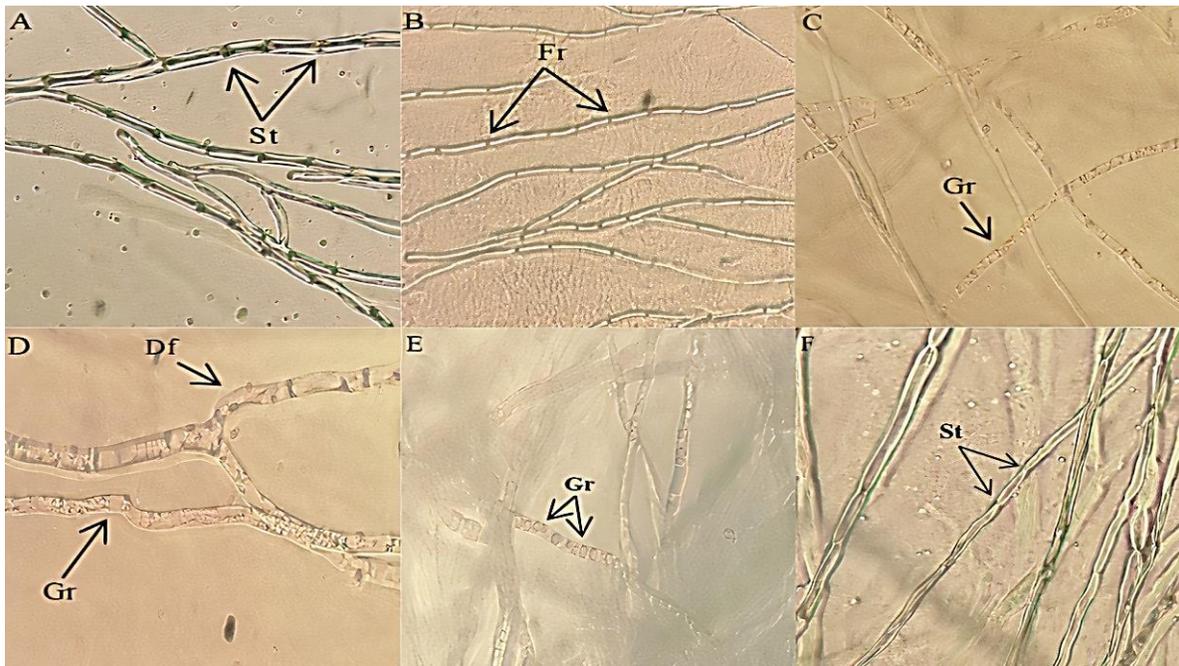
Dans le cas des boîtes traitées par *S. meliloti*, les hyphes sont apparus vides de leur contenu avec la présence de granulations (vésicules) ; les septa étaient aussi absents. Ces altérations ont été observées avec les deux Foc (Figure 13E)



**Figure 11.** Observations en microscope optique de l'impact des souches *Pseudomonas* sur la morphologie des hyphes de Foc-S1 (40×) : A (témoin), B (effet de E1PP7), C (effet de E1FP4), D (effet de E1FP13). St (septa), Gr (granulations), Fr (fragmentations).



**Figure 12.** Observations en microscope optique de l'impact des souches *Pseudomonas* sur la morphologie des hyphes de Foc-S2 (40×) : A (témoin), B (effet de E1FP13), C (effet de E1PP6), D (effet de E1PP15). St (septa), Gr (granulations), Df (déformations), (Cd) (condensations).



**Figure 13.** Observations en microscope optique de l'impact des *Bacillus* et *S. meliloti* sur la morphologie des Foc (40×) : A (témoin Foc-S1), B (effet de E2PB1), C (effet de E1PB10), D (effet de E1PB6), E (effet de *S. meliloti*), F (témoin Foc-S2). St (septa), Fr (fragmentations), Gr (granulations), Df (déformations).

Les résultats de l'examen microscopique ont permis de confirmer la production de composés antifongiques par les isolats bactériens. Une série d'altérations morphologiques commune a été observée chez les trois genres. Des hyphes fragmentés, vides et sans septa ont caractérisé les Foc traités par E1FP13 (*Pseudomonas*, contre Foc-S1) et E2PB1 (*Bacillus*, contre Foc-S1 et Foc-S2). Attia *et al.* (2020) ont également rapporté une fragmentation des hyphes d'*Alternaria solani* suite à un traitement avec des PGPR. Ces résultats peuvent être interprétés par la lyse des hyphes qui a conduit à la perte de leur contenu, ce qui explique l'apparence vide. Cette action lytique est due aux métabolites antifongiques libérés par ces bactéries. Il a été démontré que *P. monteilii* PsF84 a provoqué la lyse des hyphes de Fo à travers l'action d'un composé antifongique volatil identifié en tant que 2, 4-Di-tert-butylphénol (Dharni *et al.*, 2014). Par ailleurs Gu *et al.* (2017) ont montré que le traitement de *F. graminearum* par la lipoprotéine bacillomycine D produite par *B. amyloliquefaciens* FZB42 a causé une destruction de la paroi cellulaire des hyphes. De même une étude menée par Gong *et al.* (2015) a révélé que deux composés (iturin A et plipastatin A) produits par *B. amyloliquefaciens* étaient responsables des altérations morphologiques observées chez *F. graminearum*, le traitement par ces composés a provoqué une fragmentation des membranes des hyphes et de graves endommagements des septa (perte de structure), ce qui a conduit à un échappement du contenu cellulaire.

Des hyphes vides, sans septa avec un cytoplasme granulé ont été observés chez les Foc traités par les souches E1FP4, E1PP7 (*Pseudomonas*, contre Foc-S1), E1PB10 (*Bacillus*, contre Foc-S1 et Foc-S2) et *S. meliloti* (contre Foc-S1 et Foc-S2). Des résultats similaires aux nôtres ont été observés chez *Botrytis cinerea* après un traitement avec *Pseudomonas* sp. PsJN (Barka *et al.*, 2002). Dans une autre étude, un composé antifongique volatil libéré par *P. brassicacearum* et identifié comme étant le dl-Limonène a également causé la formation de granulations à l'intérieur des hyphes de *Sclerotinia sclerotiorum* (Giorgio *et al.*, 2015). Les granulations observées chez Foc pourraient être des restes de cytoplasme formés suite à une fuite de cytoplasme provoquée par la lyse des hyphes. L'étude de Kumar *et al.* (2011) a révélé que *S. meliloti* TR1 a causé une lyse des hyphes et une fuite du cytoplasme chez Fo. Les mêmes altérations ont été également observées avec E1FP13, E1PP6 (*Pseudomonas*, contre Foc-S2) et E1PB6 (*Bacillus*, contre Foc-S1 et Foc-S2), cependant les hyphes traités par ces souches se sont distingués par des régions déformées (gonflées). Des résultats similaires aux nôtres ont été observés avec *Rhizoctonia solani* suite à un traitement par *Pseudomonas* PGC2 (Arora *et al.*, 2008). De même, des hyphes gonflés

et vides ont été notés chez *Rhizoctonia bataticola* après un traitement avec l'extrait métabolique brut de *B. subtilis* (Chiranjeevi *et al.*, 2021). Win *et al.* (2021) ont également montré que *B. subtilis* et *B. velezensis* ont provoqué des gonflements des hyphes de Fo. Des hyphes sans septa avec un cytoplasme condensé ont été observés après traitement de Foc par E1PP15 (*Pseudomonas*, contre Foc-S2), les mêmes observations ont été rapportées par Giorgio *et al.* (2015) lorsque *Sclerotinia sclerotiorum* a été traité avec *Pseudomonas* spp. USB2104.

### 3. 4 Recherche des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance des plantes

Les résultats de l'évaluation de la production des composés responsables de la promotion de la croissance des plantes ont été variables d'un groupe bactérien à l'autre et au sein du même groupe. Concernant les bactéries du groupe *Pseudomonas*, toutes les cinq souches se sont montrées positives pour la solubilisation du phosphate avec des valeurs allant de 57,66 à 240,69  $\mu\text{g P mL}^{-1}$ . Les valeurs de solubilisation les plus élevées ont été enregistrées avec E1FP4 et E1PP7, qui ont libéré 240,69  $\mu\text{g P mL}^{-1}$  et 223,09  $\mu\text{g P mL}^{-1}$ , respectivement. Tous les isolats ont été positifs pour la production de sidérophores, d'AIA et d'ammoniac. Trois isolats, E1PP7, E1PP15, et E1PP6, ont été positifs pour la production de l'HCN. La recherche des différentes enzymes a révélé que tous les isolats étaient négatifs pour la production de l' $\alpha$ -amylase et de la chitinase mais positifs pour la production de la cellulase. À l'exception de E1PP6, toutes les souches *Pseudomonas* ont produit la lipase avec les isolats E1PP15 et E1PP7 qui ont enregistré une activité élevée à très élevée. Parmi les cinq *Pseudomonas*, E1PP7 et E1PP15 étaient les seules à posséder une activité protéolytique (Tableau 13, figure 14).

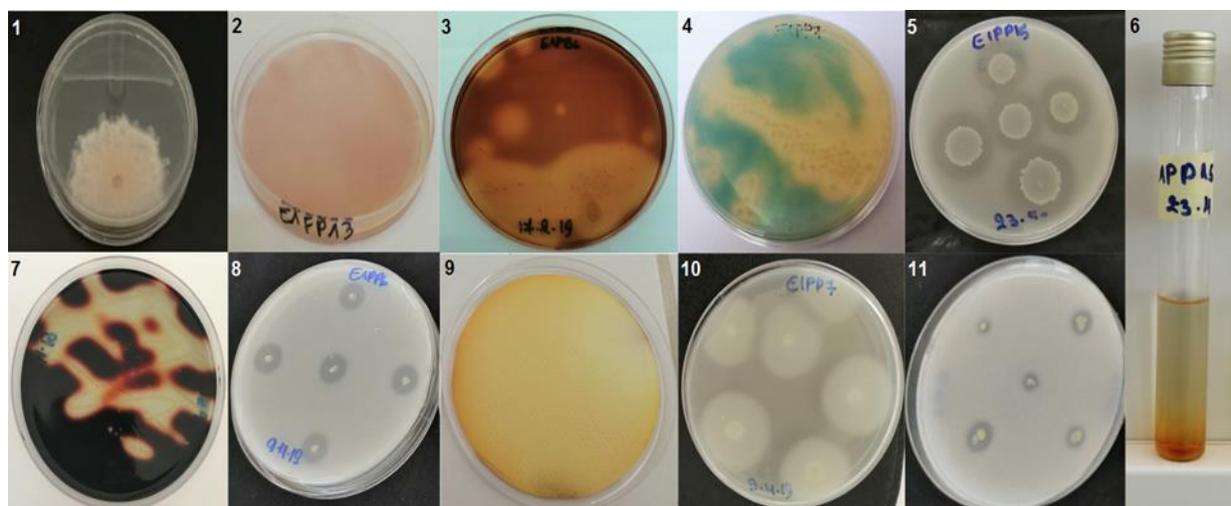
Dans le cas du groupe *Bacillus*, toutes les souches se sont montrées positives pour la solubilisation du phosphate, l'estimation quantitative a donné des valeurs similaires entre les trois souches allant de 103,38  $\mu\text{g P mL}^{-1}$  à 124,88  $\mu\text{g P mL}^{-1}$ . Toutes les bactéries ont été positives pour la production d'HCN, d'AIA et d'ammoniac. Les trois souches ont également enregistré une activité élevée pour la production de siderophores. L'évaluation de la production des différentes enzymes a révélé que toutes les souches étaient négatives pour la production de la chitinase mais positives pour la production d' $\alpha$ -amylase et protéase avec E2PB1 ayant une activité élevée. Les trois *Bacillus* ont produit la lipase de manière similaire, elles ont également synthétisé la cellulase avec E2PB1 et E1PB10 ayant les meilleures productions (Tableau 13, figure 14).

Quant à *S. meliloti*, le test qualitatif de la solubilisation du phosphate sur gélose n'a pas donné lieu à la formation d'halo, cependant, lors du test quantitatif, l'isolat a solubilisé le phosphate avec une valeur égale à  $119,19 \mu\text{g P mL}^{-1}$ . La bactérie s'est montrée positive pour la production d'AIA et ammoniac mais négative pour la production de siderophores et HCN. Concernant la production des enzymes lytiques, la bactérie n'a pas produit la protéase mais elle a synthétisé l' $\alpha$ -amylase, la lipase, la cellulase ainsi que la chitinase (Tableau 13, figure 14).

**Tableau 13.** Production des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance des plantes

Bactéries	Amy	Lip	Pro	Cel	Chit	HCN	AIA	Amm	Sid	PhQI	PhQt
E1PP7	-	++++	+	+	-	++	+	+++	++	+	223,09 $\pm 18,99^d$
E1FP4	-	+	-	+	-	-	+	+	+++	+	240,69 $\pm 0,06^d$
E1PP15	-	+++	++	+	-	+	++	++	++	+	173,80 $\pm 1,47^c$
E1PP6	-	-	-	++	-	++	+	+	+++	++	62,82 $\pm 6,01^a$
E1FP13	-	+	-	+	-	-	++	+	+++	++	57,66 $\pm 11,40^a$
E1PB10	++	+	++	+++	-	++	+	+	+++	+	111,77 $\pm 4,98^b$
E2PB1	+++	+	+++	+++	-	+	+	+	+++	+	124,88 $\pm 2,42^b$
E1PB6	++	+	+	++	-	++	+	+	+++	+	103,38 $\pm 15^b$
<i>S. meliloti</i>	+	+	-	+	++	-	++	+	-	-	119,19 $\pm 1,52^b$

(-) aucune activité, (+) activité faible, (++) activité modérée, (+++) activité élevée, (++++) activité très élevées. Les valeurs indiquées sont des moyennes de trois répétitions  $\pm$  écart type. Les moyennes d'une même colonne suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .



**Figure 14.** Evaluation de l'activité promotrice de la croissance des plantes : 1 (antagonisme), 2 (production de l'AIA), 3 (production de cellulase), 4 (production des siderophores), 5 (production de protéase), 6 (production de l'ammoniac), 7 (production d'amylase), 8 (solubilisation du phosphate), 9 (production d'HCN), 10 (production de lipase), 11 (production de chitinase).

La recherche des métabolites de promotion de la croissance des plantes a révélé que les bactéries sont capables de produire une large gamme de composés impliqués dans la nutrition de la plante et la protection contre les phytopathogènes. Les résultats de ce test permettent d'expliquer l'activité antifongique observée chez les bactéries. Dans le groupe *Pseudomonas*, les résultats du test d'antagonisme *in vitro* ont montré que les souches E1FP13, E1FP4 et E1PP7 ont inhibé la croissance de Foc-S1 à travers la production de CVA, ce qui est cohérent avec les résultats du présent test. E1FP13 et E1FP4 ont produit l'ammoniac tandis que E1PP7 a produit l'ammoniac et l'HCN. L'activité antagoniste de ces deux composés volatiles est déjà documentée par plusieurs auteurs. Une étude récente menée par Vlassi *et al.* (2020) a confirmé l'implication de l'ammoniac libéré par *Lysobacter capsici* AZ78 dans l'inhibition de *Rhizoctonia solani*. Une autre étude a révélé que l'HCN émis par *P. putida* R32 et *P. chlororaphis* R47 est responsable de l'inhibition de la croissance mycélienne du phytopathogène *Phytophthora infestans* (Anand *et al.*, 2020). L'HCN agit en ciblant la chaîne de transport d'électrons des pathogènes, ce qui conduit à une déficience dans leur production d'ATP, limitant ainsi leur croissance et leur développement (Kumari et Khanna, 2018). L'évaluation *in vitro* de l'effet antagoniste a montré que la souche E1PP15 a inhibé la croissance de Foc-S2 à travers la production de CVA, cette production est prouvée par le présent test, où la bactérie s'est montrée positive pour la synthèse

de l'HCN et l'ammoniac. E1PP6 et E1FP13 ont inhibé la croissance de Foc-S2 principalement à travers la production de CDA, ce qui est positivement corrélé à leur capacité à produire des siderophores. Les siderophores sont des composés de faible poids moléculaire qui chélate le fer ferrique (Neilands, 1984). Di Francesco et Baraldi (2021) ont signalé que la compétition pour le fer par la libération des sidérophores par les antagonistes a réduit la croissance mycélienne du champignon pathogène *Monilinia laxa*. Dans une autre étude, il a été démontré que les rhizobactéries qui avaient un fort effet antagoniste contre *Pyricularia oryzae* étaient celles qui ont enregistré la meilleure production de sidérophores (Nabila et Kasiamdari, 2021). Outre la production de sidérophores, l'isolat E1FP13 était également positif pour la production de lipase, une enzyme responsable de la dégradation de la paroi cellulaire fongique (Zouari *et al.*, 2020). L'isolat E1PP6 n'a pas produit d'enzymes lytiques, ce qui suggère que d'autres enzymes, telles que la  $\beta$ -glucanase, impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire fongique (Dewi *et al.*, 2016) ou d'autres mécanismes, tels que la production de cyclo (Pro-Val) (un dipeptide cyclique à activité antifongique produit par *P. frederiksbergensis* CMAA 1323) (Melo *et al.*, 2016), et la production d'antibiotiques (Sharma *et al.*, 2018), ont pu être utilisés.

Dans le cas du groupe *Bacillus*, toutes les souches ont produit l'ammoniac, l'HCN, la lipase et les siderophores ainsi que la protéase qui est une enzyme responsable de la dégradation de la paroi cellulaire fongique (Zouari *et al.*, 2020) ce qui est cohérent avec les résultats des tests de co-culture et production de CVA. La production de ces métabolites par *Bacillus* a été rapportée par plusieurs études ; dans le travail de Xu *et al.* (2016) deux souches de *Bacillus* (SG08-09 et SG09-12) ont produit l'ammoniac, la protéase et les siderophores, par ailleurs, l'étude de Jamali *et al.* (2018) a montré que la souche *B. amyloliquefaciens* AH53 a produit la lipase, la protéase, l'HCN et les siderophores, le travail de Shahid *et al.* (2021) a également montré que *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, et *B. tequilensis* ont produit la lipase, la protéase et les siderophores. En ce qui concerne *S. meliloti*, cette souche a produit la chitinase qui est une enzyme impliquée dans la lyse de la paroi cellulaire fongique (Dewi *et al.*, 2016) ainsi que la lipase. Ces résultats expliquent son effet antifongique observé durant le test de co-culture. La production de chitinase a également été observée avec *S. fredii* KCC5 (Kumar *et al.*, 2010), *S. meliloti* TR1 et *S. meliloti* TR4 (Kumar *et al.*, 2011), ces bactéries ont aussi inhibé la croissance fongique de *Fusarium*. Plusieurs bactéries antagonistes appartenant au groupe rhizobia ont été rapportées pour leur activité lipolytique ; *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium* S2 et

*Rhizobium* S3 ont produit la lipase et ont inhibé la croissance de *Fusarium* (Kannan *et al.*, 2019), *Mesorhizobium ciceri*-4 a également produits la lipase et a inhibé la croissance de *Foc*, *F. verticillioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Rhizoctonia solani*, *F. solani* et *Alternaria alternata* (Shurigin *et al.*, 2018).

En ce qui concerne la production des métabolites impliqués dans la promotion directe de la croissance des plantes, il en ressort que toutes les souches ont synthétisé l'AIA, cette phytohormone joue un rôle important dans le développement de la plante et ce en augmentant l'apport nutritionnel de la plante à travers l'augmentation de la surface des racines (Vessey, 2003). Toutes les souches étaient positives pour la production de la cellulase ; enzyme impliquée dans l'augmentation de la matière organique du sol (Varma *et al.*, 2019). Toutes les souches *Bacillus* ainsi que *S. meliloti* ont produit l'amylase qui comme la cellulase, augmente la matière organique du sol (Choubane *et al.*, 2016). Toutes les souches ont produit de l'ammoniac, il a été démontré que l'ammoniac produit par les PGPR fournit de l'azote à leurs plantes hôtes et favorise ainsi leur croissance (Bhattacharyya *et al.*, 2020). Toutes les souches ont également solubilisé le phosphate, cependant, les résultats de l'essai qualitatif ne correspondaient pas à ceux de l'essai quantitatif ; les valeurs de solubilisation les plus élevées ont été observées avec les souches qui ont donné les halos de solubilisation les plus faibles sur le milieu solide. Les mêmes résultats ont été observés par Nautiyal (1999). Le phosphate joue un rôle vital dans le développement des plantes. Malgré son abondance dans le sol, sa majorité reste indisponible pour les plantes. Les microorganismes solubilisant le phosphate peuvent hydrolyser les formes insolubles du phosphate en une forme soluble qui peut être facilement assimilée par les plantes (Kalayu, 2019). La production d'AIA, d'amylase, de cellulase et d'ammoniac ainsi que la solubilisation du phosphate par les *Pseudomonas*, *Bacillus*, et *S. meliloti* a été rapportée par plusieurs auteurs (Kumar *et al.*, 2010 ; Hernandez *et al.*, 2018 ; Kumari *et al.*, 2018 ; Ben Khedher *et al.*, 2021 ; Haddoudi *et al.*, 2021).

## **Partie 4 Effet des bactéries sur la croissance du pois chiche et le contrôle de la fusariose**

### **4. 1 Effet des bactéries sur la croissance du pois chiche**

Les souches *Pseudomonas* ont été appliquées individuellement et en consortium avec *S. meliloti* sur les grains de pois chiche afin de pouvoir évaluer leur impact sur la croissance des

plantes. Les résultats de l'expérience ont montré qu'à l'exception du traitement E1PP15, tous les autres traitements ont provoqué une augmentation significative ( $p < 0,0001$ ) de la longueur de la tige (LT). La LT la plus élevée a été enregistrée avec les traitements E1PP7C (38,02 cm) et E1PP7 (35,77 cm). Tous les traitements ont provoqué une augmentation significative ( $p < 0,0001$ ) de la longueur de la racine (LR) avec E1PP7C qui a donné la valeur la plus élevée de 23,85 cm. En ce qui concerne le poids sec de la tige (PST), une augmentation significative ( $p < 0,0001$ ) a été observée avec tous les traitements sauf pour le traitement E1PP15, le PST le plus élevé a été enregistré avec le traitement E1PP7C qui a donné une valeur égale à 0,36 g. Tous les traitements ont provoqué une augmentation significative ( $p < 0,0001$ ) du poids sec des racines (PSR), le traitement E1PP7C a enregistré la meilleure valeur (0,24 g) suivi par le traitement E1FP13C (0,23 g). Les résultats de ce test ont révélé que l'usage des souches *Pseudomonas* en consortiums avec *S. meliloti* abouti à une meilleure amélioration de la croissance des plantes que celle observée avec leur usage individuel (Tableau 14).

**Tableau 14.** Effets individuel et en consortium des *Pseudomonas* sur la croissance du pois chiche

<i>Pseudomonas</i>	LT (cm)	LR (cm)	PST (g)	PSR (g)
E1PP6	28,80 ± 0,69 <sup>b</sup>	12,13 ± 1,33 <sup>ab</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>bc</sup>	0,14 ± 0,04 <sup>ab</sup>
E1FP13	30,17 ± 1,46 <sup>bc</sup>	17,97 ± 0,96 <sup>cde</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>cd</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>cde</sup>
E1FP4	30,23 ± 1,66 <sup>bc</sup>	14,83 ± 1,56 <sup>bc</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>cd</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>bcd</sup>
E1PP7	35,77 ± 1,10 <sup>d</sup>	20,53 ± 0,38 <sup>e</sup>	0,32 ± 0,04 <sup>ef</sup>	0,20 ± 0,04 <sup>cde</sup>
E1PP15	23,57 ± 0,57 <sup>a</sup>	14,53 ± 1,19 <sup>bc</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>bc</sup>
E1PP6c	31,09 ± 1,47 <sup>bc</sup>	15,10 ± 1,49 <sup>bc</sup>	0,26 ± 0,02 <sup>cd</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>bcd</sup>
E1FP13c	32,03 ± 1,19 <sup>c</sup>	19,35 ± 1,02 <sup>de</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>de</sup>
E1FP4c	33,09 ± 0,29 <sup>c</sup>	16,56 ± 1,17 <sup>cd</sup>	0,30 ± 0,01 <sup>de</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>cde</sup>
E1PP7c	38,02 ± 0,4 <sup>d</sup>	23,85 ± 1,12 <sup>f</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>e</sup>
E1PP15c	28,02 ± 0,59 <sup>b</sup>	16,43 ± 1,09 <sup>cd</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>cd</sup>
Témoins	25,07 ± 1,87 <sup>a</sup>	11,17 ± 2,40 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>a</sup>

C : consortium avec *S. meliloti*. Les valeurs indiquées sont des moyennes de trois répétitions ± écart type. Les moyennes d'une même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

Dans le cas des souches *Bacillus*, les résultats de l'évaluation de leur effet individuel et celui en combinaison avec *S. meliloti* sur la croissance du pois chiche ont révélé qu'à l'exception du traitement E2PB1, tous les autres traitements ont provoqué une augmentation significative ( $p < 0,0001$ ) de la LT. La LT la plus élevée a été enregistrée avec le traitement E1PB6C (33,3 cm). Une augmentation significative ( $p < 0,0002$ ) de la LR a été notée avec tous les traitements, les plantes traitées par E1PB6C ont été marquées par la meilleure croissance qui est égale à 18,7 cm. Concernant le PST, une augmentation significative ( $p < 0,0001$ ) a été observée avec tous les traitements, Les meilleurs PST ont été observé avec E1PB6C et E1PB6 qui ont donné des valeurs égales à 0,39 g et 0,37 g respectivement. Une augmentation significative ( $p < 0,0001$ ) du PSR a également été observée avec tous les traitements, Les meilleures valeurs ont été notées avec les traitements E2PB1C (0,25 g) et E1PB6C (0,24 g). Les résultats de ce test ont montré que l'application des souches *Bacillus* en consortiums avec *S. meliloti* abouti à une meilleure amélioration de la croissance des plantes que celle observée avec leur application individuelle (Tableau 15).

**Tableau 15.** Effets individuel et en consortium des *Bacillus* sur la croissance du pois chiche

<i>Bacillus</i>	LT (cm)	LR (cm)	PST (g)	PSR (g)
E1PB10	28,23 ± 1,53 <sup>ab</sup>	13,30 ± 0,82 <sup>ab</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>b</sup>
E2PB1	25,27 ± 0,67 <sup>a</sup>	14,37 ± 0,55 <sup>abc</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>cd</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>de</sup>
E1PB6	30,83 ± 0,47 <sup>bc</sup>	15,63 ± 0,76 <sup>bcd</sup>	0,37 ± 0,02 <sup>e</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>cd</sup>
E1PB10c	30,80 ± 0,82 <sup>bc</sup>	16,30 ± 0,87 <sup>bcd</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>c</sup>
E2PB1c	27,90 ± 1,31 <sup>ab</sup>	17,00 ± 1,35 <sup>cd</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>e</sup>
E1PB6c	33,30 ± 1,37 <sup>c</sup>	18,70 ± 1,56 <sup>d</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>e</sup>
Témoins	25,07 ± 1,87 <sup>a</sup>	11,17 ± 2,40 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>a</sup>

C : consortium avec *S. meliloti*. Les valeurs indiquées sont des moyennes de trois répétitions ± écart type. Les moyennes d'une même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

En ce qui concerne *S. meliloti*, cette souche a augmenté de manière significative ( $p < 0,05$ ) tous les paramètres de croissance, avec des valeurs égales à 28,22 cm, 15,10 cm, 0,21 g, et 0,18 g pour la LT, la LR, le PST, et le PSR respectivement.



**Figure 15.** Effet des bactéries sur la croissance du pois chiche : 1 (traitement par *Bacillus*), 2 (témoin), 3 (traitement par *Pseudomonas*), 4 (traitement par *S. meliloti*).

Le traitement des graines de pois chiche par les différentes bactéries a révélé une augmentation considérable des paramètres de croissance. Dans le groupe *Pseudomonas*, les isolats E1PP6, E1FP13, E1FP4 et E1PP7 ont augmenté de manière significative la LT et le PST, ce qui est cohérent avec leur capacité à produire plusieurs composés tels que l'ammoniac, la cellulase, les sidérophores, et à solubiliser le phosphate. Bien que l'isolat E1PP15 se soit montré positif pour la production de ces composés, il n'a pas amélioré la croissance de la tige comme le reste des isolats. Ce résultat peut être expliqué par le fait que, contrairement aux tests *in vitro*, E1PP15 n'était pas capable de synthétiser ces métabolites *in vivo*. En ce qui concerne la croissance des racines, tous les isolats ont augmenté significativement la LR et le PSR, ce qui concorde avec leur capacité à produire de l'AIA. L'AIA joue un rôle important dans le développement des racines ; dans une étude récente, le type sauvage de *P. moraviensis* a été signalé pour sa capacité à augmenter la surface des racines du blé par rapport à ses mutants déficients en AIA (Ul Hassan et Bano, 2019). Nos résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont démontré la capacité des *Pseudomonas* à améliorer la croissance du pois chiche (Joshi *et al.*, 2019 ; Rawat *et al.*, 2019 ; Gaurav et Pallavi, 2020).

Dans le cas du groupe *Bacillus*, les isolats E1PB10 et E1PB6 ont augmenté de manière significative la LT ainsi que le PST, cette amélioration est due à leur capacité à augmenter la fertilité du sol à travers la production de l'amylase, la cellulase, l'ammoniac, les sidérophores et à solubiliser le phosphate. L'isolat E2PB1 n'a pas augmenté la LT mais il a augmenté le PST. Ce résultat peut être expliqué par une augmentation dans le nombre des feuilles ou ramifications.

L'effet positif des *Bacillus* sur le nombre des feuilles et ramifications a déjà été rapporté par plusieurs auteurs (Chakraborty *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2017 ; Jabborova *et al.*, 2021). Tous les isolats *Bacillus* ont augmenté la LR et le PSR ce qui est cohérent avec leur capacité à produire l'AIA. Une corrélation positive entre la production d'AIA par *Bacillus* sp. WhIr-15 et *Bacillus* sp. WhIr-12 et la croissance racinaire du blé traité par ces bactéries a été observée par Baghaee-Ravari et Heidarzadeh (2014). Plusieurs travaux qui ont démontré la capacité des *Bacillus* à améliorer la croissance du pois chiche (Kumar *et al.*, 2016 ; Khan *et al.*, 2021 ; Kushwaha *et al.*, 2021) Concordent avec les résultats de notre étude. En ce qui concerne *S. meliloti*, cette souche a amélioré tous les paramètres de croissance, ce qui est cohérent avec sa capacité à produire l'amylase, la cellulase, l'AIA, l'ammoniac et à solubiliser le phosphate. L'effet positif de *Sinorhizobium* sur la croissance des plantes a été rapporté dans plusieurs études (Kumar *et al.*, 2010 ; Kumar *et al.*, 2011 ; Hernandez *et al.*, 2018). Les résultats de ce test ont révélé que l'usage des souches *Pseudomonas* et *Bacillus* en consortiums avec *S. meliloti* abouti à une meilleure amélioration de la croissance des plantes que celle observée avec leur usage individuel. Les mêmes résultats ont été rapportés par Guñazú *et al.* (2010).

#### 4. 2 Biocontrôle de la fusariose

L'évaluation de la capacité des traitements *Pseudomonas* à contrôler la fusariose du pois chiche a révélé que la GM a été significativement ( $p < 0,0001$ ) plus faible dans les plantes inoculées par les différents traitements en comparaison avec les plantes non inoculées infectées par Foc-S1 (témoin). Les valeurs de la GM étaient similaires à travers les six traitements, cependant, une différence significative ( $p = 0,020$ ) a été notée avec les valeurs de la RM. La meilleur RM a été enregistrée avec le traitement E1FP13c (69,23 %). La GM a été également significativement ( $p < 0,0001$ ) plus faible chez les plantes traitées en comparaison avec les plantes non traitées infectées par Foc-S2 (témoin). Les valeurs de la GM étaient significativement différentes à travers les six traitements, les plantes traitées par E1FP13c ont été marquées par la GM la plus faible (27,78 %). Une différence significative ( $p = 0,001$ ) a été notée avec les résultats de la RM, La meilleur valeur a été observée avec le traitement E1FP13c (66,67 %). À l'exception de E1FP4, toutes les autres souches *Pseudomonas* ont mieux réduit la fusariose causée par Foc-S1 quand elles ont été utilisées en combinaison avec *S. meliloti*. Pour les plantes infectées par Foc-S2, une meilleure réduction de la maladie a également été notée quand les souches *Pseudomonas* ont été utilisées en combinaison avec *S. meliloti* (Tableau 16).

**Tableau 16.** Biocontrôle de la fusariose par les traitements *Pseudomonas*

Traitements	Foc-S1		Traitements	Foc-S2	
	GM %	RM %		GM %	RM %
E1FP13	31,94 ± 6,36 <sup>a</sup>	55,77 ± 8,81 <sup>ab</sup>	E1FP13	38,89 ± 4,82 <sup>ab</sup>	53,33 ± 5,78 <sup>bc</sup>
E1FP4	37,50 ± 4,17 <sup>a</sup>	48,08 ± 5,78 <sup>ab</sup>	E1PP6	44,44 ± 9,62 <sup>b</sup>	46,67 ± 11,55 <sup>b</sup>
E1PP7	38,89 ± 9,62 <sup>a</sup>	46,16 ± 13,33 <sup>a</sup>	E1PP15	58,33 ± 0,00 <sup>c</sup>	30,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
E1FP13c	22,22 ± 4,81 <sup>a</sup>	69,23 ± 6,66 <sup>b</sup>	E1FP13c	27,78 ± 4,81 <sup>a</sup>	66,67 ± 5,77 <sup>c</sup>
E1FP4c	25,00 ± 00,00 <sup>a</sup>	65,38 ± 00,00 <sup>ab</sup>	E1PP6c	36,11 ± 4,81 <sup>ab</sup>	56,67 ± 5,77 <sup>bc</sup>
E1PP7c	27,78 ± 4,81 <sup>a</sup>	61,54 ± 6,66 <sup>ab</sup>	E1PP15c	38,89 ± 4,81 <sup>ab</sup>	53,33 ± 5,77 <sup>bc</sup>
Témoins	72,22 ± 12,73 <sup>b</sup>	00,00	Témoins	83,33 ± 8,34 <sup>d</sup>	00,00

C : consortium avec *S. meliloti*. Les valeurs indiquées sont des moyennes de trois répétitions ± écart type. Les moyennes d'une même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$

L'effet des traitements *Pseudomonas* sur la croissance des plantes de pois chiche atteintes de fusariose a également été évalué. Les résultats de l'expérience ont montré que chez les plantes infectées par Foc-S1, une amélioration significative ( $p < 0,0001$ ) des paramètres de croissance a été observée avec toutes les plantes traitées par rapport aux plantes non traitées (témoins). La LT la plus élevée a été notée avec le traitement E1PP7C (34,13 cm). Les meilleurs LR ont été enregistrés avec E1PP7C (19,00 cm) et E1FP13C (18,03 cm). Quant au PST, les plantes traitées par E1PP7C ont été marquées par le PST le plus élevé égale à 0,27 g. Concernant le PSR, Les meilleurs résultats ont été observés avec E1FP13C (0,21 g) et E1PP7C (0,20 g). Comme pour les plantes infectées par Foc-S1, les traitements ont aussi améliorés significativement ( $p < 0,0001$ ) les paramètres de croissance chez les plantes infectées par Foc-S2 et cela en comparaison avec les plantes non traitées (témoins). Le traitement E1FP13c s'est montré le plus performant parmi les six traitements, il a enregistré des valeurs égales à 28,03 cm, 15,01 cm, 0,18 g, et 0,18 g pour

la LT, LR, PST, et PSR respectivement. Les résultats de ce test ont révélé que l'usage des souches *Pseudomonas* en consortiums avec *S. meliloti* améliore la croissance des plantes de pois chiche infectées par Foc mieux que leur usage individuel (Tableau 17).

**Tableau 17.** Effet des traitements *Pseudomonas* sur la croissance du pois chiche infecté par Foc

Foc-S1					Foc-S2				
Trait Ps	LT (cm)	LR (cm)	PST (g)	PSR (g)	Trait Ps	LT (cm)	LR (cm)	PST (g)	PSR (g)
E1FP13	27,52 ± 0,43 <sup>b</sup>	15,00 ± 1,41 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>bc</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>bc</sup>	E1FP13	24,02 ± 0,88 <sup>c</sup>	12,51 ± 0,80 <sup>cd</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>cd</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>de</sup>
E1FP4	29,89 ± 1,99 <sup>bc</sup>	13,70 ± 0,68 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>	E1PP6	25,59 ± 1,22 <sup>cd</sup>	10,88 ± 0,50 <sup>c</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,13 ± 0,02 <sup>cd</sup>
E1PP7	31,39 ± 0,73 <sup>cd</sup>	15,05 ± 0,54 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>bc</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>bc</sup>	E1PP15	19,01 ± 1,00 <sup>b</sup>	8,03 ± 0,43 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>b</sup>
E1FP13c	29,36 ± 0,87 <sup>bc</sup>	18,03 ± 1,63 <sup>c</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>cd</sup>	0,21 ± 0,03 <sup>c</sup>	E1FP13c	28,03 ± 0,70 <sup>e</sup>	15,01 ± 0,80 <sup>e</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>f</sup>
E1FP4c	32,08 ± 1,57 <sup>cd</sup>	15,60 ± 0,77 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>cd</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>bc</sup>	E1PP6c	27,18 ± 0,84 <sup>de</sup>	13,45 ± 0,86 <sup>de</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>cd</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>e</sup>
E1PP7c	34,13 ± 1,73 <sup>d</sup>	19,00 ± 1,26 <sup>c</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>c</sup>	E1PP15c	21,10 ± 1,08 <sup>b</sup>	11,48 ± 0,79 <sup>c</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>bc</sup>
Témoins	19,19 ± 0,72 <sup>a</sup>	7,73 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a</sup>	Témoins	14,22 ± 0,65 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,60 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>

C : consortium avec *S. meliloti*. Les valeurs indiquées sont des moyennes de trois répétitions ± écart type. Les moyennes d'une même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

Dans le cas des traitements *Bacillus*, les résultats de l'évaluation de leur effet sur le contrôle de la fusariose ont montré que la GM était significativement ( $p < 0,0001$ ) plus faible chez les plantes traitées en comparaison avec les plantes non traitées infectées par Foc-S1 (témoin). La différence entre les valeurs GM n'était pas significative, tandis que les valeurs de la RM enregistrées avec les six traitements étaient significativement ( $p = 0,007$ ) différentes les unes des autres avec le traitement E1PB6c ayant le pourcentage de RM le plus élevé égale à 78,85 %. Concernant les plantes infectées par Foc-S2, tous les traitements ont résulté en une GM significativement ( $p < 0,0001$ ) plus faible que celle observée avec le témoin. Les valeurs de la GM étaient similaires à travers les six traitements. Une différence significative a été notée entre les valeurs de RM enregistrées avec les traitements ( $p = 0,014$ ). Les plantes traitées par E2PB1c ont été marquées par la meilleur RM égale à 76,67 %. Toutes les souches *Bacillus* ont mieux réduit la fusariose causée par Foc-S1 quand elles ont été utilisées en combinaison avec *S. meliloti*. À l'exception de E1PB6, toutes les autres souches ont mieux réduit la fusariose causée par Foc-S2 quand elles ont été utilisées en combinaison avec *S. meliloti* (Tableau 18).

**Tableau 18.** Biocontrôle de la fusariose par les traitements *Bacillus*

Traitements	Foc-S1		Foc-S2	
	GM %	RM %	GM %	RM %
E1PB6	25,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	65,38 ± 0,00 <sup>ab</sup>	27,78 ± 4,81 <sup>a</sup>	66,67 ± 5,77 <sup>ab</sup>
E1PB10	22,22 ± 4,81 <sup>a</sup>	69,23 ± 6,66 <sup>abc</sup>	33,33 ± 0,00 <sup>a</sup>	60,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
E2PB1	27,78 ± 4,81 <sup>a</sup>	61,54 ± 6,66 <sup>a</sup>	30,56 ± 4,81 <sup>a</sup>	63,33 ± 5,77 <sup>ab</sup>
E1PB6c	15,28 ± 2,41 <sup>a</sup>	78,85 ± 3,33 <sup>c</sup>	22,22 ± 4,81 <sup>a</sup>	73,33 ± 5,77 <sup>ab</sup>
E1PB10c	16,67 ± 0,00 <sup>a</sup>	76,92 ± 0,00 <sup>bc</sup>	22,22 ± 4,81 <sup>a</sup>	73,33 ± 5,77 <sup>ab</sup>
E2PB1c	19,44 ± 4,81 <sup>a</sup>	73,08 ± 6,66 <sup>abc</sup>	19,44 ± 4,81 <sup>a</sup>	76,67 ± 5,77 <sup>b</sup>
Témoins	72,22 ± 12,73 <sup>b</sup>	/	83,33 ± 8,34 <sup>b</sup>	/

C : consortium avec *S. meliloti*. Les valeurs indiquées sont des moyennes de trois répétitions ± écart type. Les moyennes d'une même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

Les résultats de l'effet des traitements *Bacillus* sur la croissance des plantes de pois chiche atteintes de fusariose ont révélé que chez les plantes infectées par Foc-S1, tous les traitements ont pu améliorer de manière significative ( $p < 0,0001$ ) la LT sauf pour le traitement E2PB1qui n'était pas différent du témoin. Une amélioration significative ( $p < 0,0001$ ) de la LR,

PST, et PSR a été observée avec tous les traitements par rapport aux témoins. Le traitement E1PB6c s'est montré le plus performant en terme d'augmentation de la LT (31,40 cm), la LR (16,00 cm), et le PST (0,33 g). Le PSR le plus élevé a été observé avec les traitements E2PB1c et E1PB6c qui est égale à 0,21 g. Dans le cas des pots infectés par Foc-S2, les six traitements ont également amélioré de manière significative ( $p < 0,0001$ ) tous les paramètres de croissance et cela en comparaison avec le témoin. Les traitements E1PB10c, E1PB6c, et E2PB1c ont enregistré les meilleurs LT égales à 25,90 cm, 25,71 cm, et 25,59 cm respectivement. La LR la plus élevée a été observée avec le traitement E2PB1c (15,70 cm). Quant au PST, les plantes traitées par E1PB6c, E1PB6, et E2PB1c ont été marquées par les valeurs les plus élevées égales à 0,29 g, 0,27 g et 0,27 g. Concernant le PSR, la meilleure valeur a été enregistrée avec le traitement E2PB1c (0,22 g). Les résultats de ce test ont révélé que l'application des souches *Bacillus* en consortiums avec *S. meliloti* améliore la croissance des plantes de pois chiche infectées par Foc mieux que leur application individuel (Tableau 19).

**Tableau 19.** Effet des traitements *Bacillus* sur la croissance du pois chiche infecté par Foc

Trait Bc	Foc-S1				Foc-S2			
	LT (cm)	LR (cm)	PST (g)	PSR (g)	LT (cm)	LR (cm)	PST (g)	PSR (g)
E1PB6	26,78 ± 1,35 <sup>bc</sup>	12,61 ± 1,22 <sup>bc</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>e</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>c</sup>	22,80 ± 1,16 <sup>bc</sup>	11,30 ± 0,97 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>c</sup>
E2PB1	21,00 ± 1,35 <sup>a</sup>	11,90 ± 1,17 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>c</sup>	20,09 ± 1,84 <sup>b</sup>	10,79 ± 1,30 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>c</sup>
E1PB10	25,20 ± 1,47 <sup>b</sup>	12,00 ± 1,24 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>	22,50 ± 0,90 <sup>b</sup>	10,00 ± 0,87 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>b</sup>
E1PB6c	31,40 ± 1,44 <sup>d</sup>	16,00 ± 1,04 <sup>d</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>f</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>d</sup>	25,71 ± 1,24 <sup>c</sup>	14,40 ± 1,30 <sup>cd</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>d</sup>
E2PB1c	25,02 ± 1,21 <sup>b</sup>	15,07 ± 0,84 <sup>cd</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>d</sup>	25,59 ± 1,36 <sup>c</sup>	15,70 ± 0,77 <sup>d</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>e</sup>
E1PB10c	29,00 ± 1,16 <sup>cd</sup>	14,38 ± 1,08 <sup>bcd</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>cd</sup>	25,90 ± 1,00 <sup>c</sup>	12,12 ± 1,10 <sup>bc</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>c</sup>
Témoins	19,19 ± 0,72 <sup>a</sup>	7,73 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a</sup>	14,22 ± 0,65 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,60 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>

C : consortium avec *S. meliloti*. Les valeurs indiquées sont des moyennes de trois répétitions ± écart type. Les moyennes d'une même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

Dans le cas des plantes traitées par *S. meliloti*, des valeurs de GM égales à 40,28 % et 52,78 % ont été enregistrées avec les pots infectés par Foc-S1 et Foc-S2 respectivement, ces valeurs sont significativement ( $p < 0,02$ ) plus faible que celles observées avec les plantes non traitées (témoins). *S. meliloti* a réduit la fusariose avec des pourcentages égaux à 44,23 % et 36,67 % chez les plantes infectées par Foc-S1 et Foc-S2 respectivement. Le traitement a

également amélioré de manière significative ( $p < 0,02$ ) tous les paramètres de croissance. En ce qui concerne les pots infectés par Foc-S1, les plantes traitées ont enregistrées des valeurs égales à 24,00 cm, 11,00 cm, 0,16 g, et 0,12 g pour la LT, la LR, le PST, et le PSR respectivement. Quant aux pots infectés par Foc-S2, les plantes traitées ont enregistrées des valeurs égales à 20,24 cm, 9,68 cm, 0,12 g, et 0,09 g pour la LT, la LR, le PST, et le PSR respectivement.



**Figure 16.** Biocontrôle de la fusariose. 1 : effet sur Foc-S1 (A : traitement par *Pseudomonas*, B : traitement par *Bacillus*), 2 : effet sur Foc-S2 (A : traitement par *Pseudomonas*, B : traitement par *Bacillus*), 3 : feuilles des plantes traitées (A : feuilles saines, B : feuilles partiellement jaunies), 4 : témoin (A : feuilles complètement jaunies, B : flétrissement, C : plant desséché et flétri).

Dans ce test les isolats bactériens ont été évalués pour leur activité de biocontrôle contre Foc. Deux types de traitements ont été utilisés ; les traitements individuels ; et ceux en consortium avec *S. meliloti*. L'application des traitements a été faite par bacterisation des grains de pois chiche. L'effet des traitements sur la réduction de la maladie et la croissance des plantes a été mesuré. Les résultats du test ont révélé que dans le groupe *Pseudomonas*, toutes les souches ont réduit la maladie et amélioré la croissance du pois chiche. Plusieurs travaux ont démontré l'efficacité des *Pseudomonas* dans le contrôle de la fusariose ; *P. aeruginosa* A7 a été rapporté par Mozumder *et al.* (2022) pour avoir réduit la fusariose et amélioré le PST et le PSR des plantes infectées par Foc. Par ailleurs, *P. fluorescens* a provoqué une diminution dans la sévérité de la fusariose, et a également augmenté la LT, la LR et le poids sec des plantes de pois chiche infectées par Foc (Keote *et al.*, 2019). D'autre part, Kumar *et al.* (2022) ont observé une réduction considérable des symptômes de la fusariose chez les plantes de pois chiche traitée par

*P. stutzeri*. De même, une diminution significative du flétrissement a été notée chez les plantes de pois chiche inoculées par *P. fluorescens* OKC, Kumar *et al.* (2017) ont attribué cette diminution à l'augmentation du contenu phénolique totale (CPT) des plantes (présent dans l'exsudat racinaire), cette augmentation a été induite par *P. fluorescens* OKC. Les phénols jouent un rôle important dans les défenses de la plante (Nagpal *et al.*, 2021). Dans le groupe *Bacillus*, toutes les souches ont réduit la maladie, et stimulé la croissance des plantes. Ce résultat est en accord avec multiples études qui ont démontré la capacité des *Bacillus* à contrôler la fusariose ; Zaim *et al.* (2018) ont rapporté que le traitement des grains de pois chiche par *B. subtilis* Bs1 a conduit à une diminution de la sévérité de la maladie et à une augmentation appréciable de la LT, LR, PST, et le PSR. De leur côté, Bekkar *et al.* (2018) ont signalé que *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* et *B. tequilensis* ont réduit de manière significative le flétrissement du pois chiche, et ont amélioré la croissance des plantes infectées. Trivedi *et al.* (2020) ont également observé une diminution de la fusariose suite au traitement des grains de pois chiche par *B. subtilis*. La comparaison entre les *Pseudomonas* et les *Bacillus* a révélé que les *Bacillus* ont mieux réduit la fusariose du pois chiche, ce qui est compatible avec les résultats du test d'antagonisme *in vitro*. Le même résultat a été rapporté par Karimi *et al.* (2012). Concernant *S. meliloti*, elle a réduit la maladie et a également amélioré tous les paramètres de croissance. La capacité de *Sinorhizobium* à contrôler la fusariose a été documentée par plusieurs auteurs ; l'effet positif de *S. meliloti* TII7 et *S. medicae* SII4 sur le PST et le PSR des plantes atteintes de fusariose a été rapporté par Batnini *et al.* (2020), par ailleurs, une réduction significative de la fusariose a été observée par Ehteshamul-Haque et Ghaffar (1993) après traitement des grains par *S. meliloti* KUMH 139, de même, une diminution significative dans le nombre des plantes atteintes de fusariose a été notée par Choure et Dubey (2012) après traitement par *S. fredii* KCC5.

Les résultats des différents tests effectués dans notre travail ont révélé que les souches bactériennes produisent divers composés antifongiques et causent des dommages considérables aux hyphes du Foc, elles sont aussi capable d'améliorer la croissance du pois chiche par la production de plusieurs métabolites qui jouent un rôle important dans la fourniture et l'acquisition de nutriments. L'amélioration de la croissance des plantes contribue au processus de biocontrôle, car elle confère une meilleure résistance des plantes aux agents pathogènes, limitant ainsi leur impact négatif sur les plantes. La combinaison de l'ensemble de ces mécanismes

explique l'activité de biocontrôle exhibée par les souches *Pseudomonas*, *Bacillus*, et *S. meliloti* lorsqu'elles sont appliquées en traitement de semences.

#### 4. 3 Identification moléculaire des bactéries

Les séquences bactériennes issues du séquençage du gène ARNr 16S ont été soumises à NCBI et des numéros d'accèsion ont été attribués à chaque souche. L'identification des souches *Pseudomonas* et *Bacillus* a été effectuée en utilisant l'outil BLAST (pour Basic Local Alignment Search Tools) qui permet de comparer une séquence cible à des séquences références présentes dans la base de donnée NCBI. La recherche par BLAST a été limitée aux séquences appartenant aux souches-type, et l'identification était basée sur le pourcentage d'homologie avec les séquences de référence.

Des arbres phylogénétiques ont également été générés par la méthode « Neighbor joining » en utilisant le programme MEGA-X avec des valeurs Bootstrap basées sur 1000 réplifications. Les séquences issues de la recherche BLAST qui ont présenté les pourcentages de similarité les plus élevés avec nos isolats ont été sélectionnées et utilisées pour la construction des arbres. L'espèce *Rhizobacter gummiphilus* a été utilisée comme « out-groupe » dans la construction des arbres *Pseudomonas* tandis que l'espèce *Saccharococcus thermophilus* a été utilisée comme « out-groupe » dans la construction des arbres *Bacillus*.

Dans le cas des *Pseudomonas*, Les résultats de l'analyse phylogénétique ont révélé que les isolats E1FP4, E1FP13, et E1PP6 partagent le même ancêtre commun avec *P. frederiksbergensis*, avec qui ils ont enregistré les pourcentages de similarité les plus élevés (>99,50 %). *P. frederiksbergensis* présente le descendant le plus proche des trois *Pseudomonas* (Tableau 20, figures 17-19). Les isolats E1PP7 et E1PP15 sont étroitement liés à *P. granadensis* (100 % et 99,77 % d'identité respectivement) et à *P. soyae* (99,72 % et 99,65 % d'identité respectivement) avec lesquelles ils partagent le même ancêtre commun (Tableau 20, figures 20 et 21).

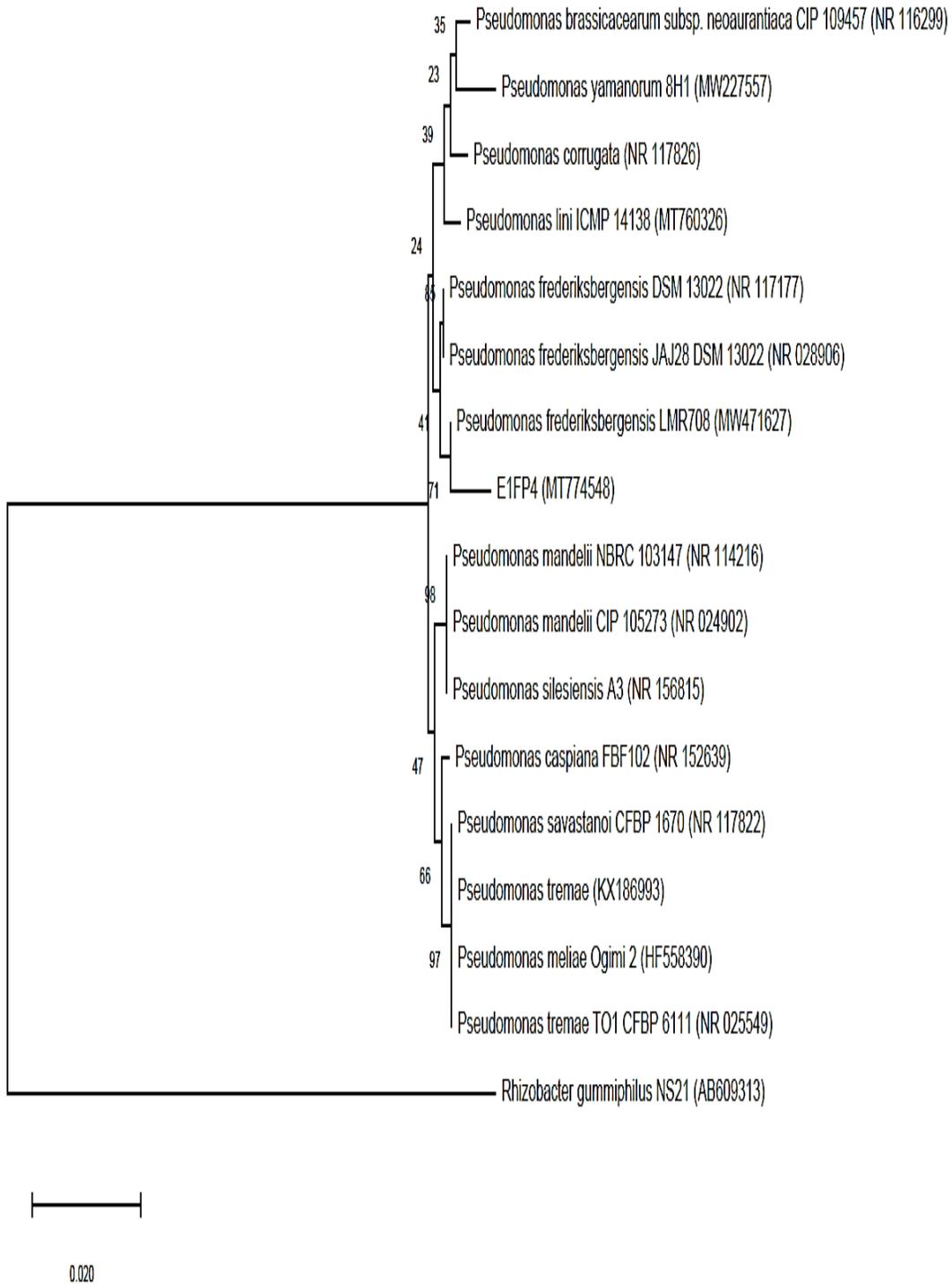
Quant aux *Bacillus*, Les résultats de l'analyse phylogénétique ont révélé que les isolats E1PB10 et E1PB6 ont le même ancêtre commun que les souches de l'espèce *B. mojavensis*, cette dernière constitue leur descendant le plus proche avec qui ils ont enregistré un pourcentage d'identité égale à 100 % (Tableau 20, figures 22 et 23). En ce qui concerne E2PB1, l'analyse de

l'arbre phylogénétique a montré que cet isolat partage le même ancêtre commun avec deux espèces qui sont *B. mojavensis* et *B. halotolerans* avec lesquelles il a enregistré le pourcentage d'identité le plus élevé égale à 100 % (Tableau 20, figure 24). Afin de pouvoir déterminer laquelle parmi les deux est la plus similaire à E2PB1, l'analyse d'autres gènes doit être effectuée.

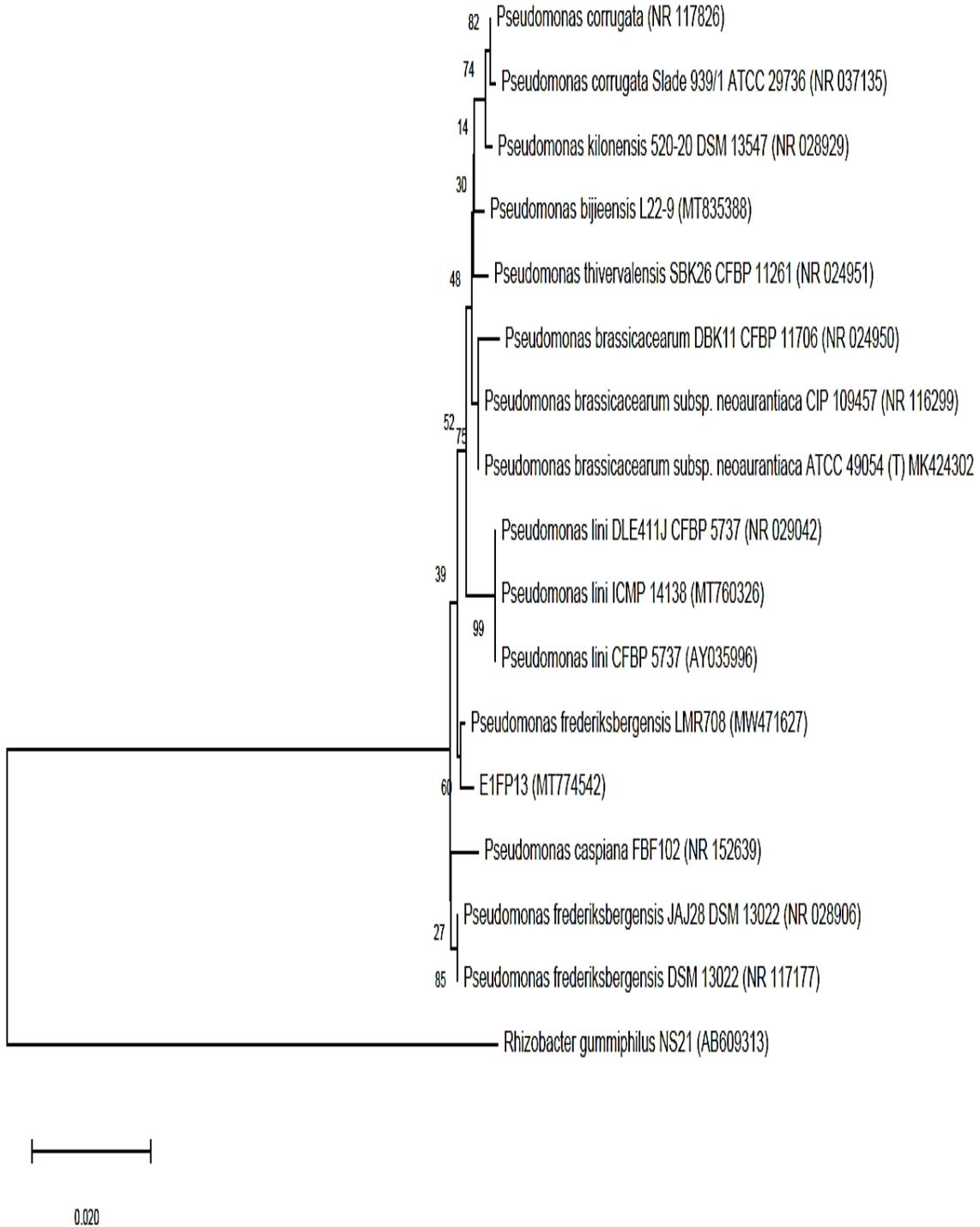
**Tableau 20.** Résultats du BLAST des souches *Pseudomonas* et *Bacillus*

Isolats	Accessions	Meilleure correspondance	PI*	EV*
E1PP6	MT774541	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	99,55 %	0,0
E1FP13	MT774542	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> strain LMR 708	99,56 %	0,0
E1PP7	MT774544	<i>Pseudomonas granadensis</i> strain F-278,770T	100 %	0,0
E1PP15	MT774545	<i>Pseudomonas granadensis</i> strain F-278,770T	99,77 %	0,0
E1FP4	MT774548	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> strain LMR708	99,89 %	0,0
E1PB10	MT774546	<i>Bacillus mojavensis</i>	100 %	0,0
E2PB1	MT774543	<i>Bacillus mojavensis</i> strain ifo 15718 <i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802	100 %	0,0
E1PB6	MT774547	<i>Bacillus mojavensis</i>	100 %	0,0

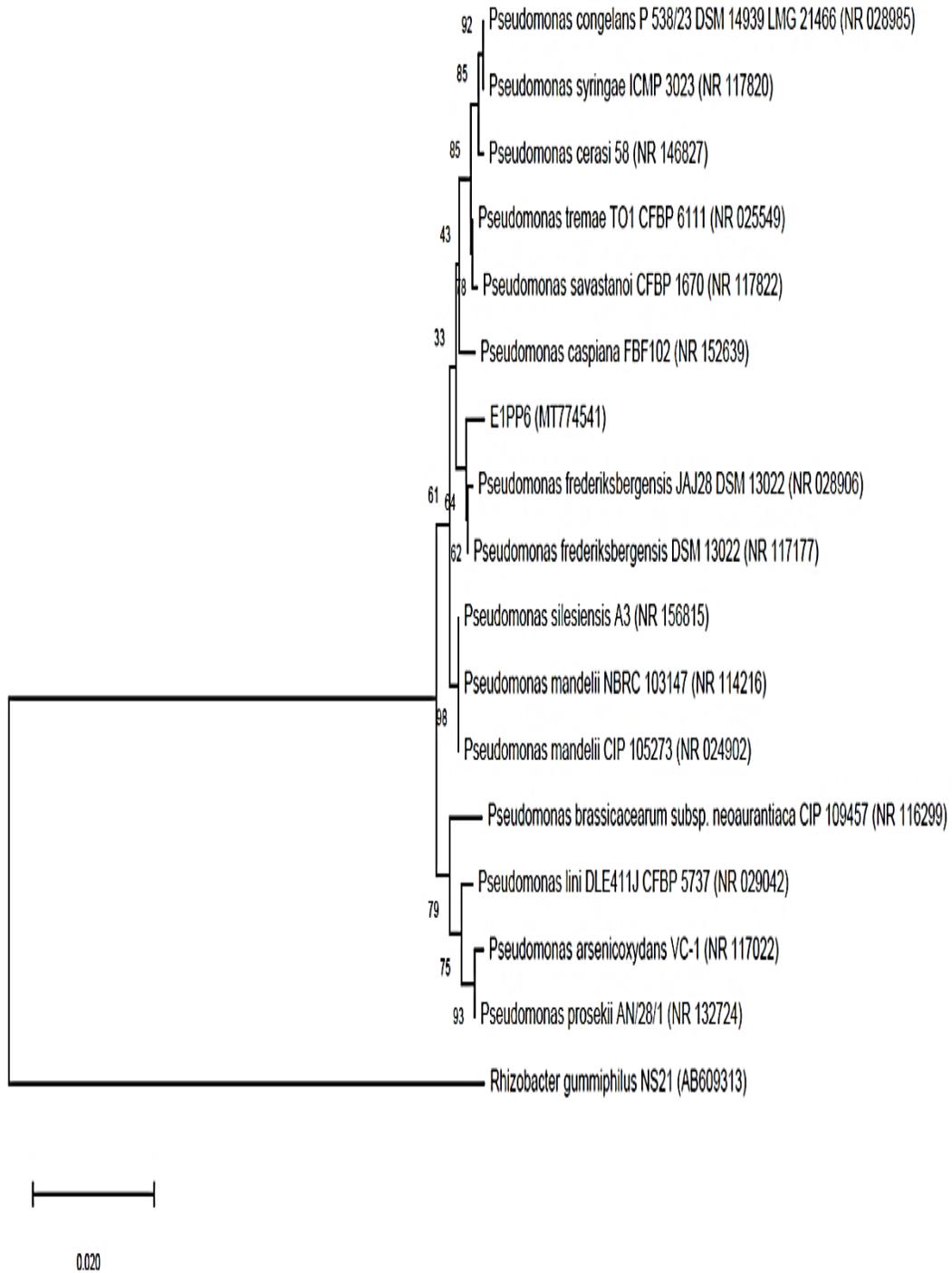
PI\*: Pourcentage d'identification, EV\* (Expect value) : un paramètre qui décrit la signification des résultats, plus sa valeur est proche de zéro, plus la correspondance est significative (NCBI).



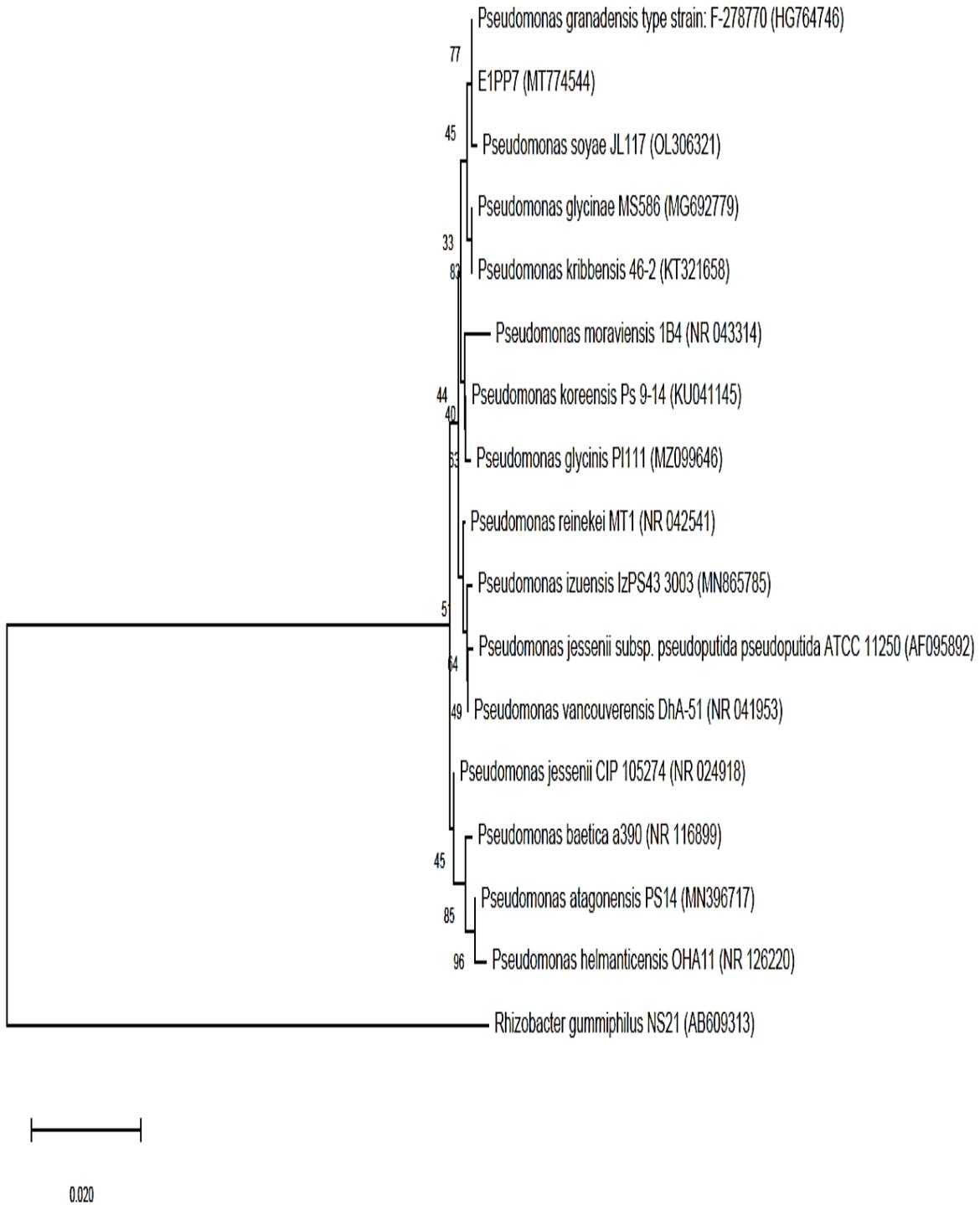
**Figure 17.** Arbre phylogénétique de la souche E1FP4 construit par la méthode « Neighbor joining » avec les valeurs de Bootstrap soutenant les branches indiquées aux nœuds. La barre indique le nombre de substitutions par site.



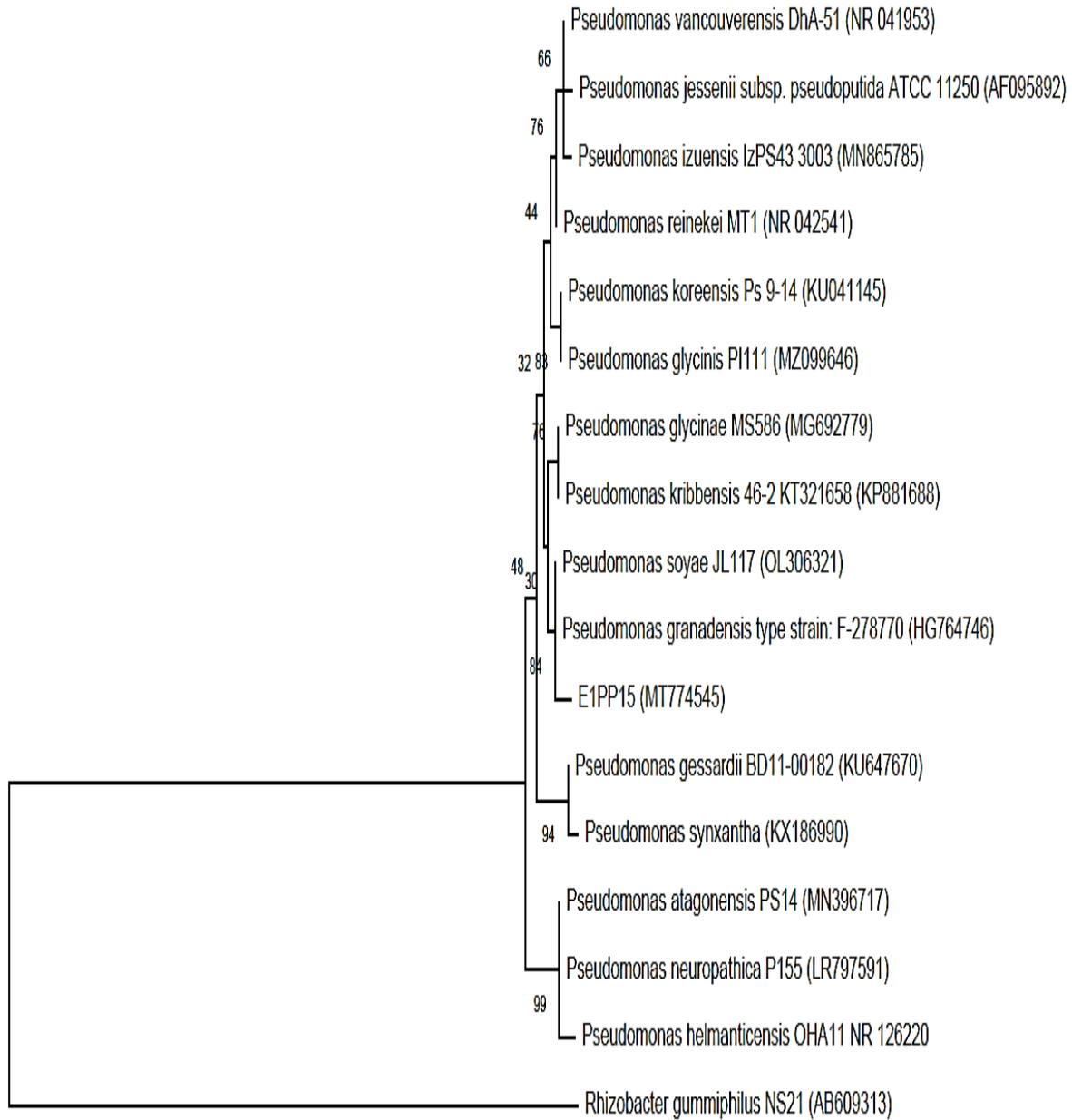
**Figure 18.** Arbre phylogénétique de la souche E1FP13 construit par la méthode « Neighbor joining » avec les valeurs de Bootstrap soutenant les branches indiquées aux nœuds. La barre indique le nombre de substitutions par site.



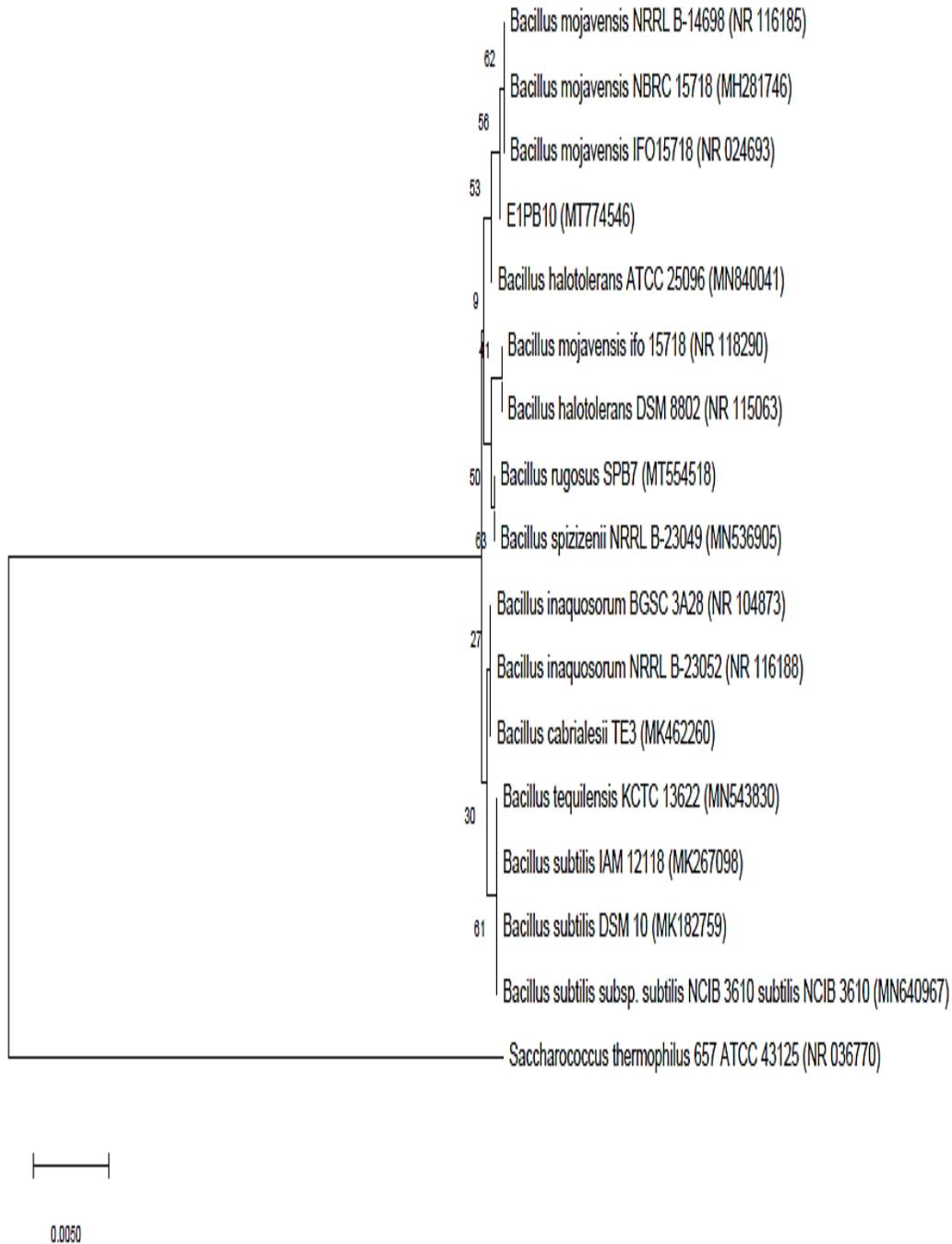
**Figure 19.** Arbre phylogénétique de la souche E1PP6 construit par la méthode « Neighbor joining » avec les valeurs de Bootstrap soutenant les branches indiquées aux nœuds. La barre indique le nombre de substitutions par site.



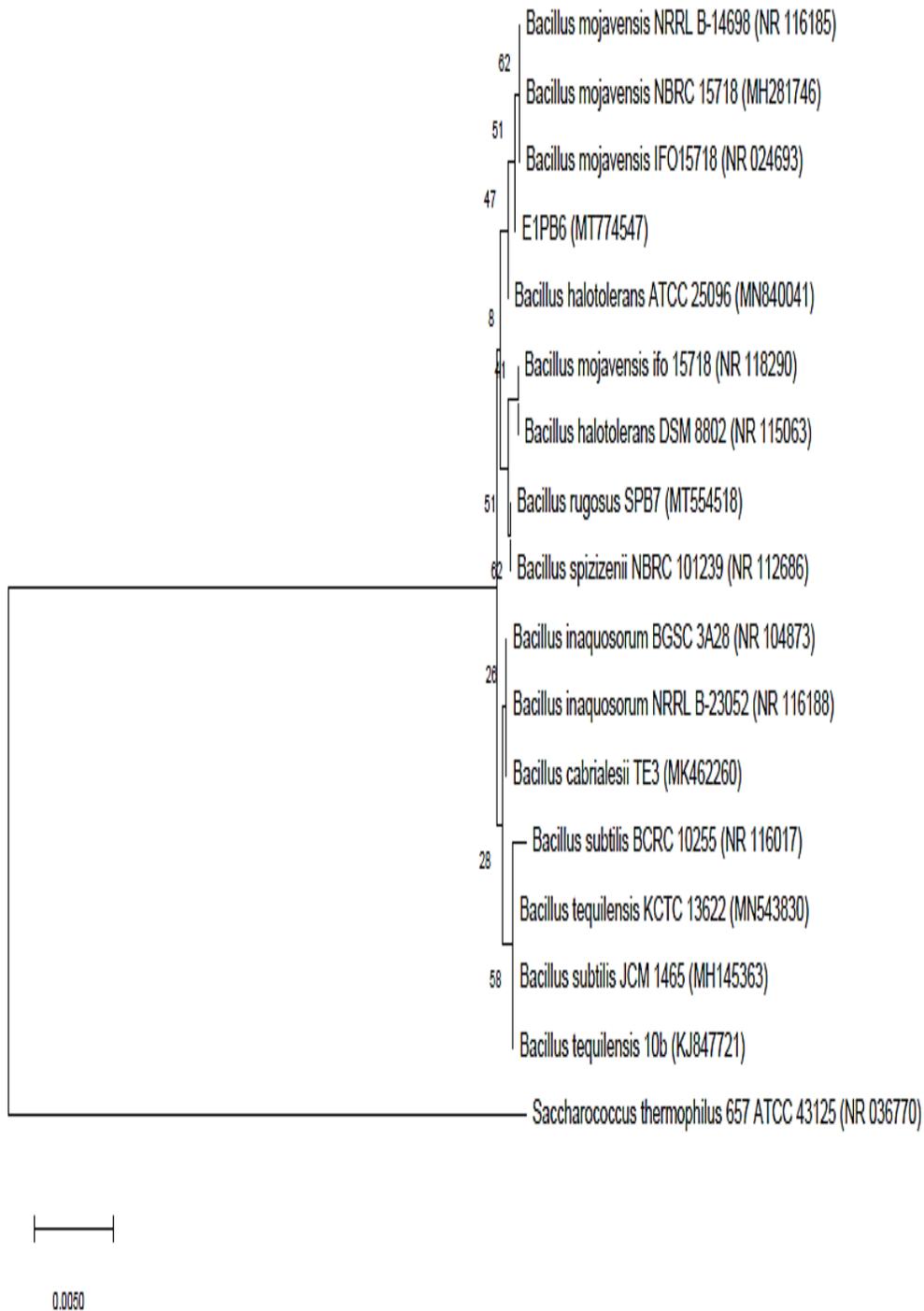
**Figure 20.** Arbre phylogénétique de la souche E1PP7 construit par la méthode « Neighbor joining » avec les valeurs de Bootstrap soutenant les branches indiquées aux nœuds. La barre indique le nombre de substitutions par site.



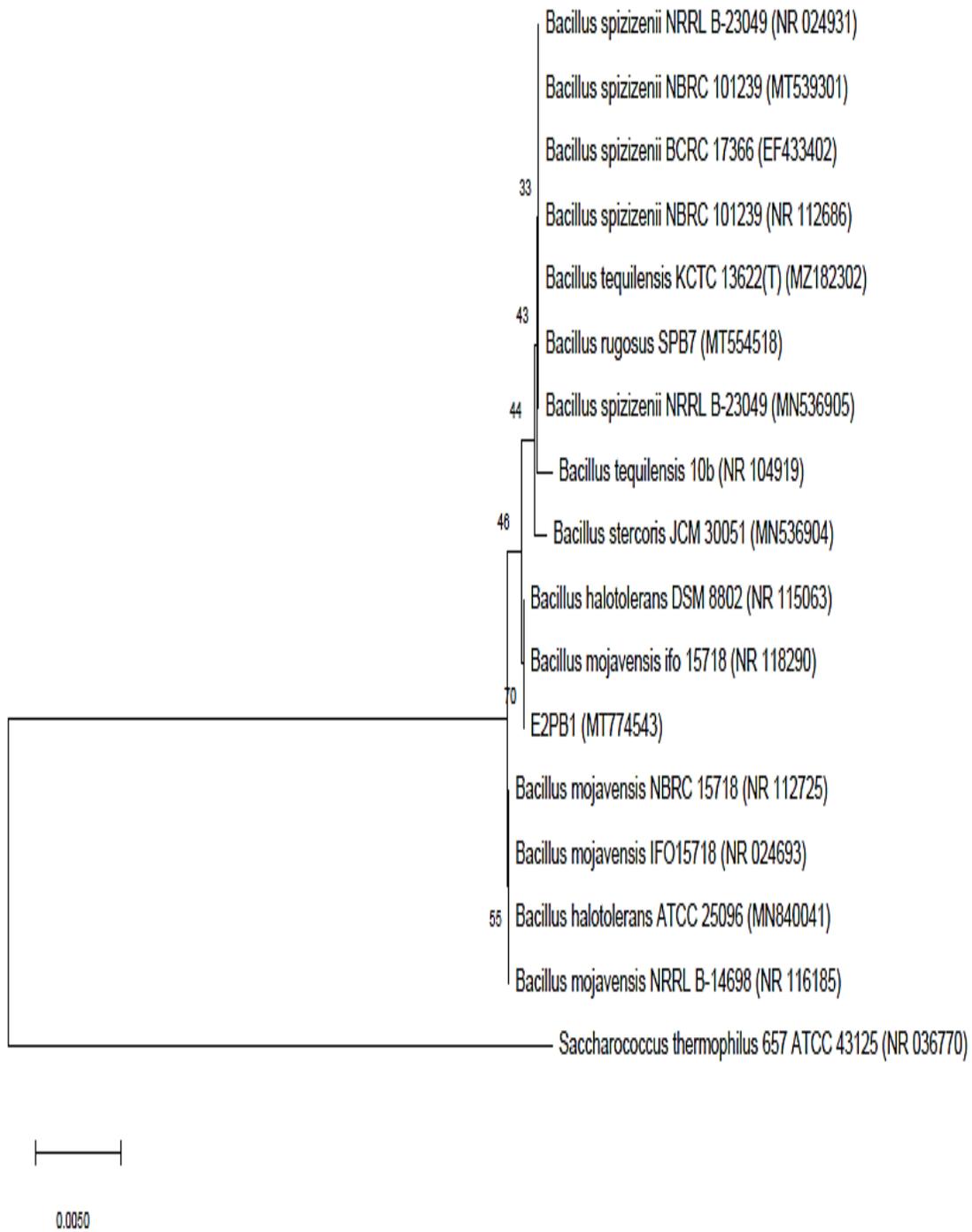
**Figure 21.** Arbre phylogénétique de la souche E1PP15 construit par la méthode « Neighbor joining » avec les valeurs de Bootstrap soutenant les branches indiquées aux nœuds. La barre indique le nombre de substitutions par site.



**Figure 22.** Arbre phylogénétique de la souche E1PB10 construit par la méthode « Neighbor joining » avec les valeurs de Bootstrap soutenant les branches indiquées aux nœuds. La barre indique le nombre de substitutions par site.



**Figure 23.** Arbre phylogénétique de la souche E1PB6 construit par la méthode « Neighbor joining » avec les valeurs de Bootstrap soutenant les branches indiquées aux nœuds. La barre indique le nombre de substitutions par site.



**Figure 24.** Arbre phylogénétique de la souche E2PB1 construit par la méthode « Neighbor joining » avec les valeurs de Bootstrap soutenant les branches indiquées aux nœuds. La barre indique le nombre de substitutions par site.

Les résultats de BLAST et l'analyse phylogénétique ont confirmé que les souches E1FP13, E1FP4, E1PP7, E1PP6, et E1PP15 appartiennent au genre *Pseudomonas*. Les isolats E1PP6, E1FP13 et E1FP4 sont étroitement liés et correspondent le mieux à *P. frederiksbergensis*; une bactérie qui est habituellement associée à la réduction du stress abiotique, comme la dégradation des pesticides (Hussaini *et al.*, 2013) et l'amélioration de la tolérance au stress froid et au stress salin (Chatterjee *et al.*, 2017). Quelques études ont été menées sur l'effet antagoniste et biofertilisateur de *P. frederiksbergensis*; une étude réalisée par Ferchichi *et al.* (2019) a révélé que *P. frederiksbergensis* LB113 était capable de produire de l'HCN et d'inhiber la croissance fongique de *Macrophomina phaseolina* et *Alternaria alternate*. *P. frederiksbergensis* PgBE39 et PgBE45 ont été signalées pour leur activité antifongique contre *Cylindrocarpon destructans* et *Botrytis cinerea* (Hong *et al.*, 2018), tandis que *P. frederiksbergensis* G62 a été signalée par Ben Zineb *et al.* (2020) pour sa capacité à produire des sidérophores, de l'HCN, et de l'AIA, et à solubiliser le phosphate. Les isolats E1PP7 et E1PP15 sont étroitement liés à deux espèces qui sont *P. soyae* et *P. granadensis*, néanmoins, les pourcentages de similarité les plus élevés ont été enregistrés avec la dernière. *P. granadensis* a été documentée pour son effet positif sur la croissance des plantes mais peu sur son effet antagoniste; la souche *P. granadensis* 100 a été signalée par Riera *et al.* (2017) pour sa capacité à produire des sidérophores, tandis que la souche *P. granadensis* PMK4 a été rapportée par Swift (2016) pour avoir produit de l'AIA, des sidérophores, et solubiliser le phosphate, de même, *P. granadensis* T6 s'est montrée positive pour la production d'AIA et la promotion de la croissance du riz (Shen *et al.*, 2019), par ailleurs, Vurukonda *et al.* (2022) ont rapporté que *P. granadensis* a réduit la gravité de la tache bactérienne et a amélioré la croissance de la tomate.

En ce qui concerne l'identification des *Bacillus*, les isolats E1PB10 et E1PB6 ont été identifiés en tant que *B. mojavensis*, cette espèce a été rapportée par récentes études pour son activité de biocontrôle; Prajakta *et al.* (2019) ont révélé que *B. mojavensis* PB 35 a significativement augmenté la LT, la LR, et le poids sec des plantes infectées par *Rhizoctonia solani*. De leur côté, Haddoudi *et al.* (2021) ont démontré que plusieurs souches de *B. mojavensis* ont réduit le flétrissement causé par *F. equiseti* et ont considérablement augmenté la LT, la LR, le PST, et le PSR des plantes infectées, par ailleurs, Diabankana *et al.* (2021) ont signalé que la souche *B. mojavensis* PS17 a inhibé la croissance fongique de plusieurs pathogènes (*F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum*, *Ascochyta pisi*, *Alternaria alternate*,

*Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*, et *Epicoccum nigrum*), elle a également produit différentes enzymes hydrolytiques tel que la chitinase, la  $\beta$ -glucanase, la cellulase, la lipase, et la protéase, de plus, elle a réduit l'intensité de la maladie chez la tomate infectée par *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Quant à l'isolat E2PB1, les résultats de l'analyse phylogénétique et BLAST ont révélé qu'il est très similaire à deux espèces ; *B. mojavensis* et *B. halotolerans*, cette dernière a également été documentée par plusieurs auteurs pour son effet de biocontrôle et de biofertilisation ; quatre souches de *B. halotolerans* (BFOA1–BFOA4) ont été caractérisées par une forte activité antagoniste envers *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora infestans*, et *Rhizoctonia bataticola* (Ben Slama *et al.*, 2019). De même l'application de *B. halotolerans* Cal.1.30 sur les raisins et les tomates cerise récoltés a significativement diminué la gravité de la moisissure grise causée par *Botrytis cinerea* (Tsalgaidou *et al.*, 2022). De leur côté, Jiménez-Gómez *et al.* (2020) ont démontré que l'application de *B. halotolerans* SCCPVE07 a augmenté la LT et le PST de la coriandre. L'analyse du gène ARNr 16S semble être insuffisante pour identifier l'espèce de l'isolat E2PB1. L'analyse d'autres gènes doit être effectuée afin de pouvoir déterminer laquelle parmi *B. mojavensis* et *B. halotolerans* est la plus similaire à E2PB1.

## *Conclusion générale*

## **Conclusion générale**

Le pois chiche occupe une place très importante parmi les aliments, et ce, grâce à sa valeur nutritionnelle très élevée. Il fait partie des principales légumineuses produites en Algérie, et il est largement consommé par la population. Le pois chiche est sujet à plusieurs maladies notamment celles d'origine fongique, le flétrissement fusarien est l'une de ses maladies les plus dévastatrices. Le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, est le champignon responsable de cette maladie, c'est un pathogène redoutable car il peut survivre dans le sol jusqu'à 6 ans même sans son hôte. Le flétrissement fusarien peut causer des pertes de rendement allant jusqu'à 100 % lorsque les conditions sont adéquates pour l'infection.

Diverses solutions ont été proposées pour tenter de minimiser les lourdes conséquences économiques du flétrissement. Parmi lesquelles, la lutte biologique qui fait l'objet de récents travaux de recherche. Cette approche consiste le plus souvent en l'utilisation de microorganismes généralement isolés à partir du sol, ils assurent un rôle protecteur face aux phytopathogènes. En biocontrôle, un groupe de bactéries s'est révélé particulièrement efficaces, il s'agit des PGPR, ce terme désigne les bactéries présentes dans la rhizosphère et qui exercent un effet positif sur la croissance des plantes. Les PGPR agissent de manière directe ou indirecte. Les mécanismes directe améliorent la nutrition de la plante en augmentant la fertilité du sol et en facilitant l'assimilation des nutriments, tandis que les mécanismes indirecte vise à inhiber la croissance et la propagation des pathogènes. Parmi les PGPR les plus connus, on distingue ceux appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus*.

Dans le présent travail, on s'est focalisé sur l'effet antagoniste des isolats *Pseudomonas*, *Bacillus* (rhizobactéries) et *S. meliloti* (bactérie symbiotique) sur le foc ainsi que leur effet promoteur de la croissance des plantes (direct et indirecte). On a commencé l'étude par l'isolement de l'agent pathogène à partir des plantes de pois chiche atteintes de fusariose. Deux souches ont été isolées, codées Foc-S1 et Foc-S2. On est ensuite passé à la recherche des agents de contrôle, 17 souches *Pseudomonas* et 23 souches *Bacillus* ont été isolées de la rhizosphère du pois chiche et évaluées *in vitro* pour leur effet antagoniste contre les isolats fongiques. Pour ce faire, deux types de traitements bactériens ont été préparés, les traitements individuels, composés d'une seule bactérie (*Pseudomonas*, *Bacillus* ou *S. meliloti*) et les consortiums, composés de deux bactéries, la première bactérie étant une *Pseudomonas* ou *Bacillus* et la deuxième étant *S.*

*meliloti*. Les résultats du test ont permis de sélectionner huit souches (trois *Bacillus* et cinq *Pseudomonas*) qui ont enregistré les meilleurs pourcentages d'inhibition. Pour la plupart de ces souches, leur effet antagoniste a été plus prononcé lorsqu'elles ont été combinées avec *S. meliloti*. L'impact de l'effet antagoniste des bactéries sur Foc a été étudié sous microscope. L'examen de la structure des hyphes a montré que toutes les bactéries ont causé des anomalies morphologiques telles que la granulation et la condensation du cytoplasme, la fragmentation et la déformation (gonflements) des hyphes.

Les huit souches et *S. meliloti* ont été évaluées pour la production de métabolites impliqués dans la promotion (directe et indirecte) de la croissance des plantes. Les résultats ont révélé que les bactéries ont pu produire plusieurs composés tels que l'HCN, l'AIA, l'ammoniac, les siderophores, l' $\alpha$ -amylase, la lipase, la protéase, la cellulase, et la chitinase, elles se sont également montrées positives pour la solubilisation du phosphate. L'effet des bactéries sur la croissance du pois chiche a été évalué individuellement et en consortium avec *S. meliloti*. Les résultats de l'expérience ont montré que tous les traitements bactériens ont pu augmenter de manière significative la croissance des plantes de pois chiche.

L'évaluation de la capacité des traitements bactériens à contrôler la fusariose du pois chiche a révélé que la gravité de la maladie (GM) a été significativement plus faible chez les plantes traitées en comparaison avec les plantes non traitées (témoins). Les pourcentages de réduction de la maladie (RM) les plus élevés ont été obtenus avec les plantes traitées par les consortiums. L'effet des traitements bactériens sur la croissance des plantes atteintes de fusariose a également été mesuré, les résultats ont révélé qu'une amélioration significative des paramètres de croissance a été observée avec tous les traitements par rapport aux témoins non traités.

L'appartenance des souches aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* a été confirmée à travers le séquençage du gène ARNr 16S et l'analyse phylogénétique. Les souches *Pseudomonas* ont montré une similarité élevée avec deux espèces, qui sont *P. frederiksbergensis* et *P. granadensis*. Les souches *Bacillus* ont également montré une similarité élevée avec deux espèces qui sont *B. mojavensis* et *B. halotolerans*.

Cette étude conclut que l'utilisation des souches *Pseudomonas* et *Bacillus* (individuellement et en consortiums avec *S. meliloti*) comme traitements de semence peut réduire de manière significative le flétrissement fusarien et améliorer la croissance des plantes de pois chiche.

Ce travail constitue un premier pas dans la quête de la lutte biologique contre le flétrissement fusarien du pois chiche. Les souches étudiées ont le potentiel d'être utilisées comme agents de biocontrôle et comme biofertilisateurs, cependant, des études supplémentaires doivent être menées afin de confirmer leur efficacité. Il serait opportun de prévoir d'une part, l'évaluation de l'effet des bactéries sur la fusariose dans le champ, et d'autre part d'étudier leur effet sur la population microbienne indigène présente dans le champ. À l'avenir, il serait intéressant d'étudier la capacité des souches à contrôler le Foc dans différentes conditions de stress, comme le froid, les sols à forte salinité et les sols pollués par des pesticides, et de tester leur effet individuel et en consortium avec d'autres bactéries contre le Foc et d'autres phytopathogènes.

## *Références bibliographiques*

**Références bibliographiques**

- Abd-Alla, M. H., Morsy, F. M., El-Enany, A.-W. E. et Ohyama, T. (2012). Isolation and characterization of a heavy-metal-resistant isolate of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* potentially applicable for biosorption of Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>. *International biodeterioration & biodegradation*, 67, 48-55.
- Abed, H., Rouag, N., Mouatassef, D. et Rouabhi, A. (2016). Screening for *Pseudomonas* and *Bacillus* antagonistic rhizobacteria strains for the biocontrol of Fusarium wilt of chickpea. *Eurasian Journal of Soil Science*, 5(3), 182-191.
- Ahemad, M., Zaidi, A., Khan, M. S. et Oves, M. (2009). Biological importance of phosphorus and phosphate solubilizing microbes—An overview. Dans *Phosphate Solubilising Microbes for Crop Improvement* (p. 1-14). Nova Science.
- Ahmad, M. A., Iqbal, S. M., Ayub, N., Ahmad, Y. et Akram, A. (2010). Identification of resistant sources in chickpea against Fusarium wilt. *Pakistan Journal of Botany*, 42(1), 417-426.
- Akhtar, M. S. et Siddiqui, Z. A. (2007). Biocontrol of a chickpea root-rot disease complex with *Glomus intraradices*, *Pseudomonas putida* and *Paenibacillus polymyxa*. *Australasian Plant Pathology*, 36(2), 175-180.
- Al-Ghafri, H. M., Velazhahan, R., Shahid, M. S. et Al-Sadi, A. M. (2020). Antagonistic activity of *Pseudomonas aeruginosa* from compost against *Pythium aphanidermatum* and *Fusarium solani*. *Biocontrol Science and Technology*, 30(7), 642-658.
- Allito, B. B., Nana, E.-M. et Alemneh, A. A. (2015). Rhizobia strain and legume genome interaction effects on nitrogen fixation and yield of grain legume: a review. *Molecular Soil Biology*, 6(4), 1-12.
- Allouche, N., Damak, M., Ellouz, R. et Sayadi, S. (2004). Use of whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol via conversion of tyrosol. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2105-2109.
- Alves, L. M. C., De Souza, J. A. M., Varani, A. de M. et Lemos, E. G. de M. (2014). The family *Rhizobiaceae*. Dans *The Prokaryotes – Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* (p. 419-437). Springer.

- Anand, A., Chinchilla, D., Tan, C., Mène-Saffrané, L., L'Haridon, F. et Weisskopf, L. (2020). Contribution of hydrogen cyanide to the antagonistic activity of *Pseudomonas* strains against *Phytophthora infestans*. *Microorganisms*, 8(8), 1144-1154.
- Anayo, O. F., Scholastica, E. C., Peter, O. C., Nneji, U. G., Obinna, A. et Mistura, L. O. (2019). The Beneficial Roles of *Pseudomonas* in Medicine, Industries, and Environment: A Review. Dans *Pseudomonas Aeruginosa-An Armory Within* (p. 1-13). IntechOpen.
- Andrabi, M., Vaid, A. et Razdan, V. (2011). Evaluation of different measures to control wilt causing pathogens in chickpea. *Journal of plant protection research*, 51(1), 55-59.
- Andrade, G., De Leij, F. et Lynch, J. M. (1998). Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea. *Letters in Applied Microbiology*, 26(4), 311-316.
- Anjaiah, V., Cornelis, P. et Koedam, N. (2003). Effect of genotype and root colonization in biological control of Fusarium wilts in pigeonpea and chickpea by *Pseudomonas aeruginosa* PNA1. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(2), 85-91.
- Anusha, B. G., Gopalakrishnan, S., Naik, M. K. et Sharma, M. (2019). Evaluation of *Streptomyces* spp. and *Bacillus* spp. for biocontrol of Fusarium wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 52(5-6), 417-442.
- Arfaoui, A., El Hadrami, A., Mabrouk, Y., Sifi, B., Boudabous, A., El Hadrami, I., Daayf, F. et Chérif, M. (2007). Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(6-7), 470-479.
- Arfaoui, A., Sifi, B., Boudabous, A., El Hadrami, I. et Cherif, M. (2006). Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the causal agent of Fusarium wilt of chickpea. *Journal of Plant Pathology*, 88(1), 67-75.
- Arfaoui, A., Sifi, B., El Hassni, M., El Hadrami, I., Boudabbous, A. et Chérif, M. (2005). Biochemical analysis of chickpea protection against Fusarium wilt afforded by two *Rhizobium* isolates. *Plant Pathology Journal*, 4(1), 35-42.

- Arora, N. K., Khare, E., Oh, J. H., Kang, S. C. et Maheshwari, D. K. (2008). Diverse mechanisms adopted by fluorescent *Pseudomonas* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(4), 581-585.
- Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. et Momenbeik, F. (2011). Use of growing cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the natural vanillin via conversion of isoeugenol. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10(4), 749-757.
- Aslam, M., Mahmood, I. A., Peoples, M. B., Schwenke, G. D. et Herridge, D. F. (2003). Contribution of chickpea nitrogen fixation to increased wheat production and soil organic fertility in rain-fed cropping. *Biology and fertility of soils*, 38(1), 59-64.
- Asrat, Z. (2017). Significance and management of chickpea wilt/root rot and future prospects in Ethiopia. A review. *International Journal of Life Sciences*, 5(1), 117-126.
- Attia, M. S., El-Sayyad, G. S., Abd Elkodous, M. et El-Batal, A. I. (2020). The effective antagonistic potential of plant growth-promoting rhizobacteria against *Alternaria solani*-causing early blight disease in tomato plant. *Scientia Horticulturae*, 266, 109289.
- Bacon, C. W., Porter, J. K., Norred, W. P. et Leslie, J. F. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), 4039-4043.
- Baghaee Ravari, S. et Heidarzadeh, N. (2014). Isolation and characterization of rhizosphere auxin producing *Bacilli* and evaluation of their potency on wheat growth improvement. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(7), 895-905.
- Bakker, A. W. et Schippers, B. (1987). Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(4), 451-457.
- Barka, E. A., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J.-C. et Belarbi, A. (2002). Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*, 24(2), 135-142.
- Bashir, M. et Malik, B. A. (1988). Diseases of major pulse crops in Pakistan—a review. *International Journal of Pest Management*, 34(3), 309-314.
- Batnini, M., Lopez-Gomez, M., Palma, F., Haddoudi, I., Kallala, N., Zribi, K., Mrabet, M. et Mhadhbi, H. (2020). *Sinorhizobium* spp inoculation alleviates the effect of *Fusarium*

- oxysporum* on *Medicago truncatula* plants by increasing antioxidant capacity and sucrose accumulation. *Applied Soil Ecology*, 150, 103458.
- Bekkar, A.A. (2007). *Variabilité de la morphologie et du pouvoir pathogène chez Fusarium oxysporum Schelcht.Emend. Snyder. f.sp. ciceri (Padwick), agent du flétrissement vasculaire du pois chiche (Cicer arietinum L)* [magister]. Université de Maascar, Mostapha Istamboli, Algérie.
- Bekkar, A. A., Zaim, S. et Belabid, L. (2018). Induction of systemic resistance in chickpea against *Fusarium* wilt by *Bacillus* strains. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(1-2), 70-80.
- Bektas, I. et Kusek, M. (2021). Biological control of onion basal rot disease using phosphate solubilising rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*, 31(2), 190-205.
- Belaid, D. (2018). *Algérie: Autosuffisance en légumes secs* ( [Brochure]).
- Ben Khedher, S. B., Mejdoub-Trabelsi, B. et Tounsi, S. (2021). Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control*, 152, 104444.
- Ben Mbarek, K., Boujelben, A., Hannachi, C. et Boubaker, M. (2011). Evaluation des besoins hydriques d'une culture de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) de printemps dans une zone semi-aride. *Revue des Régions Arides*, (25), 35-53.
- Ben Slama, H., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Qader, M., Silini, A., Yahiaoui, B., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Triki, M. A. et Vallat, A. (2019). Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Frontiers in microbiology*, 9, 3236.
- Ben Zineb, A., Trabelsi, D., Ayachi, I., Barhoumi, F., Aroca, R. et Mhamdi, R. (2020). Inoculation with elite strains of phosphate-solubilizing bacteria enhances the effectiveness of fertilization with rock phosphates. *Geomicrobiology Journal*, 37(1), 22-30.
- Beyene, S., Berhanu, W., Endalkachew, A., Meskel, W., Assefa, M., Hidoto, L., Tena, W., Dedefo, T., Ayana, R. et Fikre, A. (2015). *Chickpea (Cicer arietinum L.) production in the Southern Nations, Nationalities, and Peoples' Region of Ethiopia*. University of Saskatchewan, Canada.

- Bhattacharyya, C., Banerjee, S., Acharya, U., Mitra, A., Mallick, I., Haldar, A., Haldar, S., Ghosh, A. et Ghosh, A. (2020). Evaluation of plant growth promotion properties and induction of antioxidative defense mechanism by tea rhizobacteria of Darjeeling, India. *Scientific reports*, 10(1), 1-19.
- Bhattacharyya, P. N. et Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Bolandnazar, S., Sharghi, A., Badhi, H. N., Mehrafarin, A. et Sarikhani, M. R. (2018). The impact of *Sinorhizobium meliloti* and *Pseudomonas fluorescens* on growth, seed yield and biochemical product of fenugreek under water deficit stress. *Advances in Horticultural Science*, 32(1), 19-26.
- Bouznad, Z., Solh, M., Rouibah, M., Si Hassan, A. et Stasaid, A. (1992). *Fusarium wilt of chickpea caused by Fusarium oxysporum f.sp. ciceri in Algeria: characterization of some strains genetic resistance*. 1ere Conférence Européenne sur les protéagineux (p. 371-372).
- Breed, R. S., Murray, E. G. D. et Hitchens, A. P. (1948). *Bacillaceae* Fischer. Dans *Bergey's manual of determinative bacteriology* (Sixth, p. 704-762). Williams & Wilkins Company.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R. et Staley, J. T. (dir.). (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. Springer New York, NY.
- Bric, J. M., Bostock, R. M. et Silverstone, S. E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and environmental Microbiology*, 57(2), 535-538.
- Cappuccino, J., C. et Sherman, N. (1992). *Microbiology: A Laboratory Manual* (Third edition). Benjamin cummings Pub Co.
- Cardozo, V. F., Oliveira, A. G., Nishio, E. K., Perugini, M. R., Andrade, C. G., Silveira, W. D., Durán, N., Andrade, G., Kobayashi, R. K. et Nakazato, G. (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 12(1), 1-8.
- Castaldi, S., Petrillo, C., Donadio, G., Piaz, F. D., Cimmino, A., Masi, M., Evidente, A. et Isticato, R. (2021). Plant growth promotion function of *Bacillus* sp. strains isolated from salt-pan rhizosphere and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina*. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3324.
- Chafika, H., Nsarellah, N., Keltoum, E., Said, M. et Udupa, S. (2014). Effet du stress hydrique sur les critères physiologiques et biochimiques chez neuf géotypes de pois chiche (*Cicer arietinum* L.). *Nature et Technologie*, 6(2), 8-16.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B. et Basnet, M. (2006). Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal of basic microbiology*, 46(3), 186-195.
- Chand, H. et Khirbat, S. K. (2009). Chickpea wilt and its management—A review. *Agricultural Reviews*, 30(1), 1-12.
- Chatterjee, P., Samaddar, S., Anandham, R., Kang, Y., Kim, K., Selvakumar, G. et Sa, T. (2017). Beneficial soil bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* OS261 augments salt tolerance and promotes red pepper plant growth. *Frontiers in plant science*, 8(705), 1-9.
- Chauhan, Y. S., Nene, Y. L., Johansen, C., Haware, M. P., Saxena, N. P., Singh, S., Sharma, S. B., Sahrawat, K. L., Burford, J. R. et Rupela, O. P. (1988). *Effects of Soil Solarization on Pigeonpea and Chickpea. Information Bulletin No. 11*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Chavan, J. K., Kadam, S. S. et Salunkhe, D. K. (1989). Chickpea. Dans D. K. Salunkhe et S. S. Kadam (dir.), *Handbook of world food legumes: nutritional chemistry, processing technology and utilization* (Vol 1, p. 247-288). CRC, Boca Raton.
- Chen, W., Sharma, H. C. et Muehlbauer, F. J. (2011). Infectious diseases. Dans *Compendium of chickpea and lentil diseases and pests*. (p. 6-98). American Phytopathological Society (APS Press).
- Chiranjeevi, N., Kumar, M. R., Padmodaya, B., Venkateswarlu, N. C., Sudhakar, P., Devi, R. S. J. et Sri, P. A. (2021). Studies on extraction, evaluation of crude metabolite extract from endophytic *Bacillus subtilis* and its mechanistic effect on chickpea dry root rot causing

- pathogen *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler. *The Pharma Innovation Journal*, 10(5), 898-905.
- Choubane, S., Cheba, B. A. et Benourrad, A. (2016). Screening and phenotypic diversity of amylase producing rhizospheric bacteria from some North African plants. *Procedia Technology*, 22, 1197-1204.
- Choure, K. et Dubey, R. C. (2012). Development of plant growth promoting microbial consortium based on interaction studies to reduce wilt incidence in *Cajanus cajan* L. var. Manak. *World Journal of Agricultural Sciences*, 8(1), 118-128.
- Clarke, H. J. et Siddique, K. H. M. (2004). Response of chickpea genotypes to low temperature stress during reproductive development. *Field Crops Research*, 90(2-3), 323-334.
- Colwell, R. R., Citarella, R. V. et Ryman, I. (1965). Deoxyribonucleic acid base composition and Adansonian analysis of heterotrophic aerobic pseudomonads. *Journal of bacteriology*, 90(4), 1148-1149.
- Contesini, F. J., De Melo, R. R. et Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical reviews in Biotechnology*, 38(3), 321-334.
- Correll, J. C. (1991). The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 81(9), 1061-1064.
- Cote, C. K., Heffron, J. D., Bozue, J. A. et Welkos, S. L. (2015). *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species. Dans *Molecular medical microbiology* (p. 1789-1844). Elsevier.
- Cowan, S. T. et Steel, K. J. (1961). Diagnostic tables for the common medical bacteria. *Epidemiology & Infection*, 59(3), 357-373.
- Cubero, J. I. (1994). Variétés traditionnelles de légumineuses à grains pour l'alimentation humaines. Dans *Cultures marginalisées 1492: une autre perspective* (p. 301-314). Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).
- Cunnington, J., Lindbeck, K. et Jones, R. H. (2016). National diagnostic protocol for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Subcommittee on Plant Health Diagnostics.
- Das, K., Rajawat, M. V. S., Saxena, A. K. et Prasanna, R. (2017). Development of *Mesorhizobium ciceri*-based biofilms and analyses of their antifungal and plant growth promoting activity in chickpea challenged by *Fusarium* wilt. *Indian journal of microbiology*, 57(1), 48-59.

- Datta, A., Sindel, B. M., Kristiansen, P., Jessop, R. S. et Felton, W. L. (2008). The effect of soil pH on chickpea (*Cicer arietinum*) genotype sensitivity to isoxaflutole. *Plant and soil*, 303(1-2), 49-54.
- De Ley, J. et Rassel, A. (1965). DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*. *Microbiology*, 41(1), 85-92.
- De Wulf, P. et Vandamme, E. J. (1997). Production of D-ribose by fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(2), 141-148.
- Derbyshire, E., Wright, D. J. et Boulter, D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, 15(1), 3-24.
- Dewi, R. T. K., Mubarik, N. R. et Suhartono, M. T. (2016). Medium optimization of  $\beta$ -glucanase production by *Bacillus subtilis* SAHA 32.6 used as biological control of oil palm pathogen. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(2), 116-125.
- Dharni, S., Maurya, A., Samad, A., Srivastava, S. K., Sharma, A. et Patra, D. D. (2014). Purification, characterization, and *in vitro* activity of 2, 4-di-tert-butylphenol from *Pseudomonas monteilii* PsF84: conformational and molecular docking studies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(26), 6138-6146.
- Di Francesco, A. et Baraldi, E. (2021). How siderophore production can influence the biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* against *Monilinia laxa* on peaches. *Biological Control*, 152, 104456.
- Diabankana, R. G. C., Afordoanyi, D. M., Safin, R. I., Nizamov, R. M., Karimova, L. Z. et Validov, S. Z. (2021). Antifungal properties, abiotic stress resistance, and biocontrol ability of *Bacillus mojavensis* PS17. *Current Microbiology*, 78(8), 3124-3132.
- Dilantha Fernando, W. G. et Linderman, R. G. (1995). Inhibition of *Phytophthora vignae* and stem and root rot of cowpea by soil bacteria. *Biological Agriculture & Horticulture*, 12(1), 1-14.
- Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology reviews*, 6(4), 324-338.
- Duke, J. A. (1981). *Handbook of legumes of world economic importance*. Springer US.

- Dupraz, C. (2009). *Evaluation de l'aptitude du pois chiche à la compétition avec un peuplement de noyers agroforestiers. Approche expérimentale*. Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA).
- Edel-Hermann, V. et Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*, 109(4), 512-530.
- Ehteshamul-Haque, S. et Ghaffar, A. (1993). Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean. *Journal of phytopathology*, 138(2), 157-163.
- El aoufir, A. (2001). *Etude du flétrissement vasculaire du pois chiche (Cicer arietinum) causé par le Fusarium oxysporum f.sp. ciceris. Evaluation de la variabilité de l'analyse isoenzymatique et de la compatibilité végétative pour la caractérisation des races physiologiques* [doctorat]. Université Lava.
- Elias, K. S. et Schneider, R. W. (1991). Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology*, 81(2), 159-162.
- Ellis, R. H., Covell, S., Roberts, E. H. et Summerfield, R. J. (1986). The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes: II. Intraspecific variation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) at constant temperatures. *Journal of Experimental Botany*, 37(183), 1503-1515.
- Erdogan, O. et Benlioglu, K. (2010). Biological control of Verticillium wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biological Control*, 53(1), 39-45.
- Etebarian, H. R., Sholberg, P. L., Eastwell, K. C. et Sayler, R. J. (2005). Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(7), 591-598.
- Fabre, C. (2008). *Fiche technique: Pois chiche*. Chambre d'Agriculture de l'Hérault.
- FAOSTAT. (2020). <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/QCL>
- Ferchichi, N., Toukabri, W., Boularess, M., Smaoui, A., Mhamdi, R. et Trabelsi, D. (2019). Isolation, identification and plant growth promotion ability of endophytic bacteria associated with lupine root nodule grown in Tunisian soil. *Archives of microbiology*, 201(10), 1333-1349.

- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J. et Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, 285, 44-55.
- Fleury, D. (2016). Seeding Tips for Chickpeas. Saskatchewan pulse growers.
- Fravel, D., Olivain, C. et Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New phytologist*, 157(3), 493-502.
- Fritze, D. (2004). Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, 94(11), 1245-1248.
- Garibaldi, A., Gilardi, G. et Gullino, M. L. (2004). Seed transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Phytoparasitica*, 32(1), 61-65.
- Gaur, P. M., Tripathi, S., Gowda, C. L., Ranga Rao, G. V., Sharma, H. C., Pande, S. et Sharma, M. (2010). *Chickpea seed production manual*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT).
- Gaurav, A. et Pallavi, K. P. (2020). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and physiological parameters in chickpea. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(6), 29-34.
- Ghribi, A. M., Maklouf, I., Blecker, C., Attia, H. et Besbes, S. (2015). Nutritional and compositional study of Desi and Kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) flours from Tunisian cultivars. *Advances in Food Technolgy and Nutritional Science*, 1(2), 38-47.
- Gil, J., Nadal, S., Luna, D., Moreno, M. T. et De Haro, A. (1996). Variability of some physico-chemical characters in Desi and Kabuli chickpea types. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71(2), 179-184.
- Giorgio, A., De Stradis, A., Lo Cantore, P. et Iacobellis, N. S. (2015). Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Microbiology*, 6(1056), 1-13.
- Golakiya, B. B., Bhimani, M. D. et Akbari, L. F. (2018). Efficacy of different fungicides for the management of chickpea wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*). *International Journal of Chemical Studies*, 6(2), 199-205.
- Gong, A. D., Li, H. P., Yuan, Q. S., Song, X. S., Yao, W., He, W. J., Zhang, J. B. et Liao, Y. C. (2015). Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus*

- amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PloS one*, 10(2), e0116871.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L. et Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 5(4), 355-377.
- Gopalakrishnan, S. et Srinivas, V. (2019). Management of soil-borne diseases of grain legumes through broad-spectrum actinomycetes having plant growth-promoting and biocontrol traits. Dans A. Varma, S. Tripathi et R. Prasad (dir.), *Plant microbe interface* (p. 129-144). Springer.
- Gordon, R. E., Haynes, W. C. et Pang, C. H. N. (1973). *The genus Bacillus*. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
- Gordon, T. R. et Martyn, R. D. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual review of phytopathology*, 35(1), 111-128.
- Gou, J. Y., Suo, S. Z., Shao, K. Z., Zhao, Q., Yao, D., Li, H. P., Zhang, J. L. et Rensing, C. (2020). Biofertilizers with beneficial rhizobacteria improved plant growth and yield in chili (*Capsicum annuum* L.). *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(6), 1-12.
- Gowsalya, A., Ponnusami, V. et Sugumaran, K. R. (2014). Isolation of bacteria from soil sample for exo-polysaccharide production. *International journal of chemTech research*, 6(5), 2925-2928.
- Graham, P. H. (1964). The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *Microbiology*, 35(3), 511-517.
- Gu, Q., Yang, Y., Yuan, Q., Shi, G., Wu, L., Lou, Z., Huo, R., Wu, H., Borriss, R. et Gao, X. (2017). Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Applied and environmental Microbiology*, 83(19), e01075-17.
- Guiñazú, L. B., Andrés, J. A., Del Papa, M. F., Pistorio, M. et Rosas, S. B. (2010). Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. *Biology and fertility of soils*, 46(2), 185-190.

- Haddoudi, I., Cabrefiga, J., Mora, I., Mhadhbi, H., Montesinos, E. et Mrabet, M. (2021). Biological control of Fusarium wilt caused by *Fusarium equiseti* in *Vicia faba* with broad spectrum antifungal plant-associated *Bacillus* spp. *Biological Control*, 160, 104671.
- Hajlaoui, H., Denden, M. et Bouslama, M. (2007). Etude de la variabilité intraspécifique de tolérance au stress salin du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) au stade germination. *Tropicultura*, 25(3), 168-173.
- Halila, M. H. et Harrabi, M. (1990). Breeding for dual resistance to *Ascochyta* and wilt diseases in chickpea. *Options Méditerranéennes-Série Séminaires*, 9, 163-166.
- Hall, R. (2008). Soil pH. Dans *Soil essentials: Managing your farm's primary assets* (p. 7-12). Land Links Press.
- Harveson, R. M. (2011). Soilborne root diseases of chickpeas in Nebraska. Neb guide –Lincoln Extension.
- Harwood, C. R. (1989). Introduction to the Biotechnology of *Bacillus*. Dans *Bacillus* (p. 1-4). Springer.
- Hassan, N., Shimizu, M. et Hyakumachi, M. (2014). Occurrence of root rot and vascular wilt diseases in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Upper Egypt. *Mycobiology*, 42(1), 66-72.
- Haware, M. P., Jiménez-Díaz, R. M., Amin, K. S., Phillips, J. C. et Halila, H. (1990). *Integrated management of wilt and root rots of chickpea*. Chickpea Improvement, India (p. 129-134).
- Haware, M. P. et Nene, Y. L. (1982). Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Plant disease*, 66(9), 809-810.
- Haware, M. P., Nene, Y. L., Pundir, R. P. S. et Rao, J. N. (1992). Screening of world chickpea germplasm for resistance to Fusarium wilt. *Field Crops Research*, 30(1-2), 147-154.
- Hayes, W. J. et Laws, E. R. (1991). *Handbook of Pesticide Toxicology* (vol. 1). Academic Press Inc.
- Hazarika, D. J., Goswami, G., Gautam, T., Parveen, A., Das, P., Barooah, M. et Boro, R. C. (2019). Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. *BMC microbiology*, 19(1), 1-13.
- Hazelton, P. et Murphy, B. (2016). Soil chemical properties. Dans *Interpreting soil test results: What do all the numbers mean?* (p. 73-124). CSIRO Publishing.

- Henni, J., Boisson, C. et Geiger, J. P. (1994). Variabilité de la morphologie chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathologia mediterranea*, 33(1), 51-58.
- Hernandez-Hernandez, L., Coutino-Megchun, J. T., Rincon-Molina, C. I., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Culebro-Ricaldi, J. M., Cruz-Rodriguez, R. I., Palomeque-Dominguez, H. H. et Rincon-Rosales, R. (2018). Endophytic bacteria from root nodules of *Ormosia macrocalyx* with potential as plant growth promoters and antifungal activity. *Journal of Environmental Biology*, 39(6), 997-1005.
- Hong, C. E., Kim, J. U., Lee, J. W., Lee, S. W. et Jo, I. H. (2018). Diversity of bacterial endophytes in *Panax ginseng* and their protective effects against pathogens. *3 Biotech*, 8(397), 1-7.
- Hossain, M. M., Hossain, N., Sultana, F., Islam, S. M. N., Islam, M. S. et Bhuiyan, M. K. A. (2013). Integrated management of Fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with microbial antagonist, botanical extract sp. *ciceris* with microbial antagonist, botanical extract. *African Journal of Biotechnology*, 12(29), 4699-4706.
- Hossain, Z. (2014). *Pseudomonas*. Dans *Bacteria* (p. 490-501). Elsevier.
- Hu, Q. P. et Xu, J. G. (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*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(25), 4321-4327.
- Hussain, T., Roohi, A., Munir, S., Ahmed, I., Khan, J., Edel-Hermann, V., Kim, K. Y. et Anees, M. (2013). Biochemical characterization and identification of bacterial strains isolated from drinking water sources of Kohat, Pakistan. *African Journal of Microbiology Research*, 7(16), 1579-1590.
- Hussaini, S. Z., Shaker, M. et Iqbal, M. A. (2013). Isolation of bacterial for degradation of selected pesticides. *Advances in Bioresearch*, 4(3), 82-85.
- Imtiaz, M., Malhotra, R. S. et Yadav, S. S. (2011). Genetic Adjustment to Changing Climates: Chickpea. Dans *Crop Adaptation to Climate Change* (1<sup>re</sup> éd., p. 1-18). Wiley-Blackwell.
- Inam-ul-Haq, M., Javed, M., Ahmad, R. et 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), 65-74.

- Irfan-Maqsood, M. et Seddiq-Shams, M. (2014). Rhamnolipids: well-characterized glycolipids with potential broad applicability as biosurfactants. *Industrial Biotechnology*, 10(4), 285-291.
- Jabborova, D., Enakiev, Y., Sulaymanov, K., Kadirova, D., Ali, A. et Annapurna, K. (2021). Plant growth promoting bacteria *Bacillus subtilis* promote growth and physiological parameters of *Zingiber officinale* Roscoe. *Plant Science Today*, 8(1), 66-71.
- Jalali, B. L. et Chand, H. (1992). Chickpea wilt. Dans *Plant diseases of international importance* (vol. 1, p. 429-444). Prentice Hall.
- Jamali, H., Sharma, A., Kushwaha, P., Roohi, P. L. K. et Srivastava, A. K. (2018). Exploitation of multifarious abiotic stresses, antagonistic activity and plant growth promoting attributes of *Bacillus amyloliquefaciens* AH53 for sustainable agriculture production. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(10), 751-763.
- Jia, P. (2015, 20 août). *Pseudomonas fluorescens* cgmcc# 5974 and its application thereof. Google Patents.
- Jimenez-Diaz, R. M., Alcalá-Jimenez, A., Hervás, A. et Trapero-Casas, J. L. (1993). Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*-*Cicer arietinum* pathosystem. *Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo*, 37(3), 87-94.
- Jiménez-Díaz, R. M., Castillo, P., Jiménez-Gasco, M. D. M., Landa, B. B. et Navas-Cortés, J. A. (2015). Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Protection*, 73, 16-27.
- Jiménez-Díaz, R. M., Singh, K. B., Trapero-Casas, A. et Trapero-Casas, J. L. (1991). Resistance in kabuli chickpeas to Fusarium wilt. *Plant disease*, 75(9), 914-918.
- Jimenez-Diaz, R. M., Trapero-Casas, A. et Trapero-Casas, J. L. (2013). The use of host resistance to control Fusarium wilt of Kabuli chickpeas. Dans *Biological control of plant diseases: Progress and challenges for the future* (vol. 230, p. 359-362). Springer Science & Business Media.
- Jiménez-Gasco, M. D. M. et Jiménez-Díaz, R. M. (2003). Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology*, 93(2), 200-209.

- Jiménez-Gasco, M. D. M., Milgroom, M. G. et Jiménez-Díaz, R. M. (2004). Stepwise evolution of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* inferred from fingerprinting with repetitive DNA sequences. *Phytopathology*, 94(3), 228-235.
- Jiménez-Gasco, M. D. M., Pérez-Artés, E. et Jiménez-Díaz, R. M. (2001). Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *European Journal of Plant Pathology*, 107(2), 237-248.
- Jiménez-Gasco, M., Navas-Cortés, J. A. et Jiménez-Díaz, R. M. (2004). The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *International Microbiology*, 7(2), 95-104.
- Jiménez-Gómez, A., García-Estévez, I., García-Fraile, P., Escribano-Bailón, M. T. et Rivas, R. (2020). Increase in phenolic compounds of *Coriandrum sativum* L. after the application of a *Bacillus halotolerans* biofertilizer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2742-2749.
- Joshi, D., Chandra, R., Suyal, D. C. et Kumar, S. (2019). Impacts of bioinoculants *Pseudomonas jessenii* MP1 and *Rhodococcus qingshengii* S10107 on chickpea (*Cicer arietinum* L.) yield and soil nitrogen status. *Pedosphere*, 29(3), 388-399.
- Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L. et Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British Journal of Nutrition*, 108(1), 11-26.
- Kaiser, W. J., Alcalá-Jiménez, A. R., Hervás-Vargas, A., Trapero-Casas, J. L. et Jiménez-Díaz, R. M. (1994). Screening of wild *Cicer* species for resistance to races 0 to 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant disease*, 78, 962-967.
- Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019, 1-7.
- Kalita, P. J. et Ram, R. M. (2019). Industrial Applications of *Pseudomonas fluorescens*: A Patent Survey. Dans *Intellectual Property Issues in Microbiology* (p. 383-402). Springer.

- Kannan, K., Shubinaya, N. et Umamaheswari, M. (2019). Control of Fusarium wilt disease in cowpea plant (*Vigna Unguiculata* L.). using secondary metabolites produced in *Bradyrhizobium japonicum*. *Kongunadu Research Journal*, 6(2), 28-36.
- Karimi, K., Amini, J., Harighi, B. et Bahramnejad, B. (2012). Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against Fusarium wilt of chickpea. *Australian Journal of Crop Science*, 6(4), 695-703.
- Kaur, R., Singh, R. S. et Alabouvette, C. (2007). Antagonistic activity of selected isolates of fluorescent *Pseudomonas* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6(3), 446-454.
- Keote, G. A., Reddy, M. S. P., Kumar, A. et Wasnikar, A. R. (2019). Bio-inoculants against chickpea wilt incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4), 1590-1594.
- Khan, M. I., Afzal, M. J., Bashir, S., Naveed, M., Anum, S., Cheema, S. A., Wakeel, A., Sanaullah, M., Ali, M. H. et Chen, Z. (2021). Improving nutrient uptake, growth, yield and protein content in chickpea by the co-addition of phosphorus fertilizers, organic manures, and *Bacillus* sp. Mn-54. *Agronomy*, 11(3), 436.
- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Sanders, E. R., Kaplan, D. et Hirsch, A. M. (2018). Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2363.
- Khatiwada, P., Ahmed, J., Sohag, M. H., Islam, K. et Azad, A. K. (2016). Isolation, screening and characterization of cellulase producing bacterial isolates from municipal solid wastes and rice straw wastes. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 6(4), 280-284.
- Kim, M. J., Radhakrishnan, R., Kang, S. M., You, Y. H., Jeong, E. J., Kim, J. G. et Lee, I. J. (2017). Plant growth promoting effect of *Bacillus amyloliquefaciens* H-2-5 on crop plants and influence on physiological changes in soybean under soil salinity. *Physiology and molecular biology of plants*, 23(3), 571-580.
- Kistler, H. C. (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 87(4), 474-479.

- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M. et Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286(5776), 885-886.
- Knight, T. J. et Langston-Unkefer, P. J. (1988). Enhancement of symbiotic dinitrogen fixation by a toxin-releasing plant pathogen. *Science*, 241(4868), 951-954.
- Knights, E. J. (2004). Chickpea overview. Dans C. Wrigley, H. Corke et C. Walker (dir.), *Encyclopedia of grain science* (vol. 1, p. 280-287). Elsevier Ltd.
- Kumar, A., Kumar, S. J., Chintagunta, A. D., Agarwal, D. K., Pal, G., Singh, A. N. et Simal-Gandara, J. (2022). Biocontrol potential of *Pseudomonas stutzeri* endophyte from *Withania somnifera* (Ashwagandha) seed extract against pathogenic *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 55(1), 1-18.
- Kumar, H., Bajpai, V. K., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K. et Kang, S. C. (2010). Wilt disease management and enhancement of growth and yield of *Cajanus cajan* (L) var. Manak by bacterial combinations amended with chemical fertilizer. *Crop protection*, 29(6), 591-598.
- Kumar, H., Dubey, R. C. et Maheshwari, D. K. (2011). Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination, growth promotion and suppression of Fusarium wilt of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Crop Protection*, 30(11), 1396-1403.
- Kumar, M., Mishra, S., Dixit, V., Kumar, M., Agarwal, L., Chauhan, P. S. et Nautiyal, C. S. (2016). Synergistic effect of *Pseudomonas putida* and *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates drought stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signaling & Behavior*, 11(1), e1071004.
- Kumar, M., Patel, J. S., Kumar, G., Sarkar, A., Singh, H. B. et Sarma, B. K. (2017). Studies on *Pseudomonas* and *Trichoderma*-mediated root exudation pattern in chickpea against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Journal Of Agricultural Science And Technology*, 19(5), 969-978.
- Kumari, P. et Khanna, V. (2016). Allelopathic effects of native *Bacillus* sp. against *Fusarium oxysporum* causing chickpea wilt. *Allelopathy Journal*, 38(1), 77-90.

- Kumari, P., Meena, M. et Upadhyay, R. S. (2018). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from the rhizosphere of *Vigna radiata* (mung bean). *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 155-162.
- Kumari, S. et Khanna, V. (2018). Biological management of vascular wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* by antagonistic rhizobacteria co-inoculated with native *Mesorhizobium*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(1), 920-941.
- Kumari, S. et Khanna, V. (2019). Biocidal mechanisms in biological control of Fusarium Wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.) by antagonistic rhizobacteria: A current perspective in soil borne fungal pest management. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(10), 1494-1510.
- Kushwaha, P., Srivastava, R., Pandiyan, K., Singh, A., Chakdar, H., Kashyap, P. L., Bhardwaj, A. K., Murugan, K., Karthikeyan, N. et Bagul, S. Y. (2021). Enhancement in plant growth and zinc biofortification of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Bacillus altitudinis*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21(2), 922-935.
- Kuswinanti, T., Junaid, M., Baharuddin et Melina. (2019). *Inhibitory mechanism in vitro: Potential of bacterial consortium against shallot wilt disease caused by Fusarium oxysporum*. IOP conference series: Earth and environmental science (vol. 343, p. 012257).
- Landa, B. B., Hervás, A., Bettioli, W. et Jiménez-Díaz, R. M. (1997). Antagonistic activity of Bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica*, 25(4), 305-318.
- Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., del Mar Jimenez-Gasco, M., Katan, J., Retig, B. et Jiménez-Díaz, R. M. (2006). Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causal agent of Fusarium wilt. *Plant Disease*, 90(3), 365-374.
- Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A. et Jiménez-Díaz, R. M. (2004). Integrated management of Fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology*, 94(9), 946-960.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. Dans *Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics* (p. 115-147). John Wiley & Sons.

- Latham, M. C. (1997). *Human nutrition in the developing world*. FAO.
- Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, R. E., Vicente, J. L., Wolfenden, A. D., Menconi, A., Bielke, L. R., Hargis, B. M. et Tellez, G. (2016). Evaluation and selection of *Bacillus* species based on enzyme production, antimicrobial activity, and biofilm synthesis as direct-fed microbial candidates for poultry. *Frontiers in veterinary science*, 3(95), 1-9.
- Lehmann, J., Pereira da Silva, J., Steiner, C., Nehls, T., Zech, W. et Glaser, B. (2003). Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. *Plant and soil*, 249(2), 343-357.
- Leigh, J. et Rohan, B. (2011). *Chickpea time of sowing trial, Trangie*. NSW Department of Primary Industries.
- Lemanceau, P. (1992). Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie*, 12(6), 413-437.
- Leslie, J. F. et Summerell, B. A. (2008). Species descriptions. Dans *The Fusarium laboratory manual* (p. 121-274). John Wiley & Sons.
- Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y. et Liao, X. (2016). Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis. *PloS one*, 11(9), 1-22.
- Liu, X., Wang, H., Wang, B. et Pan, L. (2018). Efficient production of extracellular pullulanase in *Bacillus subtilis* ATCC6051 using the host strain construction and promoter optimization expression system. *Microbial cell factories*, 17(1), 163.
- Lodhi, N. A. K., Abbas, A., Waris, W., Asad, M. et Aslam, M. M. (2016). Chickpea Wilt and its Management Strategies—A Review Paper. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*, 2(11), 1281-1290.
- Long, S. R. (1989). *Rhizobium* genetics. *Annual review of genetics*, 23(1), 483-506.
- Louden, B. C., Haarmann, D. et Lynne, A. M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of microbiology & biology education: JMBE*, 12(1), 51-53.

- Lucy, M., Reed, E. et Glick, B. R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van leeuwenhoek*, 86(1), 1-25.
- Lugtenberg, B. et Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of Microbiology*, 63, 541-556.
- Mahler, R. L., Saxena, M. C. et Aeschlimann, J. (1988). Soil fertility requirements of pea, lentil, chickpea and faba bean. Dans R. J. Summerfield (dir.), *World crops: Cool season food legumes* (p. 279-289). Springer.
- Maitlo, S. A., Syed, R., Rustamani, M., Khuhro, R. et Lodhi, A. (2014). Comparative efficacy of different fungicides against Fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 46(6), 2305-2312.
- Manjunath, K. et Chimmad, V. P. (2014). Effect of temperature regimes on phenology and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 27(4), 526-527.
- Martin, P. A. et Travers, R. S. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10), 2437-2442.
- Mayak, S., Tirosh, T. et Glick, B. R. (1999). Effect of wild-type and mutant plant growth-promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. *Journal of plant growth regulation*, 18(2), 49-53.
- McSpadden Gardener, B. B. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 94(11), 1252-1258.
- Melo, I. S., Souza, W. R., Silva, L. J., Santos, S. N., Assalin, M. R., Zucchi, T. D. et Queiroz, S. do N. (2016). Antifungal activity of *Pseudomonas frederiksbergensis* CMAA 1323 isolated from the Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica*. *British Microbiology Research Journal*, 14(3), 1-11.
- Menbari, S., Alizadeh Salteh, S., Bolandnazar, S. et Sarikhani, M. R. (2017). Evaluation of the effects of biological and chemical fertilizers on some physiological and growth characteristics of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, 27(4), 153-169.

- Michel-Briand, Y. et Baysse, C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84(5-6), 499-510.
- Michielse, C., B. et Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 10(3), 311-324.
- Mishra, P. K., Fox, R. T. et Culham, A. (2003). Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiology Letters*, 218(2), 329-332.
- Moffett, M. L. et Colwell, R. R. (1968). Adansonian analysis of the *Rhizobiaceae*. *Microbiology*, 51(2), 245-266.
- Mohamad, O. A., Hao, X., Xie, P., Hatab, S., Lin, Y. et Wei, G. (2009). Biosorption of copper (II) from aqueous solution using non-living *Mesorhizobium amorphae* strain CCNWGS0123. *Microbes and environments*, 27(3), 234-241.
- Möller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H. et Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic acids research*, 20(22), 6115-6116.
- Mozumder, A. B., Chanda, K., Chorei, R. et Prasad, H. K. (2022). An evaluation of aluminum tolerant *Pseudomonas aeruginosa* A7 for *in vivo* suppression of Fusarium Wilt of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and growth promotion of chickpea. *Microorganisms*, 10(3), 568.
- Muehlbauer, F. J. et Rajesh, P. N. (2008). Chickpea, a common source of protein and starch in the semi-arid tropics. Dans P. H. Moore et R. Ming (dir.), *Genomics of Tropical Crop Plants* (vol. 1, p. 171-186). Springer New York.
- Mula, M., Gonzales, F., Mula, R., Gaur, P., Gonzales, I., Dar, W., Eusebio, J. et Ilao, S. (2011). *Chickpea (Garbanzos): an emerging crop for the rainfed and dryland areas of the Philippines*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT).
- Murthy, N. et Bleakley, B. (2012). Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. *The Internet journal of microbiology*, 10(2), 1-5.

- Muzquiz, M. et Wood, J. A. (2007). Antinutritional factors. Dans S. S. Yadav, B. Redden, W. Chen et B. Sharma (dir.), *Chickpea breeding and management* (p. 143-166). CAB International.
- Nabila, N. et Kasiamdari, R. S. (2021). Antagonistic activity of siderophore-producing bacteria from black rice rhizosphere against rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 49(2), 217-224.
- Nagpal, S., Sharma, P. et Sirari, A. (2021). Induction of antioxidant response with compatible combination of *Mesorhizobium* sp. and *Pseudomonas* sp. against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in chickpea. *Bangladesh Journal of Botany*, 50(2), 359-364.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- Neilands, J. B. (1984). *Methodology of siderophores*. Siderophores from microorganisms and plants (vol. 58, p. 1-24).
- Nelson, P. E. (1981). Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. Dans *Fungal wilt diseases of plants* (p. 51-80). Academic Press.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. et Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hans. Dans *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. (p. 142-145). The Pennsylvania State University Press.
- Nene, Y. L. (1982). A review of Ascochyta blight of chickpea. *International Journal of Pest Management*, 28(1), 61-70.
- Nene, Y. L., Reddy, M. V., Haware, M. P., Ghanekar, A. M., Amin, K. S., Pande, S. et Sharma, M. (2012). *Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control*. Information Bulletin No. 28 (revised). International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Nguyen, D. T., Hieu, N. C., Hung, N. V., Thao, H. T. B., Keswani, C., Van Toan, P. et Hoat, T. X. (2019). Biological control of *Fusarium* root rot of Indian mulberry (*Morinda officinalis* How.) with consortia of agriculturally important microorganisms in Viet Nam. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 6(1), 1-11.
- Ntushelo, K., Ledwaba, L. K., Rauwane, M. E., Adebo, O. A. et Njobeh, P. B. (2019). The Mode of Action of *Bacillus* Species against *Fusarium graminearum*, Tools for Investigation, and Future Prospects. *Toxins*, 11(10), 606.

- Okigbo, R. N. et Nmeka, I. A. (2005). Control of yam tuber rot with leaf extracts of *Xylopi*  
*aethiopica* and *Zingiber officinale*. *African Journal of Biotechnology*, 4(8), 804-807.
- Oliveira, A. N. de, Oliveira, L. A. de, Andrade, J. S. et Chagas Júnior, A. F. (2007). Rhizobia  
amylase production using various starchy substances as carbon substrates. *Brazilian*  
*Journal of Microbiology*, 38(2), 208-216.
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L. et López-Bucio, J. (2009). The  
role of microbial signals in plant growth and development. *Plant signaling & behavior*,  
4(8), 701-712.
- Palleroni, N. J. (2005). Genus 1 *Pseudomonas*. Dans *Bergey's manual of systematic*  
*Bacteriology, The proteobacteria part B the Gammaproteobacteria* (2<sup>e</sup> éd., vol. 2, p. 323  
-378). Springer.
- Palleroni, N. J. (2009). The genus *Pseudomonas*. Dans E. Goldman et H. L. Green (dir.),  
*Practical handbook of Microbiology* (2<sup>e</sup>me edition, p. 231-241). Taylor & Francis  
Group.
- Pande, S., Rao, J. N. et Sharma, M. (2007). Establishment of the chickpea wilt pathogen  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in the soil through seed transmission. *Plant Pathology*  
*Journal*, 23(1), 3-6.
- Parte, A. C. (2020). *Rhizobiaceae*. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in  
Nomenclature. <https://lpsn.dsmz.de/family/rhizobiaceae>
- Patel, S. et Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for  
resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus*  
species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov.,  
*Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov.  
*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 406-438.
- Patra, S. et Biswas, M. K. (2016). Efficacy of fungicides for the management of chickpea wilt  
disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. *International journal of advanced*  
*research (IJAR)*, 4(10), 1457-1461.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H. et Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of  
*Pseudomonas* revisited: an update. *Infection, Genetics and Evolution*, 57, 106-116.

- Pellegrini, M., Ercole, C., Di Zio, C., Matteucci, F., Pace, L. et Del Gallo, M. (2020). *In vitro* and *in planta* antagonistic effects of plant growth-promoting rhizobacteria consortium against soilborne plant pathogens of *Solanum tuberosum* and *Solanum lycopersicum*. *FEMS Microbiology Letters*, 367(13), fnaa099.
- Pornsunthorntawee, O., Wongpanit, P., Chavadej, S., Abe, M. et Rujiravanit, R. (2008). Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresource Technology*, 99(6), 1589-1595.
- Prajakta, B. M., Suvarna, P. P., Raghvendra, S. P. et Alok, R. R. (2019). Potential biocontrol and superlative plant growth promoting activity of indigenous *Bacillus mojavensis* PB-35 (R11) of soybean (*Glycine max*) rhizosphere. *SN Applied Sciences*, 1(10), 1-11.
- Puhalla, J. E. (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, 63(2), 179-183.
- Quecine, M. C., Kidarsa, T. A., Goebel, N. C., Shaffer, B. T., Henkels, M. D., Zabriskie, T. M. et Loper, J. E. (2016). An interspecies signaling system mediated by fusaric acid has parallel effects on antifungal metabolite production by *Pseudomonas protegens* strain Pf-5 and antibiosis of *Fusarium* spp. *Applied and environmental Microbiology*, 82(5), 1372-1382.
- Radhakrishnan, R., Hashem, A. et Abd\_Allah, E. F. (2017). *Bacillus*: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Frontiers in physiology*, 8, 667.
- Ramezani, H. (2009). Efficacy of some fungal and bacterial bioagents against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* on chickpea. *Plant protection journal*, 1(1), 108-113.
- Rapilly, F. (1968). *Les techniques de mycologie en pathologie végétale* (vol. 19). Institut national de la recherche agronomique.
- Rathore, R., Vakharia, D. N. et Rathore, D. S. (2020). *In vitro* screening of different *Pseudomonas fluorescens* isolates to study lytic enzyme production and growth inhibition during antagonism of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*, wilt causing pathogen of cumin. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(57), 1-8.
- Rawal, V. et Navarro, D. K. (dir.). (2019). *The global economy of pulses*. FAO.

- Rawat, N., Sharma, M., Suyal, D. C., Singh, D. K., Joshi, D., Singh, P. et Goel, R. (2019). Psychrotolerant bio-inoculants and their co-inoculation to improve *Cicer arietinum* growth and soil nutrient status for sustainable mountain agriculture. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19(3), 639-647.
- Rendueles, O., Kaplan, J. B. et Ghigo, J. M. (2013). Antibiofilm polysaccharides. *Environmental Microbiology*, 15(2), 334-346.
- Riera, N., Handique, U., Zhang, Y., Dewdney, M. M. et Wang, N. (2017). Characterization of antimicrobial-producing beneficial bacteria isolated from huanglongbing escape citrus trees. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2415.
- Roberts, E. H., Hadley, P. et Summerfield, R. J. (1985). Effects of temperature and photoperiod on flowering in chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Annals of Botany*, 55(6), 881-892.
- Saharan, B. S. et Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Science and Medical Research*, 21(1), 30.
- Saikia, R., Singh, T., Kumar, R., Srivastava, J., Srivastava, A. K., Singh, K. et Arora, D. K. (2003). Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbiological Research*, 158(3), 203-213.
- Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Saravanakumar, K., Arasu, V. S. et Kathiresan, K. (2013). Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. *Aquatic Botany*, 104, 101-105.
- Schallmeyer, M., Singh, A. et Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian journal of Microbiology*, 50(1), 1-17.
- Schildkraut, C. L., Marmur, J. et Doty, P. (1961). The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. *Journal of molecular Biology*, 3(5), 595-617.
- Shahid, I., Han, J., Hanoq, S., Malik, K. A., Borchers, C. H. et Mehnaz, S. (2021). Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 37.

- Shamseldin, A., Abdelkhalek, A. et Sadowsky, M. J. (2017). Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis*, 71(2), 91-109.
- Sharma, D., Gupta, M., Gupta, S., Kashyap, P. L., Zargar, S. M. et Mallick, S. A. (2018). Antibiotic gene specific characterization and ARDRA analysis of native isolates of *Pseudomonas* spp. from Jammu, India. *Indian Phytopathology*, 71(2), 225-233.
- Sharma, R., Chisti, Y. et Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, 19(8), 627-662.
- Sheeba, J., Dharmotharan, R. et Baskar, K. (2017). Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their antifungal effect on *Rhizoctonia Solani* (JG Kühn 1858). *Advances in Plants & Agriculture Research*, 7(5), 369-75.
- Shen, F. T., Yen, J. H., Liao, C. S., Chen, W. C. et Chao, Y. T. (2019). Screening of rice endophytic biofertilizers with fungicide tolerance and plant growth-promoting characteristics. *Sustainability*, 11(4), 1133.
- Shurigin, V. V., Ruzimova, K. K. et Davranov, K. (2018). Biological control of phytopathogenic fungi causing chickpea root diseases by means of PGPR in the saline soil conditions. *International journal of advanced biotechnology and research*, 9(4), 36-47.
- Siddique, K. H. M. et Sedgley, R. H. (1986). Chickpea (*Cicer arietinum* L.), a potential grain legume for south-western Australia: seasonal growth and yield. *Australian Journal of Agricultural Research*, 37(3), 245-261.
- Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23(1), 15-22.
- Singh, A., Sarma, B. K., Upadhyay, R. S. et Singh, H. B. (2013). Compatible rhizosphere microbes mediated alleviation of biotic stress in chickpea through enhanced antioxidant and phenylpropanoid activities. *Microbiological Research*, 168(1), 33-40.
- Singh, F. et Diwakar, B. (1995). *Chickpea botany and production practices*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Singh, K. B. (1997). Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field crops research*, 53(1-3), 161-170.

- Singh, P. K., Shrivastava, N., Sharma, B. et Bhagyawant, S. S. (2015). Effect of domestic processes on chickpea seeds for antinutritional contents and their divergence. *American Journal of Food Science and Technology*, 3(4), 111-117.
- Singh, R., Sharma, P., Varshney, R. K., Sharma, S. K. et Singh, N. K. (2008). Chickpea improvement: role of wild species and genetic markers. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25(1), 267-314.
- Singh, U. P., Pathak, K. K., Khare, M. N. et Singh, R. B. (1979). Effect of leaf extract of garlic on *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, *Sclerotinia sclerotiorum* and on gram seeds. *Mycologia*, 71(3), 556-564.
- Singh, U. P., Singh, H. B. et Singh, R. B. (1980). The fungicidal effect of neem (*Azadirachta indica*) extracts on some soil-borne pathogens of gram (*Cicer arietinum*). *Mycologia*, 72(6), 1077-1093.
- Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A. et Król, J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial cell factories*, 5(7), 19.
- Smitha, K. P., Rajeswari, E., Alice, C. D. et Raguchander, T. (2017). Evaluation of *Bacillus subtilis* for the management of dry root rot and vascular wilt of chickpea. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 967-970.
- Somasegaran, P. et Hoben, H. J. (1994). General microbiology of rhizobia. Dans *Handbook for rhizobia, methods in legume-Rhizobium technology* (p. 455). Springer.
- Stackebrandt, E. et Swiderski, J. (2002). From phylogeny to systematics: the dissection of the genus *Bacillus*. Dans *Applications and systematics of Bacillus and relatives* (p. 8-22). Blackwell.
- Stakman, E. C., Stewart, D. M. et Loegering, W. Q. (1962). *Identification of physiologic races of Puccinia graminis var. tritici*. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- Stolp, H. et Gadkari, D. (1981). Nonpathogenic members of the genus *Pseudomonas*. Dans *The prokaryotes* (p. 719-741). Springer.

- Street, K., Rukhkyan, N. et Ismail, A. (2008). Directives pour la régénération: pois chiche. Dans *Crop specific regeneration guidelines* (p. 11). CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP).
- Surender, S. et Hari, C. (2004). Effect of extracts of some medicinal plants on spore germination of chickpea wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (Pad.) Snyder and Hans.). *Indian Journal of Plant Protection*, 32(1), 162-163.
- Suslow, T. V., Schroth, M. N. et Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72, 917-918.
- Suthar, K. P., Patel, R. M., Singh, D. et Khunt, M. D. (2017). Efficacy of *Bacillus subtilis* isolate K18 against chickpea wilt *Fusarium oxysporum* F. sp. *ciceri*. *International journal of pure and applied bioscience*, 5(5), 838-843.
- Sutherland, I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in biotechnology*, 16(1), 41-46.
- Sutherland, I. W. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 663-674.
- Swift, R. G. (2016). *Plant growth-promoting bacteria from Western Australian soils* [phd thesis]. Murdoch University.
- Syed, S., Tollamadugu, N. P. et Lian, B. (2020). *Aspergillus* and *Fusarium* control in the early stages of *Arachis hypogaea* (groundnut crop) by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) consortium. *Microbiological Research*, 240, 126562.
- Thaware, D. S., Kohire, O. D., Gholve, V. M., Budgujar, S. L. et Chavan, A. A. (2016). Exploration of fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (Padwick) Snyder and Hansen causing wilt of chickpea. *International journal of plant Sciences*, 11(2), 255-261.
- Tille, P. (2015). *Bailey & Scott's diagnostic Microbiology* (14th éd.). Elsevier.
- Todar, K. (2020.). *Bacillus and related endospore-forming bacteria*. <http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>
- Townsend, G. R. (1943). Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter*, 27, 340-343.

- Travers, R. S., Martin, P. A. et Reichelderfer, C. F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), 1263-1266.
- Trivedi, S., Srivastava, M., Ratan, V., Mishra, A., Dixit, S., Pandey, S. et Harshita. (2020). Evaluation of microbial consortia on systemic resistance against chickpea wilt. *Bangladesh Journal of Botany*, 49(3), 653-661.
- Tsalgatidou, P. C., Thomloundi, E. E., Baira, E., Papadimitriou, K., Skagia, A., Venieraki, A. et Katinakis, P. (2022). Integrated genomic and metabolomic analysis illuminates key secreted metabolites produced by the novel endophyte *Bacillus halotolerans* Cal. 1. 30 involved in diverse biological control activities. *Microorganisms*, 10(2), 399.
- Turenne, C. Y., Sanche, S. E., Hoban, D. J., Karlowsky, J. A. et Kabani, A. M. (1999). Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *Journal of clinical Microbiology*, 37(6), 1846-1851.
- Türkkan, M. et Dolar, F. S. (2010). Determination of fusaric acid production by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with thin layer chromatography and spectrophotometric methods. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 25(3), 146-150.
- Turnbull, P. C. B. (1996). *Bacillus*. Dans S. Baron (dir.), *Medical Microbiology* (4th éd., p. 1273). University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Ul Hassan, T. et Bano, A. (2019). Construction of IAA-deficient mutants of *Pseudomonas moraviensis* and their comparative effects with wild type strains as bio-inoculant on wheat in saline sodic soil. *Geomicrobiology journal*, 36(4), 376-384.
- Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. Dans *New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research* (p. 243-254). Springer.
- van Dijk, J. et Hecker, M. (2013). *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial cell factories*, 12(3), 1-6.
- Varma, P. K., Kumar, V. K., Suresh, M., Chandrasekhar, V., Bharathalakshmi, M. et Jamuna, P. (2019). *Bacillus amyloliquefaciens* (RB19): A potential PGPR in managing sugarcane red rot disease. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(6), 2255-2261.

- Verghis, T. I., McKenzie, B. A. et Hill, G. D. (1999). Effect of light and soil moisture on yield, yield components, and abortion of reproductive structures of chickpea (*Cicer arietinum*), in Canterbury, New Zealand. *New Zealand journal of crop and horticultural science*, 27(2), 153-161.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
- Vlassi, A., Nesler, A., Parich, A., Puopolo, G. et Schuhmacher, R. (2020). Volatile-mediated inhibitory activity of rhizobacteria as a result of multiple factors interaction: The case of *Lysobacter capsici* AZ78. *Microorganisms*, 8(11), 1761.
- Wallace, T. C., Murray, R. et Zelman, K. M. (2016). The nutritional value and health benefits of chickpeas and hummus. *Nutrients*, 8(12), 766.
- Wang, E. T., Chen, W. F., Tian, C. F., Young, J. P. W. Y. et Chen, W. W. (2019). Diversity and evolution of rhizobia. Dans *Ecology and evolution of rhizobia, principles and applications* (p. 273). Springer.
- Win, T. T., Bo, B., Malec, P. et Fu, P. (2021). The effect of a consortium of *Penicillium* sp. and *Bacillus* spp. in suppressing banana fungal diseases caused by *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1890-1908.
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, V. J., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R. et Neelson, K. H. (1984). The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Systematic and applied Microbiology*, 5(3), 315-326.
- Wood, J. A. et Grusak, M. A. (2007). Nutritional value of chickpea. Dans S. S. Yadav, R. J. Redden et W. Chen (dir.), *Chickpea breeding and management* (p. 101-142). CAB International.
- Xu, S. J., Park, D. H., Kim, J. Y. et Kim, B. S. (2016). Biological control of gray mold and growth promotion of tomato using *Bacillus* spp. isolated from soil. *Tropical Plant Pathology*, 41(3), 169-176.
- Yang, W., Zheng, L., Liu, H. X., Wang, K. B., Yu, Y. Y., Luo, Y. M. et Guo, J. H. (2014). Evaluation of the effectiveness of a consortium of three plant-growth promoting rhizobacteria for biocontrol of cotton Verticillium wilt. *Biocontrol science and technology*, 24(5), 489-502.

- Yang, W. (2019). Components of rhizospheric bacterial communities of barley and their potential for plant growth promotion and biocontrol of Fusarium wilt of watermelon. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(3), 749-757.
- Yanti, Y. et Hamid, H. (2021). *Development of the PGPR and Cyanobacteria consortium for growth promotion and control Ralstonia syzigii subsp. indonesiensis of Tomato* (vol. 709, p. 012085).
- Yanti, Y., Warnita, W., Reflin, R. et Hamid, H. (2018). Short communication: Development of selected PGPR consortium to control *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* and promote the growth of tomato. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 19(6), 2073-2078.
- Yutani, M., Taniguchi, H., Borjihhan, H., Ogita, A., Fujita, K. et Tanaka, T. (2011). Alliinase from *Ensifer adhaerens* and its use for generation of fungicidal activity. *AMB express*, 1(1), 1-8.
- Zaim, S., Bekkar, A. A. et Belabid, L. (2018). Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* combination on chickpea Fusarium wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Archives of phytopathology and plant protection*, 51(3-4), 217-226.
- Zaim, S., Belabid, L., Bayaa, B. et Bekkar, A. A. (2016). Biological control of chickpea Fusarium wilts using rhizobacteria "PGPR". Dans D. K. Choudhary et A. Varma (dir.), *microbial-mediated induced systemic resistance in plants* (p. 147-162). Springer.
- Zemouli-Benfreh, F., Djamel-eddine, H. et Merzoug, A. (2014). Fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in north-west Algeria. *African journal of agricultural research*, 9(1), 168-175.
- Zhang, X., Xu, D., Zhu, C., Lundaa, T. et Scherr, K. E. (2012). Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemical Engineering Journal*, 209, 138-146.
- Zimbro, M., J., Power, D., A., Miller, S., M., Wilson, G., E. et Johnson, J., A. (dir.). (2009). *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological culture media* (Second edition). Becton, Dickinson and Company.
- Zine-Zikara, F., Bouzid, L. et Yekkour, A. (2015). Le pois chiche en Algérie : situation, potentialités et perspectives. *Recherche Agronomique*, 27, 35-47.

- Zohary, D., Weiss, E. et Hopf, M. (2012). Pulses. Dans D. Zohary, M. Hopf et E. Weiss (dir.), *Domestication of plants in the old world: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin* (4ème édition, p. 75-98). Oxford University Press.
- Zouari, I., Masmoudi, F., Medhioub, K., Tounsi, S. et Trigui, M. (2020). Biocontrol and plant growth-promoting potentiality of bacteria isolated from compost extract. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113(12), 2107-2122.

# *Annexes*

## Annexes

### 1. Principaux milieux de culture (g/L)

#### **PDA (pH final à 25 °C = 5,6 ± 0,2)**

- Infusion de pomme de terre (200 g de pommes de terre tranchées + 1 L d'eau distillée)
- Agar 15 g
- Saccharose 20 g

#### **GN (pH final à 25 °C = 7,4 ± 0,2)**

- Extrait de viande 1 g
- Extrait de levure 2 g
- NaCl 5 g
- Peptone 5 g
- Agar 15 g

#### **KB (pH final à 25 °C = 7,2 ± 0,2)**

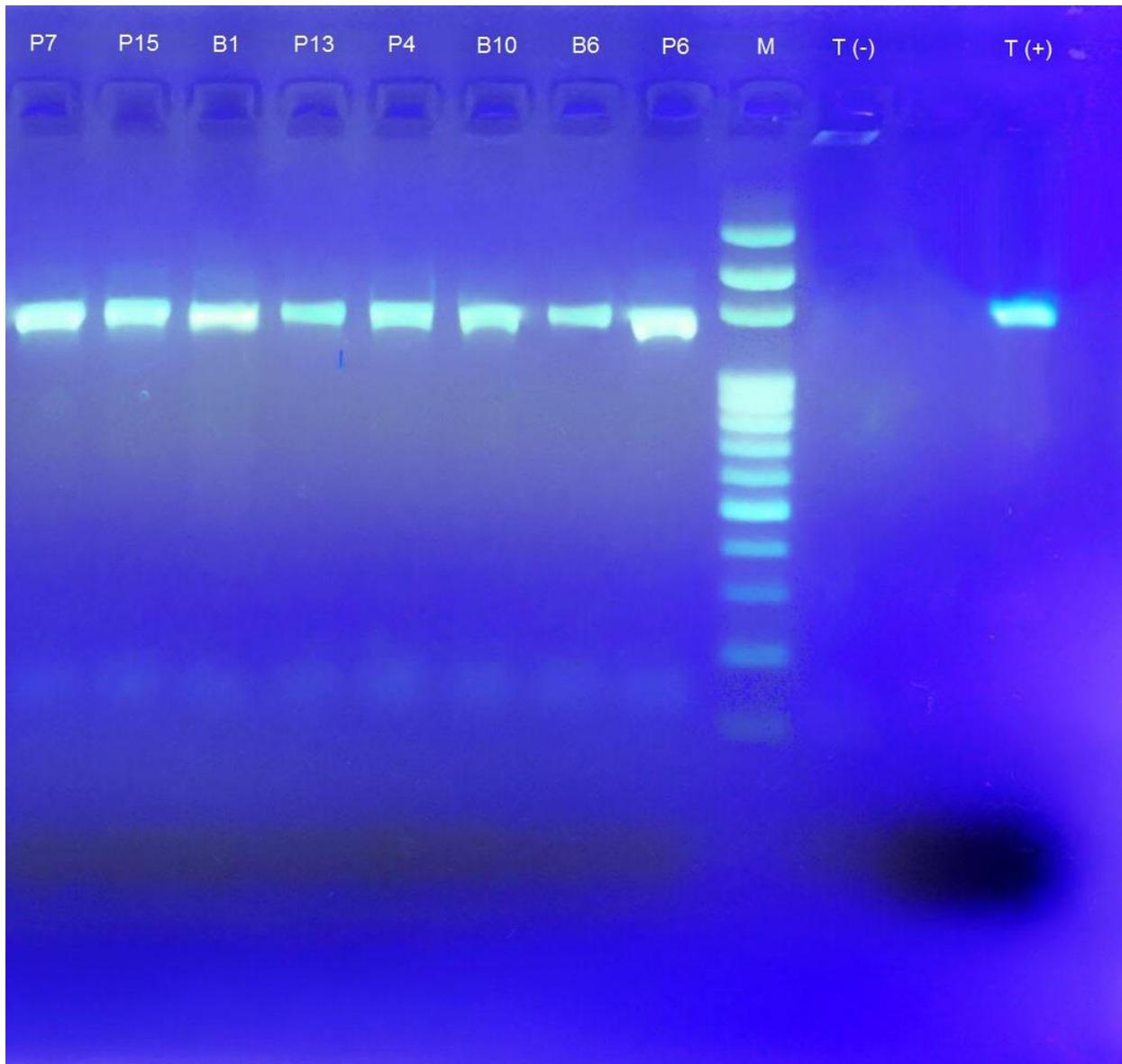
- Peptone 20 g
- Glycérol 10 ml
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 g
- MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 1,5 g
- Agar 15 g

#### **YEMA (pH final à 25 °C = 6,8 ± 0,2)**

- Extrait de levure 1 g
- Mannitol 10 ml
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g
- MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 0,2 g
- NaCl 0,1 g
- Agar 15 g

#### **LB (pH final à 25 °C = 7,5 ± 0,2)**

- Tryptone 10 g
- Extrait de levure 5 g
- NaCl 10 g
- Agar 15 g



**Figure 25.** Gel de l'électrophorèse des bactéries sous UV : P7 (E1PP7), P15 (E1PP15), B1 (E2PB1), P13 (E1FP13), P4 (E1FP4), B10 (E1PB10), B6 (E1PB6), P6 (E1PP6), M (marqueur de taille : 100 BP DNA ladder), T(-) (Témoin négatif), T(+) (Témoin positif).

## 2. Les séquences des bactéries sélectionnées

### *Pseudomonas*

>E1PP6 (MT774541)

TCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGA  
ATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGA  
GAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTG  
AGGTAATGGCTCACCRAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA  
CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGC  
CTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAG  
GAAGGGCAGTTACCTAATACGTAATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTC  
TGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCG  
CGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAA  
ACTGTCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT  
ATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAG  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGT  
TGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCC  
GCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
CGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGT  
GCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGG  
TTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAA  
GGAAACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG

>E1FP13 (MT774542)

CCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACG  
CTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTG  
CGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAATGGCTCACCGAGGCGACGA  
TCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATGAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACG  
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTG  
AAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAAACCTAATACGTTAG  
TGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAG  
AGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGA  
TGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAACCTGTGAGCTAGAGTATGGTAGAG  
GGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAG  
GCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA  
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCG  
CAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTG  
ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCA  
GGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTG  
CTGCATGGCTGTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCC  
TTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG  
GAAGGTGGGGATGACGTCATCATGGCCCTTACGGGCTGGGGCTA

>E1PP7 (MT774544)

TGCAGTCGAGCGGATGAAAGGAGCTTGCTCCTGGATTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTA  
GGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACG  
GGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTG  
GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTG  
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAA  
AGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGG  
GAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAA  
CTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA  
GCGCGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTC  
AAAAGTGTGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTA  
GATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGA  
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGC  
CGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG  
GCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  
ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATT  
GGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTT  
GGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCA

>E1PP15 (MT774545)

TTCGGGGATTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGC  
TCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAG  
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCT  
GATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGG  
AGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGC  
TAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG  
GCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG  
GAACTGCATTCAAAAGTGTGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTA  
GCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGA  
TACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA  
CGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGCGCAGCTAACG  
CATTAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGG  
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAG  
GCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAG  
GTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTG

>E1FP4 (MT774548)

AGGCTACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGCGGA  
CGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGC  
TAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGAT  
GAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAA  
CTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGT  
GAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATAC

GTTAGTGTTTTGGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGT  
TCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGTCTGA  
GCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG  
GAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAG  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAG  
CCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGA  
GTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA  
TGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGACCTTACAGGCTTGACTCCATGACTTCCGAGATG  
GATGGTGCTTCGGAACCTTGAACAG

### ***Bacillus***

>E1PB10 (MT774546)

GGGACTTGCTCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTA  
AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGT  
TCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAG  
TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG  
CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAA  
AGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCT  
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG  
TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAG  
CCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGA  
GTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG  
GCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGGTTTTCCGCCCC  
TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA  
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAA  
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTT  
TCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT

>E1PB6 (MT774547)

AGGGACTTGCTCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGT  
AAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGG  
TTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA  
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG  
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC  
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTA  
AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACC  
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC  
GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAA  
GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAG  
AGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA  
GGGCACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT

AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCC  
CTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAA  
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA  
ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCC  
TTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA

>E2PB1 (MT774543)

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG  
TGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACGGGATGCTTGTT  
TGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC  
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA  
TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC  
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGC  
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGA  
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT  
TATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCG  
GGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACTTGAGTGCGAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGC  
GGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTGA  
CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC  
GATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC  
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG  
GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAT  
CCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT  
AGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG

## Article

# Evaluation of the Antagonistic Effect of *Pseudomonas* Rhizobacteria on Fusarium Wilt of Chickpea

Meriem Wafaa Khalifa <sup>1</sup>, Noureddine Rouag <sup>2,\*</sup> and Mariem Bouhadida <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Characterisation and Valorisation of Natural Resources, University Mohamed El Bachir El Ibrahimi, Bordj Bou-Arreidj 34000, Algeria; meriemwafaa.khalifa@univ-bba.dz

<sup>2</sup> Laboratory of Applied Microbiology, Department of Agronomy, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Ferhat Abbas, Setif 19000, Algeria

<sup>3</sup> Field Crops Laboratory, National Institute of Agricultural Research of Tunisia (INRAT), University of Carthage, Tunis 1054, Tunisia; mariembouhadida76@gmail.com

\* Correspondence: n.rouag@univ-setif.dz

**Abstract:** This study aimed to isolate rhizobacteria belonging to the genus *Pseudomonas* with plant-growth-promoting properties that can be used in the control of chickpea wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc). The production of antifungal compounds by the isolated rhizobacteria was assessed against two Foc isolates, coded Foc-S1 and Foc-S2. Strains E1FP13, E1FP4, and E1PP7 were the most effective against Foc-S1, with percentages of 52.77%, 48.37%, and 47.97%, respectively, while E1PP6, E1FP13, and E1PP15 were the most effective against Foc-S2 with percentages of 52.20%, 52.09%, and 45.38%, respectively. All five isolates were identified as *Pseudomonas* species using 16S rRNA sequencing. The microscopic examination of the impact of the *Pseudomonas* strains on Foc revealed that all five strains caused morphological changes in Foc, such as granulation and condensation of the cytoplasm, fragmentation, and deformation of the hyphae. The strains produced several plant-growth-promoting compounds, such as cellulase, hydrogen cyanide, indole acetic acid, ammonia, siderophores, lipase, protease, and solubilized phosphate. They were also able to significantly increase chickpea growth and reduce wilt disease, with E1FP13 resulting in the highest disease reductions of 55.77% (Foc-S1) and 53.33% (Foc-S2). The results revealed that our isolates can make promising biocontrol agents for controlling chickpea wilt disease.

**Keywords:** *Pseudomonas*; Foc; biocontrol; plant-growth-promoting properties



**Citation:** Khalifa, M.W.; Rouag, N.; Bouhadida, M. Evaluation of the Antagonistic Effect of *Pseudomonas* Rhizobacteria on Fusarium Wilt of Chickpea. *Agriculture* **2022**, *12*, 429.

<https://doi.org/10.3390/agriculture12030429>

Received: 2 February 2022

Accepted: 16 March 2022

Published: 19 March 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Chickpea is considered to be one of the most valuable pulse crops around the world [1]. It provides energy and nutrients, such as proteins, lipids, carbohydrates, and minerals, and it also helps to maintain good health through non-nutritive components [2]. In a diet without animal proteins, it can present a solid substitute to vegetarians [3]. It is used in the livestock industry [1] and also contributes to soil fertility through azote fixation when included in crop rotations [4].

*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc) (Padwick) Matuo and K. Sato is a fungus that causes Fusarium wilt [5], a soil- and seed-borne disease [6]. It affects almost all chickpea-producing regions in the world [7]. It is a challenging pathogen, as it may survive in the soil and on crop remainders as chlamydospores for up to six years without its host [8]. The fungus can cause losses of yield up to 100% when conditions are adequate [9].

Several management strategies have been employed to control wilt disease. Crop rotation effectiveness has significantly decreased due to the persisting nature of the pathogen in the soil [8,10], and the use of resistant cultivars can have serious limitations due to the variability of the pathogen [11]. Chemical pesticides are no longer appealing due to their serious side effects on the applicator, the consumer, and the environment overall [12,13]. The search for a safer and more effective alternative has been the aim of many researchers

in the past few years; thus, interest in biological control has been increasing [14,15]. Among the diverse bacteria that exist in soil, the genus *Pseudomonas* seems to grab the attention of researchers due to its outstanding capacity in the management of phytopathogens through a multitude of mechanisms, ranging from the production of antibiotics, siderophores, and lytic enzymes to the release of volatile antifungal compounds into the atmosphere [16]. Numerous studies assessing the effect of these bacteria on phytopathogens have been published. *P. luteola* and *P. fluorescens* were reported by Abed et al. [14] for their ability to inhibit the growth of Foc. *P. fluorescens*-5 was also mentioned for its ability to inhibit the growth of *F. oxysporum* f. sp. *cumini* [17]. *P. aeruginosa* isolates ISO1 and ISO2 showed significant levels of antagonism toward *Fusarium solani* [15]. *P. frederiksbergensis* CMAA 1323 was also shown to control the growth of *Botrytis cinerea* affecting strawberry pseudofruits [18].

The overall goal of the present work was to isolate rhizobacteria belonging to the genus *Pseudomonas* from the rhizosphere of chickpea that could be used in the control of chickpea wilt disease. Specifically, we assessed their antagonistic activities against two Foc isolates, as well as their plant-growth-promoting properties (PGPP). The effect of the antagonists on the morphology of Foc isolates was also microscopically examined. The impact of the *Pseudomonas* isolates on chickpea growth and the control of wilt disease were evaluated under greenhouse conditions.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Source of Foc Isolates

Foc-S1 and Foc-S2 were isolated from chickpea plants showing typical wilt disease symptoms. The plants were collected from an infected chickpea field at the agriculture department of Ferhat Abbas University of Setif, Algeria, during the spring season of 2017. The Foc isolates were identified microscopically following the key of Nelson et al. [19] and through PCR using *Fusarium oxysporum* [20] and Foc [21] specific primers. The PCRs were carried out in a 25  $\mu$ L volume containing: 1  $\mu$ L of each primer (0.2  $\mu$ M), 2.5  $\mu$ L DNA template (25 ng), 8  $\mu$ L of ultra-pure H<sub>2</sub>O, and 12.5  $\mu$ L of CSL-JADNA PCR reaction mixture. DNA amplifications were performed in a Applied Biosystems SimpliAmp thermal cycler (CA, USA) according to the specific cycle of each set of primers, as described by Mishra et al. [20] for *F. oxysporum* and Jimenez-Gasco and Jimenez-Diaz [21] for Foc. For electrophoresis, 2% (*w/v*) agarose gels in 10 $\times$  TBE with 3  $\mu$ L ethidium bromide stain were used. GeneOn 100bp Plus ladder was used as a molecular weight marker. Gels were examined under UV light in Vilbert Lourmat™ Ebox, and developed samples bands were compared with those of the molecular weight marker. The pathogenicity of the isolates was confirmed by conducting a pathogenicity test following the protocol of Hassan et al. [22]. Seeds from the chickpea line ILC 482 (susceptible to Foc) were used in the test and were provided by the National Institute of Agronomic Research of Algeria.

### 2.2. Isolation of *Pseudomonas* from the Rhizosphere of Chickpea

The isolation of *Pseudomonas* from the rhizosphere was conducted as follows: 1 g of the soil surrounding the roots was mixed with 10 mL of sterile distilled water; serial dilutions were then prepared by mixing 1 mL of the previous solution with 9 mL of sterile distilled water, and so on, until dilution 10<sup>-5</sup>. An amount of 1 mL of each dilution was spread on King B (KB) agar and incubated at 30 °C for 48 h [23]. After incubation, individual colonies were streaked onto new Petri dishes for purification. Isolates showing typical macroscopic, microscopic, and biochemical characteristics of *Pseudomonas*, as described by Cowan and Steel [24], were kept and conserved in glycerol stock at -20 °C for upcoming tests.

### 2.3. In Vitro Evaluation of Antagonistic Activities of Isolated *Pseudomonas*

*Pseudomonas* strains were evaluated for the production of antifungal compounds using co-culture assay following the protocol of Erdogan and Benlioglu [25] with some modifications: a 5 mm disc taken from seven-day-old Foc culture was placed onto one side of a 9 cm Petri dish containing Potato Dextrose Agar (PDA), and on the other side, 10  $\mu$ L of bacterial

suspension ( $1.5 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) was streaked at a distance of 3 cm from the mycelium plug. The production of volatile antifungal compounds was tested using the divided plate method, following the protocol of Dilantha Fernando and Linderman [26] with some modifications: a 5 mm disc taken from the Foc culture was placed onto one half of the divided plate containing PDA; then, 10  $\mu$ L of bacterial suspension ( $1.5 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) was streaked onto the other half containing KB agar. The plates were incubated at 30 °C for seven days, including plates without bacteria, which served as controls. Fungal growth was measured after seven days of incubation. Three replicates were used for each strain in both assays. The inhibition percentage was calculated using the formula of Etebarian et al. [27]:

$$\% \text{ inhibition} = [(\text{diameter of Foc in control plate} - \text{diameter of Foc in sample plate}) / \text{diameter of Foc in control plate}] \times 100.$$

#### 2.4. Effect of *Pseudomonas* Strains on Hyphae Morphology of Foc Isolates

To examine the impact of the bacterial antagonists on Foc isolates, a microscopic examination of the hyphae morphology of the Foc isolates treated with *Pseudomonas* strains (antagonism plates) and from the control plates was performed for the *Pseudomonas* strains with the highest inhibition percentages of each Foc.

#### 2.5. Evaluation of PGPP

The *Pseudomonas* strains with the highest inhibition percentages of each Foc were selected and checked for their PGPP. Three replicates were used for each of the following tests.

##### 2.5.1. Protease Production

Protease production was evaluated by inoculating *Pseudomonas* strains with 10% skim milk agar. The appearance of a clear zone around the colonies after incubation for three days at 30 °C was considered a sign of proteolytic activity [28].

##### 2.5.2. $\alpha$ -Amylase Production

$\alpha$ -amylase production was evaluated by streaking *Pseudomonas* isolates on starch agar. After incubation at 30 °C for 48 h, the plates were amended with Gram's iodine solution, and isolates exhibiting clear zones around the colonies were marked as  $\alpha$ -amylase producers [29].

##### 2.5.3. Lipase Production

Lipase production was evaluated by inoculating *Pseudomonas* strains on a medium composed of (g L<sup>-1</sup>): peptone (10), NaCl (5), CaCl<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O (0.1), agar (18), and Tween 80 at a final concentration of 1%. The appearance of opaque halos around the colonies after incubation for six days at 30 °C was noted as an indication of lipase production [30].

##### 2.5.4. Cellulase Production

Cellulase production was evaluated by streaking *Pseudomonas* isolates on Carboxymethyl-cellulose (CMC) agar. After incubation at 30 °C for seven days, Gram's iodine solution was applied. Isolates showing clear halos around the colonies were marked as cellulase positive [31].

##### 2.5.5. Hydrogen Cyanide (HCN) Production

HCN production was assessed as follows: sterile filter papers were soaked in HCN detection solution and placed on the lids of Petri plates containing KB agar supplemented with 4.4 g L<sup>-1</sup> glycine and streaked with *Pseudomonas* isolates. The plates were then incubated at 30 °C for six days. The change in the paper color from yellow to light brown, brown, or reddish-brown was considered a sign of HCN production [32].

#### 2.5.6. Indole Acetic Acid (IAA) Production

IAA production was estimated by streaking *Pseudomonas* isolates on Luria–Bertani agar supplemented with 5 mM L-tryptophan; the agar was then covered with sterile filter paper. After incubation at 30 °C for three days, the paper was recovered and treated with Salkowski reagent for 30 min. The change in the filter paper color from white to a reddish color was noted as a sign of IAA production [33].

#### 2.5.7. Phosphate Solubilization

Phosphate solubilization was first screened by inoculating *Pseudomonas* strains on NBRIP agar. Strains showing clear halos around the colonies after incubation at 30 °C for 14 days were marked as phosphate solubilizers [34]. Quantification of the solubilized phosphate was estimated in NBRIP broth. Concentrations of the formed soluble phosphate were extrapolated by a standard curve drawn using known concentrations of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [35].

#### 2.5.8. Ammonia Production

*Pseudomonas* strains were screened for their ability to produce ammonia by inoculation into tubes containing peptone water. After incubation at 30 °C for four days, Nessler's reagent was added to the tubes. Ammonia production was indicated by the development of a yellow to a brown color [36].

#### 2.5.9. Chitinase Production

Chitinase production was evaluated by streaking *Pseudomonas* isolates on chitinase medium. Isolates showing clear zones around the colonies after incubation at 30 °C for five days were reported as chitinase producers [37].

#### 2.5.10. Siderophores Production

Siderophores production was evaluated as follows: Chrome Azurol S (CAS) blue dye solution was prepared as described by Loudon et al. [38]. A modified protocol of Hu and Xu [39] was used for the preparation of plates as follows: blue CAS agar was prepared by adding sterile blue dye solution into sterile agar at 10% of the final volume. *Pseudomonas* strains were streaked onto nutrient agar and incubated at 30 °C for 18 h. After incubation, plates were overlaid with the previously prepared blue CAS agar. The change of color from blue to yellow-orange was considered as positive siderophores production.

### 2.6. Effect of Selected *Pseudomonas* Strains on the Shoot and Root Growth of Chickpea

This test was performed for the *Pseudomonas* strains with the highest inhibition percentages of each Foc. Seed bacterization was carried out by soaking disinfected chickpea seeds (ILC 482) overnight in a bacterial suspension ( $1.5 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>), to which CMC was added at a 1% concentration to assure the adherence of *Pseudomonas* strains onto the seeds [40]. Three replicates were used for each bacterial treatment, as well as for the control. Each replicate consisted of a pot (D: 15.5 cm and H: 13.5 cm) containing a sterilized mixture of soil, sand, and compost. Three seeds were used for each pot. Inoculated seeds were used for the treatments, and seeds soaked only in CMC water were used as control. Pots were irrigated every five days with 200 mL of water. After 30 days, shoot and root length, as well as shoot and root dry weight (after drying at 70 °C for a day), were measured.

### 2.7. Control of Wilt Disease of Chickpea by Selected *Pseudomonas* Strains

A pot experiment under greenhouse conditions (day/night cycle of 12/12 h, a temperature of  $20 \pm 2$  °C, and  $60 \pm 2\%$  relative humidity) was performed to evaluate the effect of selected *Pseudomonas* strains on chickpea wilt disease. The previously described sterilized soil mixture was infected with Foc isolates following the protocol of Hassan et al. [22]: five PDA discs of four-day-old Foc were transferred into flasks containing an autoclaved mixture of 100 g of barley and 100 mL of distilled water. After incubation at 30 °C for 14 days with shaking, the mixture was added to plastic pots containing the sterilized soil

mixture at a 2% concentration. Seed bacterization of chickpea line ILC 482 was performed as previously described. Three replicates were used for each bacterial treatment, as well as for the control. Each replicate consisted of a pot containing the infected soil mixture, and three seeds were used for each pot. Inoculated seeds were used for the treatments, and non-inoculated seeds served as control.

A scale was assigned to each plant based on the level of symptoms, (0: no symptoms; 1: yellowing or wilting of 1/3 of the plant; 2: yellowing or wilting of 2/3 of the plant; 3: yellowing or wilting of the whole plant; 4: plant dead) [41]. Disease severity (DS) was calculated as follows:

$$DS (\%) = [(\sum v \times n) / (N \times V)] \times 100.$$

The letter n is the number of plants in each scale value; v is the scale value; V is the maximum scale value, and N is the total number of plants observed [42]. The disease reduction (DR) percentage was calculated as follows:

$$DR = [(A - B) / A] \times 100.$$

The letter A is the percentage of disease in the control, and B is the percentage of disease with the application of bacteria [43].

### 2.8. Molecular Identification of Selected *Pseudomonas*

16S rRNA sequencing was performed to identify the selected *Pseudomonas* isolates as follows: DNA extraction was carried out using the commercial kit NucleoMag DNA Bacteria for DNA purification from bacteria and yeast (Macherey-Nagel Germany) by following the manufacturer's instructions. PCR was performed using primers 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') in a reaction mixture containing: 2 µL genomic DNA (25 ng µL<sup>-1</sup>), 0.2 µL Taq polymerase Promega (1U), 1 µL of each primer (0.5 µM), 0.2 µL dNTP (0.2 mM), 1.5 µL MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 5 µL Taq Promega buffer, and ultra-pure water to a final volume of 25 µL. Conditions for PCR were as follows: initial denaturation at 95 °C/5 min followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C/30 s; annealing at 53 °C/30 s and extension at 72 °C/45 s; and a final extension at 72 °C/7 min. The amplification products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel after staining with ethidium bromide (0.5 µg mL<sup>-1</sup>). Fragments were visualized and photographed under UV using the Gel doc system from Biorad. PCR products were purified using NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit following the manufacturer's protocol. Sequencing was conducted using Applied Biosystems' BigDye v3.1 kit and by following the method of Sanger et al. [44].

### 2.9. Data Analysis

To evaluate the significance between treatments, the results were statistically processed through the Student's t-test, analysis of variance (ANOVA), and Tukey's B test at  $p < 0.05$  significance. Principal component analysis (PCA) was also performed to assess the variability of traits.

## 3. Results

### 3.1. In Vitro Evaluation of Antagonistic Activities of Isolated *Pseudomonas*

Seventeen *Pseudomonas* strains were isolated from the rhizosphere of chickpeas and evaluated for their antagonistic activities against the Foc isolates in vitro.

The results revealed a difference between the percentages of inhibition registered with each antagonism assay. The growth of Foc-S1 was significantly more reduced in the divided plate assay ( $p < 0.0001$ ), with an average inhibition rate equal to 44.31% against 20.40% in the co-culture assay. Concerning Foc-S2, there was no significant difference between the two assays ( $p = 0.085$ ), with an average inhibition equal to 26.75% in the co-culture assay against 19.91% in the divided plate assay (Table 1).

**Table 1.** Percentages of inhibition of Foc radial growth by antagonistic *Pseudomonas* isolates in each assay.

Isolates	Foc-S1		Foc-S2	
	Co-Culture	Divided Plate	Co-Culture	Divided Plate
E2PP3	4.66 ± 2.48 <sup>a</sup>	44.70 ± 4.09 <sup>b</sup>	17.13 ± 4.32 <sup>abc</sup>	23.62 ± 3.25 <sup>bcd</sup>
E1PP14	11.81 ± 5.59 <sup>abc</sup>	44.51 ± 2.14 <sup>b</sup>	14.96 ± 4.38 <sup>ab</sup>	12.57 ± 7.62 <sup>ab</sup>
E1FP14	9.36 ± 3.64 <sup>ab</sup>	24.89 ± 4.09 <sup>a</sup>	22.98 ± 2.78 <sup>abcd</sup>	32.69 ± 5.85 <sup>cde</sup>
E2PP4	17.43 ± 1.06 <sup>bcd</sup>	43.95 ± 8.90 <sup>b</sup>	17.81 ± 0.24 <sup>abc</sup>	22.69 ± 5.80 <sup>abcd</sup>
<b>E1PP15</b>	21.85 ± 3.27 <sup>cdef</sup>	47.43 ± 8.58 <sup>b</sup>	14.69 ± 1.23 <sup>ab</sup>	<b>45.38 ± 4.68<sup>e</sup></b>
E2PP7	24.10 ± 3.90 <sup>def</sup>	44.22 ± 2.29 <sup>b</sup>	13.24 ± 6.67 <sup>a</sup>	19.37 ± 6.75 <sup>abc</sup>
E2PP5	20.49 ± 1.29 <sup>bcde</sup>	44.61 ± 0.09 <sup>b</sup>	17.18 ± 8.82 <sup>abc</sup>	19.17 ± 7.68 <sup>abc</sup>
E1FP8	22.16 ± 2.02 <sup>cdef</sup>	45.01 ± 0.41 <sup>b</sup>	22.75 ± 5.54 <sup>abcd</sup>	14.25 ± 4.86 <sup>ab</sup>
E2PP8	17.08 ± 3.38 <sup>bcd</sup>	43.51 ± 0.37 <sup>b</sup>	28.72 ± 5.28 <sup>cdef</sup>	18.56 ± 8.86 <sup>abc</sup>
E1FP9	24.59 ± 2.97 <sup>def</sup>	44.89 ± 0.51 <sup>b</sup>	23.97 ± 1.99 <sup>abcde</sup>	13.09 ± 2.64 <sup>ab</sup>
E1PP2	22.95 ± 3.31 <sup>cdef</sup>	43.77 ± 2.47 <sup>b</sup>	27.36 ± 0.19 <sup>bcde</sup>	20.49 ± 6.92 <sup>abc</sup>
E2PP6	30.10 ± 8.48 <sup>ef</sup>	45.00 ± 1.34 <sup>b</sup>	21.12 ± 5.74 <sup>abcd</sup>	12.26 ± 4.34 <sup>ab</sup>
<b>E1PP7</b>	25.61 ± 2.81 <sup>def</sup>	<b>47.97 ± 5.04<sup>b</sup></b>	32.33 ± 4.67 <sup>def</sup>	35.55 ± 3.37 <sup>de</sup>
<b>E1FP4</b>	23.24 ± 1.41 <sup>cdef</sup>	<b>48.37 ± 6.31<sup>b</sup></b>	40.52 ± 4.43 <sup>f</sup>	6.88 ± 0.24 <sup>a</sup>
E2PP2	33.03 ± 8.54 <sup>f</sup>	44.19 ± 2.26 <sup>b</sup>	35.70 ± 3.68 <sup>ef</sup>	19.88 ± 4.57 <sup>abc</sup>
<b>E1PP6</b>	19.06 ± 0.73 <sup>bcde</sup>	43.44 ± 6.67 <sup>b</sup>	<b>52.20 ± 4.51<sup>g</sup></b>	7.02 ± 2.18 <sup>a</sup>
<b>E1FP13</b>	19.24 ± 1.00 <sup>bcde</sup>	<b>52.77 ± 2.32<sup>b</sup></b>	<b>52.09 ± 2.65<sup>g</sup></b>	15.06 ± 6.13 <sup>ab</sup>
Mean	20.40	44.31	26.75	19.91

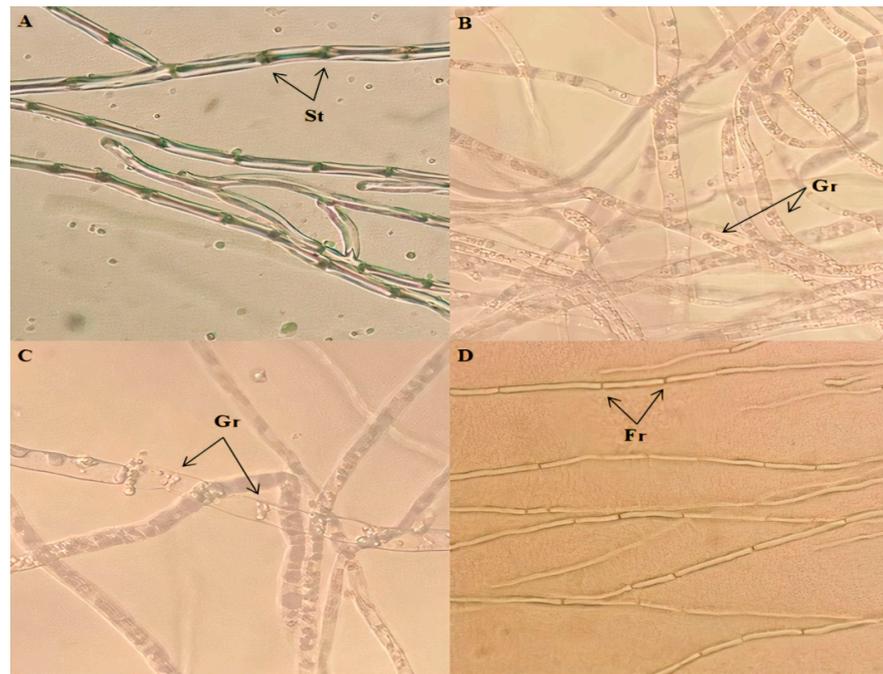
The values given are means ( $n = 3$ ) with standard deviations. Means in the same column followed by the same letters are not significantly different at  $p < 0.05$ .

Isolates E1FP13, E1FP4, and E1PP7 gave the highest inhibition percentages against Foc-S1, with values equal to 52.77%, 48.37%, and 47.97%, respectively. All three values were registered with the divided plate assay (action of volatile compounds). In the case of Foc-S2, isolates E1PP6, E1FP13, and E1PP15 registered the highest inhibition rates of 52.20%, 52.09%, and 45.38%, respectively, with co-culture assay (mainly through the action of diffusible compounds) for E1PP6 and E1FP13 and with divided plate assay (action of volatile compounds) for E1PP15 (Table 1) (Supplementary Materials, Figure S1).

The ANOVA analysis showed that the results in both assays (co-culture assay and divided plate assay) for both pathogens (Foc-S1 and Foc-S2) were highly significant ( $p < 0.0001$ ). All traits were subjected to PCA to estimate the contribution of each trait and to assess the total level of variability. Two components (PC1-PC2) gave eigenvalues  $>1.0$  and contributed to the explanation of 75.19% of the information. PC1 explained 50.19% of the total variability; the two pathogens were linked to it, as well as the two assays. PC2 explained 25.00% of the total contribution to variability; all strains of *Pseudomonas* were linked to it.

### 3.2. Effect of *Pseudomonas* Strains on Hyphae Morphology of Foc Isolates

The comparison between the microscopic observations of the Foc isolates in the antagonism plates and the control plates revealed a clear difference between the two. In the case of Foc-S1, the hyphae treated with E1FP13 appeared discontinued (fragmented), empty, and without septa (Figure 1D), while for E1PP7 and E1FP4, the hyphae appeared empty of their content with the presence of granulations (vesicles); the septa were also absent (Figure 1B,C). In the case of Foc-S2, the hyphae treated with E1PP15 were devoid of septa with condensed cytoplasm (Figure 2D). With regard to E1PP6 and E1FP13, the hyphae appeared empty, devoid of septa for the most part, with the presence of granulations; some areas were also deformed (swollen) (Figure 2B,C). Both controls (Figures 1A and 2A) displayed the characteristic Foc appearance without any changes in the hyphae morphology.



**Figure 1.** Light microscopy observations of the impact of selected *Pseudomonas* strains on Foc-S1 hyphae morphology (40×). (A) Control; (B) Effect of E1PP7; (C) Effect of E1FP4; (D) Effect of E1FP13. (St) Septa; (Gr) Granulations; (Fr) Fragmentations.



**Figure 2.** Light microscopy observations of the impact of selected *Pseudomonas* strains on Foc-S2 hyphae morphology (40×). (A) Control; (B) Effect of E1FP13; (C) Effect of E1PP6; (D) Effect of E1PP15. (St) Septa; (Gr) Granulations; (Df) Deformations; (Cd) Condensations.

### 3.3. Evaluation of PGPP

All selected *Pseudomonas* strains were positive for phosphate solubilization; the quantitative estimation showed highly significant variability between the strains ( $p < 0.0001$ ) with values ranging from 57.66 to 240.69  $\mu\text{g P mL}^{-1}$ . The highest solubilization values were recorded with E1FP4 and E1PP7, which released 240.69  $\mu\text{g P mL}^{-1}$  and 223.09  $\mu\text{g P mL}^{-1}$ , respectively. All isolates were found positive for the production of siderophores, IAA, and ammonia. Three isolates, E1PP7, E1PP15, and E1PP6, were found positive for the production of HCN. The screening for the different enzymes revealed that all isolates were negative for  $\alpha$ -amylase and chitinase production but were positive for cellulase production. The results of the production of lipase and protease were very variable, with E1PP7 and E1PP15 exhibiting the highest activity (Table 2).

**Table 2.** Evaluation of plant-growth-promoting and antifungal properties of selected *Pseudomonas*.

Tests	E1PP7	E1FP4	E1PP15	E1PP6	E1FP13
$\alpha$ -amylase production	-	-	-	-	-
Lipase production	++++	+	+++	-	+
Protease production	+	-	++	-	-
Cellulase production	+	+	+	++	+
Chitinase production	-	-	-	-	-
HCN production	++	-	+	++	-
IAA production	+	+	++	+	++
Ammonia production	+++	+	++	+	+
Siderophores production	++	+++	++	+++	+++
Qualitative phosphate solubilization	+	+	+	++	++
Quantitative phosphate solubilization ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	223.09 $\pm$ 18.99 <sup>a</sup>	240.69 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	173.80 $\pm$ 1.47 <sup>b</sup>	62.82 $\pm$ 6.01 <sup>c</sup>	57.66 $\pm$ 11.40 <sup>c</sup>

(-) no activity, (+) low, (++) moderate, (+++) high, (++++) very high. The values given are means ( $n = 3$ ) with standard deviations. Means followed by the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

### 3.4. Effect of Selected *Pseudomonas* Strains on the Shoot and Root Growth of Chickpea

The inoculation of seeds with the selected *Pseudomonas* revealed that, aside from E1PP15, all isolates were able to significantly increase shoot length, as well as shoot dry weight in comparison to the control ( $p < 0.0001$ ). Isolate E1PP7 gave the best results with a shoot length of 35.77 cm (increased by 42.68%) and a shoot dry weight of 0.32 g (increased by 88.24%). Aside from E1PP6, all isolates were able to significantly increase root length in comparison to the control ( $p < 0.0001$ ), with E1PP7 giving the highest length of 20.53 cm (increased by 83.80%) followed by E1FP13 with a length of 17.97 cm (increased by 60.88%). All isolates were able to significantly increase root dry weight in comparison to the control ( $p = 0.003$ ). There was no significant difference between root dry weights of seeds treated with isolates E1FP13, E1FP4, E1PP7, and E1PP15. However, seeds treated with isolate E1PP6 registered the lowest root dry weight. Nonetheless, it was still significantly higher than the root dry weight of the control (Table 3) (Supplementary Materials, Figure S4).

**Table 3.** Effect of selected *Pseudomonas* strains on the shoot and root growth of chickpea.

Selected <i>Pseudomonas</i>	Shoot Length (cm)	Root Length (cm)	Shoot Dry Weight (g)	Root Dry Weight (g)
E1PP6	28.80 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	12.13 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.14 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>
E1FP13	30.17 $\pm$ 1.46 <sup>b</sup>	17.97 $\pm$ 0.96 <sup>bc</sup>	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
E1FP4	30.23 $\pm$ 1.66 <sup>b</sup>	14.83 $\pm$ 1.56 <sup>ab</sup>	0.27 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
E1PP7	35.77 $\pm$ 1.10 <sup>c</sup>	20.53 $\pm$ 0.38 <sup>c</sup>	0.32 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.20 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
E1PP15	23.57 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	14.53 $\pm$ 1.19 <sup>ab</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Control	25.07 $\pm$ 1.87 <sup>a</sup>	11.17 $\pm$ 2.40 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>

The values given are means ( $n = 3$ ) with standard deviations. Means in the same column followed by the same letters are not significantly different at  $p < 0.05$ .

### 3.5. Control of Wilt Disease of Chickpea by Selected *Pseudomonas* Strains

The pot experiment revealed that the DS was significantly lower ( $p = 0.002$ ) in plants inoculated with the selected *Pseudomonas* strains (E1FP13, E1FP4, and E1PP7) in comparison to the uninoculated control infected with Foc-S1. There was no significant difference ( $p = 0.489$ ) in the DR between E1FP13, E1FP4, and E1PP7, with values equal to 55.77%, 48.08%, and 46.16%, respectively (Table 4) (Supplementary Materials, Figure S2).

**Table 4.** In vivo effect of selected *Pseudomonas* strains on Foc isolates.

Strains	Foc-S1		Strains	Foc-S2	
	DS%	DR%		DS%	DR%
E1FP13	31.94 ± 6.36 <sup>a</sup>	55.77 ± 8.81 <sup>a</sup>	E1FP13	38.89 ± 4.82 <sup>a</sup>	53.33 ± 5.78 <sup>b</sup>
E1FP4	37.50 ± 4.17 <sup>a</sup>	48.08 ± 5.78 <sup>a</sup>	E1PP6	44.44 ± 9.62 <sup>ab</sup>	46.67 ± 11.55 <sup>ab</sup>
E1PP7	38.89 ± 9.62 <sup>a</sup>	46.16 ± 13.33 <sup>a</sup>	E1PP15	58.33 ± 0.00 <sup>b</sup>	30.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
Control	72.22 ± 12.73 <sup>b</sup>	00.00	Control	83.33 ± 8.34 <sup>c</sup>	00.00

The values given are means ( $n = 3$ ) with standard deviations. Means in the same column followed by the same letters are not significantly different at  $p < 0.05$ .

The DS was also significantly lower ( $p = 0.0002$ ) in plants inoculated with the selected *Pseudomonas* strains (E1FP13, E1PP6, and E1PP15) in comparison to the uninoculated control infected with Foc-S2. There was a significant difference ( $p = 0.021$ ) among the DR results, with isolate E1FP13 giving the highest percentage of 53.33%, followed by E1PP6 (46.67%) and E1PP15 (30%) (Table 4) (Supplementary Materials, Figure S3).

### 3.6. Molecular Identification of Selected *Pseudomonas*

The sequences of selected *Pseudomonas* strains were compared with other sequences using BLAST. The search was limited to sequences from type material, and the identification was based on homology percentage with the reference sequences. Results are presented in Table 5, with accession numbers of each isolate received from NCBI after sequences submission.

**Table 5.** BLAST results of selected *Pseudomonas*.

Isolates	Accession	Best Match	PI *	E Value
E1PP6	MT774541	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	99.55%	0.0
E1FP13	MT774542	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> strain LMR 708	99.56%	0.0
E1PP7	MT774544	<i>Pseudomonas granadensis</i> strain F-278,770T	100%	0.0
E1PP15	MT774545	<i>Pseudomonas granadensis</i> strain F-278,770T	99.77%	0.0
E1FP4	MT774548	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> strain LMR708	99.89%	0.0

\* PI: Percentage identification.

Phylogenetic trees were also generated by the neighbor-joining method using the MEGA-X program with Bootstrap values based on 1000 replications. Sequences from the BLAST search with the highest similarity percentages were selected and used for the construction of the trees. *Rhizobacter gummiphilus* was used as an out-group bacterium. Results of the analysis revealed that the closest relative to isolates E1PP6, E1FP13, and E1FP4 was *Pseudomonas frederiksbergensis* with which they had the highest similarity percentages (>99.50%), while isolates E1PP7 and E1PP15 were closely related to *Pseudomonas granadensis* (100% and 99.77% identity, respectively) and *Pseudomonas soyae* (99.72% and 99.65% identity, respectively). Results can be found in Supplementary Materials (Figures S5–S9).

#### 4. Discussion

In this study, *Pseudomonas* isolates were used as potential biocontrol agents against Foc. Several studies have demonstrated the efficacy of biocontrol agents in controlling this damaging phytopathogen [45–47]. The biocontrol activity of our *Pseudomonas* strains against Foc was confirmed through multiple assays.

In the in vitro antagonism test, the *Pseudomonas* strains reduced the mycelial growth of the Foc isolates with varying inhibition percentages. The results of the antagonistic effect of isolated *Pseudomonas* strains revealed that the growth of Foc-S1 was significantly more reduced in the divided plate assay (effect of volatile compounds) than in the co-culture assay, whereas for Foc-S2, there was no significant difference between the two assays. Typically, a higher growth inhibition percentage would be expected with the co-culture assay rather than with the divided plate assay, considering that in the co-culture assay, Foc is exposed to both diffusible and volatile antifungal metabolites, whereas in the divided plate assay, Foc is only exposed to the volatile antifungal metabolites. However, our results stated above revealed otherwise. This can be explained by the diffusion of antibacterial metabolites by Foc into the medium during the co-culture assay, which negatively affected the ability of *Pseudomonas* strains to inhibit fungal growth, thus resulting in a lower inhibition percentage. Meanwhile, in the divided plate assay, the partition in Petri dishes protects the *Pseudomonas* strains from potential antibacterial compounds released by Foc. The most known metabolite is fusaric acid, a mycotoxin produced by several species in the genus *Fusarium* [48]. The production of fusaric acid by Foc was reported by Türkkan and Dolar [49]. This mycotoxin is capable of decreasing the production of 2, 4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG), an antifungal metabolite synthesized by the antagonistic strain *P. protegens* Pf-5 [50]. Similar results to ours have been reported by Kumari and Khanna [51].

E1FP13, E1FP4, and E1PP7 were the *Pseudomonas* strains with the highest inhibition percentages against Foc-S1. They registered the highest inhibition rates with volatile compounds, which is consistent with their ability to produce volatile antifungal compounds. The assessment of their PGPP revealed that E1FP13 and E1FP4 produced ammonia, while E1PP7 produced ammonia and HCN. A recent study conducted by Vlasi and Nesler [52] confirmed the involvement of ammonia released by *Lysobacter capsici* AZ78 in the inhibition of *Rhizoctonia solani*. HCN emitted by *P. putida* R32 and *P. chlororaphis* R47 was shown to be responsible for inhibiting the mycelial growth of the phytopathogen *Phytophthora infestans* [53]. HCN targets the electron transport chain of the pathogens, which leads to a deficiency in their ATP production, thus limiting their growth and development [51].

Microscopic examination of the effect of E1FP13 on Foc-S1 revealed fragmented and empty hyphae without septa. Similarly, Attia et al. [54] have reported hyphal fragmentation of *Alternaria solani* after treatment with plant-growth-promoting rhizobacteria. These results can be interpreted by the lysis of the hyphae that led to the loss of their content, which explains the empty appearance. *P. monteilii* PsF84 was shown to cause hyphal lysis of *Fusarium oxysporum* through the action of 2, 4-Di-tert-butylphenol, a volatile antifungal compound [55]. In the case of E1PP7 and E1FP4, the hyphae appeared empty of their content with the presence of granulations (vesicles). The same results were observed by Barka et al. [56] when *Botrytis cinerea* was treated with *Pseudomonas* sp. strain PsJN. In another study, a volatile antifungal compound released by *P. brassicacearum* and identified as dl-Limonene was also shown to cause the formation of granulations inside *Sclerotinia sclerotiorum* hyphae [57]. The alterations observed with Foc-S1's hyphae were caused by the volatile antifungal compounds released by E1FP13, E1FP7, and E1FP4. These compounds can be ammonia and HCN, as they can be other volatile antifungal compounds produced by these strains [58–60].

Isolates E1PP6 and E1FP13 gave the highest inhibition rates against Foc-S2 with diffusible compounds, while E1PP15 acted through the action of volatile compounds. The results of PGPP revealed that E1PP15 was able to produce HCN and ammonia, which correlates positively with its volatile antagonistic activity. Isolates E1PP6 and E1FP13 were both able to produce siderophores, which are low molecular weight compounds that

chelate ferric iron [61]. Di Francesco and Baraldi [62] reported that competition for iron through the release of siderophores by antagonists reduced the mycelial growth of the pathogenic fungus *Monilinia laxa*. In another study, it was shown that rhizobacteria that had a strong antagonistic effect against *Pyricularia oryzae* were the ones that registered the best siderophores production [63]. Besides the production of siderophores, isolate E1FP13 was also positive for the production of lipase, an enzyme responsible for the degradation of the fungal cell wall [64]. Isolate E1PP6 did not produce any of the tested diffusible lytic enzymes, which suggests that other enzymes, such as  $\beta$ -glucanase, involved in the degradation of the fungal cell wall [65] or other mechanisms, such as the production of cyclo (Pro-Val), a cyclic dipeptide with antifungal activity produced by *P. frederiksbergensis* CMAA 1323 [18], and the production of antibiotics [66], may have been employed.

The microscopic examination of the effect of E1PP15 on Foc-S2 revealed that this isolate caused a condensation of the hyphae's cytoplasm; the same observation was reported by Giorgio et al. [57] when *Sclerotinia sclerotiorum* was treated with *Pseudomonas* spp. USB2104. E1PP6 and E1FP13 caused granulations, emptiness, and deformations (swelling) of the hyphae, which were also observed by Arora et al. [67] when *Rhizoctonia solani* was treated with *Pseudomonas* PGC2. Likewise, empty and swollen hyphae were reported by Chiranjeevi et al. [68] when *Rhizoctonia bataticola* was treated with the crude metabolite extract of *Bacillus subtilis*. The granulations could be cytoplasm remains formed due to cytoplasm leakage following hyphal damage caused by the hydrolytic enzyme, lipase, produced by E1FP13. In the case of E1PP6, which did not produce any of the tested lytic enzymes, other mechanisms, as mentioned above, may have been responsible for the observed morphological changes.

All five isolates were shown to synthesize IAA, a phytohormone that increases the plant's nutrients intake by enhancing the root surface [69]. All isolates were positive for the production of cellulase, involved in the increase in organic matter in the soil [70]. All five isolates were also able to solubilize phosphate; however, the qualitative assay results did not match those of the quantitative assay, as the highest solubilization values were observed with the strains that gave the weakest solubilization halo in the plate assay. The same results were observed by Nautiyal [34]. Phosphate plays a vital role in plant development. Despite its abundance in the soil, most of it remains unavailable to plants. Phosphate-solubilizing microorganisms can hydrolyze the insoluble phosphate forms into a soluble form that can be easily assimilated by plants [71].

The evaluation of the effect of selected *Pseudomonas* strains on the shoot and root growth of chickpea revealed that isolates E1PP6, E1FP13, E1FP4, and E1PP7 were able to significantly increase shoot length and shoot dry weight, which correlates positively with their ability to produce several PGP compounds, such as ammonia, cellulase, siderophores, and solubilize phosphate. Although E1PP15 was also shown to produce these compounds, it did not improve shoot growth like the rest of the isolates. This result may be explained by the fact that, unlike in the in vitro tests, E1PP15 was not able to synthesize these metabolites in vivo. Concerning the growth of the roots, isolates E1PP15, E1FP13, E1FP4, and E1PP7 were able to significantly increase root length and root dry weight, which concurs well with their ability to produce IAA. IAA plays an important role in the development of plant roots; in a recent study, *P. moraviensis* wild type was reported for its ability to increase wheat root area in comparison to its IAA-deficient mutants [72]. Regarding E1PP6, this isolate did not improve the root length; however, it significantly increased the roots' dry weight, and this can be interpreted by an increase in the growth of lateral roots through the production of IAA. The positive effect of IAA-producing bacteria on the number of plant's lateral roots has been demonstrated by Herlina et al. [73]. Our results are in line with other studies that have demonstrated the capacity of *Pseudomonas* strains to improve chickpea growth [74–76]. Our study confirms the ability of the *Pseudomonas* isolates to promote chickpea growth by increasing shoot and root length, as well as their dry weight.

The pot experiment revealed that all selected *Pseudomonas* strains were able to significantly decrease the disease severity caused by both Foc isolates. The in vitro antagonistic

effects (percentages of inhibition) of E1FP13, E1FP4, and E1PP7 against Foc-S1 were not significantly different from their *in vivo* effects (DR percentages). Similarly, there was no significant difference between the *in vitro* and *in vivo* antagonistic effects of E1PP6 and E1FP13 against Foc-S2. However, the antagonistic effect of isolate E1PP15 was significantly lower in the *in vivo* test, which can be attributed to lower production of antifungal compounds than that expressed in the *in vitro* assay. A recent study conducted by Besset-Manzoni et al. [77] showed that biocontrol agents may not always perform the same way in the *in vivo* antagonism assay as they do in the *in vitro* antagonism assay. In this study, the selected *Pseudomonas* strains were shown to control Fusarium wilt of chickpea caused by Foc; various studies have demonstrated the potential of *Pseudomonas* strains in the protection against phytopathogens [14,15,17,53]. Our results revealed that the *Pseudomonas* isolates produced various antifungal compounds and caused some damage to the Foc hyphae. Moreover, the isolates improved chickpea growth through the production of several metabolites that play an important role in the provision and acquisition of nutrients. The improvement of plant growth contributes to the biocontrol process, as it confers a better resistance to plants against pathogens, thus limiting their negative impact on the plants. The combination of all these mechanisms explains the significant reduction in disease severity by our isolates when applied as seed treatments.

The BLAST results and the phylogenetic analysis confirmed that the selected rhizobacteria belong to the genus *Pseudomonas*. Isolates E1PP6, E1FP13, and E1FP4 were closely related and best matched with *P. frederiksbergensis*, a bacterium that is usually associated with abiotic stress reduction, such as the degradation of pesticides [78] and the enhancement of cold stress and salt stress tolerance [79]. A few studies have been carried out on the antagonistic and PGPP of *P. frederiksbergensis*. A study performed by Ferchichi et al. [80] revealed that *P. frederiksbergensis* LB113 was able to produce HCN and inhibit mycelium growth of *Macrophomina phaseolina* and *Alternaria alternata* in PDA. *P. frederiksbergensis* PgBE39 and PgBE45 were reported for their antifungal activity against *Cylindrocarpon destructans* and *Botrytis cinerea* [81], while *P. frederiksbergensis* G62 was reported by Ben Zineb et al. [82] for its ability to produce siderophores, HCN, IAA, and solubilize phosphate. Isolates E1PP7 and E1PP15 were closely related to two *Pseudomonas* species, *P. soyae* and *P. granadensis*, with the latter having the highest similarity percentages with the two isolates. *P. granadensis* strain 100 was reported by Riera et al. [83] for its ability to produce siderophores, while *P. granadensis* PMK4 was shown to produce IAA, siderophores, and solubilize phosphate [84].

## 5. Conclusions

In brief, our results revealed that the *Pseudomonas* strains have the potential to be used as biocontrol agents in the management of wilt disease and as plant-growth-promoting bacteria in chickpea plants.

## 6. Future Perspective

In the future, it would be of interest to further study the ability of our *Pseudomonas* strains to control Foc under different stress conditions, such as cold, high salinity soils, and soils polluted with pesticides, and to test their effect alone and in consortium with other bacteria against Foc and other phytopathogens. Other experiments and field evaluations of the isolated *Pseudomonas* strains should be carried out to reveal in detail the underlying mechanisms of their biocontrol activity.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/agriculture12030429/s1>, Figure S1: Inhibition of Foc growth by isolated *Pseudomonas*. (1) Antagonism plate, (2) Plate without bacteria (control); Figure S2: Biocontrol of Foc-S1 by isolated *Pseudomonas*. (1) Treatment with E1FP13, (2) Treatment with E1PP7, (3) Control, (4) Treatment with E1FP4; Figure S3: Biocontrol of Foc-S2 by isolated *Pseudomonas*. (1) Treatment with E1PP6, (2) Treatment with E1PP15, (3) Control, (4) Treatment with E1FP13; Figure S4: Promotion of chickpea growth by *Pseudomonas* isolates. (1) Control, (2) Treatment with E1FP13, (3) Treatment with E1PP7, (4) Treatment with E1PP6, (5) Treatment with E1FP4, (6) Treatment with E1PP15; Figure S5:

Phylogenetic tree of strain E1PP6 constructed by neighbor-joining method with Bootstrap values supporting the branches shown at the nodes; the bar indicates the number of substitutions per site; Figure S6: Phylogenetic tree of strain E1FP13 constructed by neighbor-joining method with Bootstrap values supporting the branches shown at the nodes; the bar indicates the number of substitutions per site; Figure S7: Phylogenetic tree of strain E1PP7 constructed by neighbor-joining method with Bootstrap values supporting the branches shown at the nodes; the bar indicates the number of substitutions per site; Figure S8: Phylogenetic tree of strain E1PP15 constructed by neighbor-joining method with Bootstrap values supporting the branches shown at the nodes; the bar indicates the number of substitutions per site; Figure S9: Phylogenetic tree of strain E1FP4 constructed by neighbor-joining method with Bootstrap values supporting the branches shown at the nodes; the bar indicates the number of substitutions per site.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.W.K. and N.R.; Formal analysis, M.W.K. and N.R.; Investigation, M.W.K.; Supervision, N.R. and M.B.; Writing—original draft, M.W.K.; Writing—review and editing, M.W.K., N.R. and M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All the main data supporting the results of this study are reported in the present article.

**Acknowledgments:** The authors wish to express their gratitude to Mokhtari Zineb and Benhamida Aissa for their technical support. The authors are also very thankful to all the laboratory technicians of the Field crops laboratory (INRAT) for their assistance during the molecular identification of Foc.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Rawal, V.; Navarro, D.K. *The Global Economy of Pulses*; FAO: Rome, Italy, 2019. [[CrossRef](#)]
2. Wood, J.A.; Grusak, M.A. Nutritional value of chickpea. In *Chickpea Breeding and Management*; Yadav, S.S., Redden, R.J., Chen, W., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 2007; pp. 101–142. [[CrossRef](#)]
3. Latham, M.C. *Human Nutrition in the Developing World*; FAO: Rome, Italy, 1997.
4. Aslam, M.; Mahmood, I.A.; Peoples, M.B.; Schwenke, G.D.; Herridge, D.F. Contribution of chickpea nitrogen fixation to increased wheat production and soil organic fertility in rain-fed cropping. *Biol. Fertil. Soils* **2003**, *38*, 59–64. [[CrossRef](#)]
5. Landa, B.B.; Navas-Cortés, J.A.; del Mar Jimenez-Gasco, M.; Katan, J.; Retig, B.; Jiménez-Díaz, R.M. Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causal agent of Fusarium wilt. *Plant Dis.* **2006**, *90*, 365–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Knights, E.J. Chickpea overview. In *Encyclopedia of Grain Science*; Wrigley, C., Corke, H., Walker, C., Eds.; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2004; Volume 1, pp. 280–287. [[CrossRef](#)]
7. Haware, M.P.; Jiménez-Díaz, R.M.; Amin, K.S.; Phillips, J.C.; Halila, H. Integrated management of wilt and root rots of chickpea. In *Proceedings of the Chickpea in the Nineties*, ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics), Patancheru, Andhra Pradesh, India, 4–8 December 1990; pp. 129–134.
8. Gopalakrishnan, S.; Srinivas, V. Management of soil-borne diseases of grain legumes through broad-spectrum actinomycetes having plant growth-promoting and biocontrol traits. In *Plant Microbe Interface*; Varma, A., Tripathi, S., Prasad, R., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; pp. 129–144. [[CrossRef](#)]
9. Landa, B.B.; Navas-Cortés, J.A.; Jiménez-Díaz, R.M. Integrated management of Fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* **2004**, *94*, 946–960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Arfaoui, A.; Sifi, B.; Boudabous, A.; El Hadrami, I.; Cherif, M. Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the causal agent of Fusarium wilt of chickpea. *J. Plant Pathol.* **2006**, *88*, 67–75.
11. Jiménez-Gasco, M.; Navas-Cortés, J.A.; Jiménez-Díaz, R.M. The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem: A case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *Int. Microbiol.* **2004**, *7*, 95–104. [[PubMed](#)]
12. Ramezani, H. Efficacy of some fungal and bacterial bioagents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on chickpea. *Plant Prot. J.* **2009**, *1*, 108–113.
13. Hayes, W.J.; Laws, E.R. *Handbook of Pesticide Toxicology*; Academic Press Inc.: New Delhi, India, 1991; Volume 1.
14. Abed, H.; Rouag, N.; Mouatassem, D.; Rouabhi, A. Screening for *Pseudomonas* and *Bacillus* antagonistic rhizobacteria strains for the biocontrol of Fusarium wilt of chickpea. *Eurasian J. Soil Sci.* **2016**, *5*, 182–191. [[CrossRef](#)]

15. Al-Ghafri, H.M.; Velazhahan, R.; Shahid, M.S.; Al-Sadi, A.M. Antagonistic activity of *Pseudomonas aeruginosa* from compost against *Pythium aphanidermatum* and *Fusarium solani*. *Biocontrol. Sci. Technol.* **2020**, *30*, 642–658. [[CrossRef](#)]
16. Kumari, S.; Khanna, V. Biocidal mechanisms in biological control of Fusarium wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.) by antagonistic rhizobacteria: A current perspective in soil borne fungal pest management. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **2019**, *8*, 1494–1510. [[CrossRef](#)]
17. Rathore, R.; Vakharia, D.N.; Rathore, D.S. In vitro screening of different *Pseudomonas fluorescens* isolates to study lytic enzyme production and growth inhibition during antagonism of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*, wilt causing pathogen of cumin. *Egypt. J. Biol. Pest Control* **2020**, *30*, 1–8. [[CrossRef](#)]
18. Melo, I.S.; Souza, W.R.; Silva, L.J.; Santos, S.N.; Assalin, M.R.; Zucchi, T.D.; Queiroz, S.D.N. Antifungal activity of *Pseudomonas frederiksbergensis* CMAA 1323 isolated from the Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica*. *Br. Microbiol. Res. J.* **2016**, *14*, 1–11. [[CrossRef](#)]
19. Nelson, P.E.; Toussoun, T.A.; Marasas, W.F.O. *Fusarium oxysporum* Schlecht. Emend. Snyder & Hans. In *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*; The Pennsylvania State University Press: Pennsylvania, PA, USA, 1983; pp. 142–145.
20. Mishra, P.K.; Fox, R.T.; Culham, A. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *218*, 329–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Jiménez-Gasco, M.D.M.; Jiménez-Díaz, R.M. Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology* **2003**, *93*, 200–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hassan, N.; Shimizu, M.; Hyakumachi, M. Occurrence of root rot and vascular wilt diseases in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Upper Egypt. *Mycobiology* **2014**, *42*, 66–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gowsalya, A.; Ponnusami, V.; Sugumaran, K.R. Isolation of bacteria from soil sample for exo-polysaccharide production. *Int. J. Chemtech. Res.* **2014**, *6*, 2925–2928.
24. Cowan, S.T.; Steel, K.J. Diagnostic tables for the common medical bacteria. *Epidemiol. Infect.* **1961**, *59*, 357–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Erdogan, O.; Benlioglu, K. Biological control of Verticillium wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biol. Control* **2010**, *53*, 39–45. [[CrossRef](#)]
26. Dilantha Fernando, W.G.; Linderman, R.G. Inhibition of *Phytophthora vignae* and stem and root rot of cowpea by soil bacteria. *Biol. Agric. Hortic.* **1995**, *12*, 1–14. [[CrossRef](#)]
27. Etebarian, H.-R.; Sholberg, P.L.; Eastwell, K.C.; Sayler, R.J. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Microbiol.* **2005**, *51*, 591–598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Sheeba, J.; Dhamotharan, R.; Baskar, K. Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their antifungal effect on *Rhizoctonia solani* (JG Kühn 1858). *Adv. Plants Agric. Res.* **2017**, *7*, 369–375. [[CrossRef](#)]
29. Zimbro, M.J.; Power, D.A.; Miller, S.M.; Wilson, G.E.; Johnson, J.A. (Eds.) *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media*, 2nd ed.; Becton, Dickinson and Company: Maryland, MD, USA, 2009.
30. Sierra, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Leeuwenhoek* **1957**, *23*, 15–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Khatiwada, P.; Ahmed, J.; Sohag, M.H.; Islam, K.; Azad, A.K. Isolation, screening and characterization of cellulase producing bacterial isolates from municipal solid wastes and rice straw wastes. *J. Bioprocess Biotech.* **2016**, *6*, 280–284. [[CrossRef](#)]
32. Bakker, A.W.; Schippers, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.* **1987**, *19*, 451–457. [[CrossRef](#)]
33. Bric, J.M.; Bostock, R.M.; Silverstone, S.E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 535–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nautiyal, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *170*, 265–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Saravanakumar, K.; Arasu, V.S.; Kathiresan, K. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. *Aquat. Bot.* **2013**, *104*, 101–105. [[CrossRef](#)]
36. Cappuccino, J.C.; Sherman, N. *Microbiology: A Laboratory Manual*, 3rd ed.; Benjamin Cummings Pub. Co.: New York, NY, USA, 1992.
37. Murthy, N.; Bleakley, B. Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. *Internet J. Microbiol.* **2012**, *10*, 1–5. [[CrossRef](#)]
38. Loudon, B.C.; Haarmann, D.; Lynne, A.M. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *J. Microbiol. Biol. Educ.* **2011**, *12*, 51–53. [[CrossRef](#)]
39. Hu, Q.-P.; Xu, J.-G. A simple double-layered Chrome Azurol S Agar (SD-CASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus*. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2011**, *5*, 4321–4327. [[CrossRef](#)]
40. Kaur, R.; Singh, R.S.; Alabouvette, C. Antagonistic activity of selected isolates of fluorescent *Pseudomonas* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Asian J. Plant Sci.* **2007**, *6*, 446–454. [[CrossRef](#)]
41. Zemouli-Benfreh, F.; Djamel-eddine, H.; Merzoug, A. Fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in North-West Algeria. *Afr. J. Agric. Res.* **2014**, *9*, 168–175. [[CrossRef](#)]
42. Townsend, G.R. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Dis. Rep.* **1943**, *27*, 340–343.

43. Bektas, I.; Kusek, M. Biological control of onion basal rot disease using phosphate solubilising rhizobacteria. *Biocontrol Sci. Technol.* **2021**, *31*, 190–205. [[CrossRef](#)]
44. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 5463–5467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Maitlo, S.A.; Rajput, N.A.; Syed, R.N.; Khanzada, M.A.; Rajput, A.Q.; Lodhi, A.M. Microbial control of Fusarium wilt of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Pak. J. Bot.* **2019**, *51*, 2261–2268. [[CrossRef](#)]
46. Trivedi, S.; Srivastava, M.; Ratan, V.; Mishra, A.; Dixit, S.; Pandey, S. Evaluation of microbial consortia on systemic resistance against chickpea wilt. *Bangladesh J. Bot.* **2020**, *49*, 653–661. [[CrossRef](#)]
47. Ankati, S.; Srinivas, V.; Pratyusha, S.; Gopalakrishnan, S. *Streptomyces* consortia-mediated plant defense against Fusarium wilt and plant growth-promotion in chickpea. *Microb. Pathog.* **2021**, *157*, 104961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Bacon, C.W.; Porter, J.K.; Norred, W.P.; Leslie, J.F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 4039–4043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Türkkän, M.; Dolar, F.S. Determination of fusaric acid production by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with thin layer chromatography and spectrophotometric methods. *Anadolu Tarım Bilimleri Derg.* **2010**, *25*, 146–150.
50. Quecine, M.C.; Kidarsa, T.A.; Goebel, N.C.; Shaffer, B.T.; Henkels, M.D.; Zabriskie, T.M.; Loper, J.E. An interspecies signaling system mediated by fusaric acid has parallel effects on antifungal metabolite production by *Pseudomonas protegens* Strain Pf-5 and antibiosis of *Fusarium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 1372–1382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Kumari, S.; Khanna, V. Biological management of vascular wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* by antagonistic rhizobacteria co-inoculated with native *Mesorhizobium*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2018**, *7*, 920–941. [[CrossRef](#)]
52. Vlassi, A.; Nesler, A.; Parich, A.; Puopolo, G.; Schuhmacher, R. Volatile-mediated inhibitory activity of rhizobacteria as a result of multiple factors interaction: The case of *Lysobacter capsici* AZ78. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Anand, A.; Chinchilla, D.; Tan, C.; Mène-Saffrané, L.; L'Haridon, F.; Weisskopf, L. Contribution of hydrogen cyanide to the antagonistic activity of *Pseudomonas* strains against *Phytophthora infestans*. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Attia, M.S.; El-Sayyad, G.S.; Abd Elkodous, M.; El-Batal, A.I. The effective antagonistic potential of plant growth-promoting rhizobacteria against *Alternaria solani*-causing early blight disease in tomato plant. *Sci. Hortic.* **2020**, *266*, 109289. [[CrossRef](#)]
55. Dharni, S.; Maurya, A.; Samad, A.; Srivastava, S.K.; Sharma, A.; Patra, D.D. Purification, characterization, and in vitro activity of 2, 4-di-tert-butylphenol from *Pseudomonas monteilii* PsF84: Conformational and molecular docking studies. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6138–6146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Barka, E.A.; Gognies, S.; Nowak, J.; Audran, J.-C.; Belarbi, A. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biol. Control* **2002**, *24*, 135–142. [[CrossRef](#)]
57. Giorgio, A.; De Stradis, A.; Lo Cantore, P.; Iacobellis, N.S. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1056. [[CrossRef](#)]
58. Zhang, Y.; Li, T.; Xu, M.; Guo, J.; Zhang, C.; Feng, Z.; Peng, X.; Li, Z.; Xing, K.; Qin, S. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 on oxidative stress and mitochondrial dysfunction of *Ceratocystis fimbriata*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2021**, *173*, 104777. [[CrossRef](#)]
59. Verma, S.K.; Kingsley, K.L.; Bergen, M.S.; Kowalski, K.P.; White, J.F. Fungal disease prevention in seedlings of rice (*Oryza sativa*) and other grasses by growth-promoting seed-associated endophytic bacteria from invasive *Phragmites australis*. *Microorganisms* **2018**, *6*, 21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Guevara-Avenidaño, E.; Bejarano-Bolívar, A.A.; Kiel-Martínez, A.-L.; Ramírez-Vázquez, M.; Méndez-Bravo, A.; von Wobeser, E.A.; Sánchez-Rangel, D.; Guerrero-Alanco, J.A.; Eskalen, A.; Reverchon, F. Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* Sp. associated with Kuroshio Shot Hole Borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiol. Res.* **2019**, *219*, 74–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Neilands, J.B. Methodology of siderophores. In *Proceedings of the Siderophores from Microorganisms and Plants; Structure and Bonding*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1984; Volume 58, pp. 1–24. [[CrossRef](#)]
62. Di Francesco, A.; Baraldi, E. How siderophore production can influence the biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* against *Monilinia laxa* on peaches. *Biol. Control* **2021**, *152*, 104456. [[CrossRef](#)]
63. Nabila; Kasiandari, R.S. Antagonistic activity of siderophore-producing bacteria from black rice rhizosphere against rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **2021**, *49*, 217–224. [[CrossRef](#)]
64. Zouari, I.; Masmoudi, F.; Medhioub, K.; Tounsi, S.; Trigui, M. Biocontrol and plant growth-promoting potentiality of bacteria isolated from compost extract. *Antonie Leeuwenhoek* **2020**, *113*, 2107–2122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Dewi, R.T.K.; Mubarik, N.R.; Suhartono, M.T. Medium optimization of  $\beta$ -glucanase production by *Bacillus subtilis* SAHA 32.6 used as biological control of oil palm pathogen. *Emir. J. Food Agric.* **2016**, *28*, 116–125. [[CrossRef](#)]
66. Sharma, D.; Gupta, M.; Gupta, S.; Kashyap, P.L.; Zargar, S.M.; Mallick, S.A. Antibiotic gene specific characterization and ARDRA analysis of native isolates of *Pseudomonas* spp. from Jammu, India. *Indian Phytopathol.* **2018**, *71*, 225–233. [[CrossRef](#)]
67. Arora, N.K.; Khare, E.; Oh, J.H.; Kang, S.C.; Maheshwari, D.K. Diverse mechanisms adopted by fluorescent *Pseudomonas* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 581–585. [[CrossRef](#)]

68. Chiranjeevi, N.; Kumar, M.R.; Padmodaya, B.; Venkateswarlu, N.C.; Sudhakar, P.; Devi, R.S.J.; Sri, P.A. Studies on extraction, evaluation of crude metabolite extract from endophytic *Bacillus subtilis* and its mechanistic effect on chickpea dry root rot causing pathogen *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler. *Pharma Innov.* **2021**, *10*, 898–905.
69. Vessey, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **2003**, *255*, 571–586. [[CrossRef](#)]
70. Varma, P.K.; Kumar, V.K.; Suresh, M.; Chandrasekhar, V.; Bharathalakshmi, M.; Jamuna, P. *Bacillus amyloliquefaciens* (RB19): A potential PGPR in managing sugarcane red rot disease. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2019**, *8*, 2255–2261.
71. Kalayu, G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *Int. J. Agron.* **2019**, *2019*, 4917256. [[CrossRef](#)]
72. Ul Hassan, T.; Bano, A. Construction of IAA-deficient mutants of *Pseudomonas moraviensis* and their comparative effects with wild type strains as bio-inoculant on wheat in saline sodic soil. *Geomicrobiol. J.* **2019**, *36*, 376–384. [[CrossRef](#)]
73. Herlina, L.; Pukan, K.K.; Mustikaningtyas, D. The endophytic bacteria producing IAA (Indole Acetic Acid) in *Arachis hypogaea*. *Cell Biol. Dev.* **2017**, *1*, 31–35. [[CrossRef](#)]
74. Joshi, D.; Chandra, R.; Suyal, D.C.; Kumar, S. Impacts of bioinoculants *Pseudomonas jessenii* MP1 and *Rhodococcus qingshengii* S10107 on chickpea (*Cicer arietinum* L.) yield and soil nitrogen status. *Pedosphere* **2019**, *29*, 388–399. [[CrossRef](#)]
75. Rawat, N.; Sharma, M.; Suyal, D.C.; Singh, D.K.; Joshi, D.; Singh, P.; Goel, R. Psychrotolerant bio-inoculants and their co-inoculation to improve *Cicer arietinum* growth and soil nutrient status for sustainable mountain agriculture. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2019**, *19*, 639–647. [[CrossRef](#)]
76. Gaurav, A.; Pallavi, K.P. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and physiological parameters in chickpea. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2020**, *9*, 29–34.
77. Besset-Manzoni, Y.; Joly, P.; Brutel, A.; Gerin, F.; Soudière, O.; Langin, T.; Prigent-Combaret, C. Does in vitro selection of biocontrol agents guarantee success in planta? A study case of wheat protection against Fusarium seedling blight by soil bacteria. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0225655. [[CrossRef](#)]
78. Hussaini, S.Z.; Shaker, M.; Iqbal, M.A. Isolation of bacterial for degradation of selected pesticides. *Adv Biores* **2013**, *4*, 82–85.
79. Chatterjee, P.; Samaddar, S.; Anandham, R.; Kang, Y.; Kim, K.; Selvakumar, G.; Sa, T. Beneficial soil bacterium *Pseudomonas Frederiksborgensis* OS261 augments salt tolerance and promotes red pepper plant growth. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 705. [[CrossRef](#)]
80. Ferchichi, N.; Toukabri, W.; Boularess, M.; Smaoui, A.; Mhamdi, R.; Trabelsi, D. Isolation, identification and plant growth promotion ability of endophytic bacteria associated with lupine root nodule grown in Tunisian soil. *Arch. Microbiol.* **2019**, *201*, 1333–1349. [[CrossRef](#)]
81. Hong, C.E.; Kim, J.U.; Lee, J.W.; Lee, S.W.; Jo, I.-H. Diversity of bacterial endophytes in *Panax ginseng* and their protective effects against pathogens. *3 Biotech* **2018**, *8*, 1–7. [[CrossRef](#)]
82. Ben Zineb, A.; Trabelsi, D.; Ayachi, I.; Barhoumi, F.; Aroca, R.; Mhamdi, R. Inoculation with elite strains of phosphate-solubilizing bacteria enhances the effectiveness of fertilization with rock phosphates. *Geomicrobiol. J.* **2020**, *37*, 22–30. [[CrossRef](#)]
83. Riera, N.; Handique, U.; Zhang, Y.; Dewdney, M.M.; Wang, N. Characterization of antimicrobial-producing beneficial bacteria isolated from Huanglongbing escape citrus trees. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Swift, R.G. Plant Growth-Promoting Bacteria from Western Australian Soils. Ph.D. Thesis, Murdoch University, Perth, Australia, 2016.

## **Interaction des rhizobactéries symbiotiques (*Rhizobium*) et bactéries antagonistes (*Pseudomonas* et *Bacillus*) avec l'agent du flétrissement fusarien du pois chiche**

### **Résumé**

L'objectif du présent travail est l'étude du pouvoir antagoniste des rhizobactéries envers le *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceris* (Foc) et leur effet stimulateur de la croissance de la culture du pois chiche. L'effet antifongique des rhizobactéries a été évalué *in vitro* contre deux souches Foc, codées Foc-S1 et Foc-S2. Parmi les *Pseudomonas*, les souches E1FP13, E1FP4, et E1PP7 ont été les plus efficaces contre Foc-S1, tandis que les souches E1PP6, E1FP13, et E1PP15 ont été les plus efficaces contre Foc-S2. Concernant les isolats *Bacillus*, les souches E2PB1, E1PB10, et E1PB6 ont été les plus efficaces contre les deux Foc. Par ailleurs, l'examen microscopique a révélé que les bactéries ont provoqué des changements morphologiques dans la structure mycélienne, allant de la granulation et la condensation du cytoplasme à la fragmentation et gonflement des hyphes de Foc. L'appartenance des bactéries aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* a été confirmée à travers le séquençage du gène ARNr 16S et l'analyse phylogénétique. L'évaluation de la production des composés favorisant la croissance des plantes a montré que les souches bactériennes étaient capables de solubiliser le phosphate et de produire l' $\alpha$ -amylase, la lipase, la protéase, la cellulase, le cyanure d'hydrogène, l'acide indole acétique, l'ammoniac et les sidérophores. L'application (individuelle et en consortium avec *Sinorhizobium meliloti*) des souches bactériennes sur les grains de pois chiche a montré que les traitements étaient capables d'améliorer au moins deux des paramètres de croissance mesurés (longueur de la tige, longueur de la racine, poids sec de la tige et poids sec des racines). L'activité de biocontrôle des souches bactériennes a également été évaluée ; les résultats du test ont montré que la gravité de la maladie (GM) était significativement plus faible dans les plantes traitées par rapport aux témoins non traités inoculés par Foc-S1 et Foc-S2. Les résultats de la réduction de la maladie (RM) ont révélé que dans le groupe *Pseudomonas*, le traitement E1FP13c a enregistré la RM la plus élevée, soit 69,23 % dans les pots inoculés par Foc-S1 et 66,67 % dans les pots inoculés par Foc-S2. En ce qui concerne le groupe *Bacillus*, le traitement E1PB6c a été marqué par la plus haute RM égale à 78,85 % dans les pots inoculés par Foc-S1 tandis que le traitement E2PB1c a montré la meilleure RM égale à 76,67 % dans les pots inoculés par Foc-S2. Ceci a été conjugué avec une amélioration significative des paramètres de croissance des plantes par rapport aux témoins non traités. Les résultats de la présente étude suggèrent l'introduction des souches *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Sinorhizobium* dans le programme de protection des semences pour contrôler le flétrissement fusarien et améliorer la croissance des plantes de pois chiche.

**Mots clés :** Foc, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sinorhizobium*, Biocontrôle.