

**UNIVERSITE DE BLIDA1**

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

**Département de Biotechnologies**

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

**Spécialité : Amélioration des productions végétales**

Amélioration de la germination des semences et de la croissance de plantes cultivées par des bactéries initialement endophytes d'espèces spontanées

**Par**

**Nassima AITER**

Devant le jury composé de :

L. ALLAL	Professeur	U. Blida 1	Présidente
C. CHAOUIA	M. C. A	U. Blida 1	Examinatrice
AEK. SAADI	Professeur	U.H.B. Chlef	Examineur
Z. KRIMI	Professeur	U. Blida 1	Promotrice

Blida, Juin 2015

## Remerciements

Mes remerciements les plus chaleureux et profonds à Mme **KRIMI**, Professeur à l'Université de Blida 1 pour sa confiance et ses apports scientifiques et logistiques dans le suivi et la réalisation de mon travail de recherche qui ont été d'une qualité supérieure et fructueuse.

Mes remerciements vont aussi à Mme **ALLAL**, Professeur à l'Université de Blida 1 d'avoir ménagé son temps pour juger et présider ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier Mme **CHAOUIA**, Docteur à l'Université de Blida 1, d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de critiquer et de juger ce travail, Je suis particulièrement reconnaissante et honoré par sa participation au jury de cette thèse.

Mes remerciement vont aussi à Mr **SAADI**, Professeur à l'Université Hassiba Ben Bouali de Chlef, d'avoir accepté, malgré ses préoccupations et ses tâches d'enseignement et d'encadrement, d'examiner et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Un grand merci à mon mari, Mr **HADDAD**, Maitre assistant A à l'Université de Khemis Miliana qui m'a accompagné avec tant d'amour, pour son soutien, sa patience, son aide, et ses encouragements qu'il m'a apportés tout au long de ce travail.

Je voudrais également remercier particulièrement mon collègue **MERBAH**, pour son aide, son soutien et les conseils scientifiques prodigués.

Mes remerciements vont aussi à tous le personnel de laboratoire de culture *in vitro* pour leur politique de proximité et leur compétence.

Je voudrais également remercier mes chères amies **Salima**, **Amina** et **Souhila** membres du laboratoire de la culture *in vitro* de L'ITAF, pour avoir été là tout simplement au quotidien et pour leurs aides et leurs encouragements.

Comme j'adresse mes remerciements aux deux équipes de laboratoire central de l'ITAF et laboratoire de la phytobactériologie de l'Université de Blida 1 pour l'aide qu'elles m'ont apportée pour réaliser ce travail

Un merci tout spécial à Mme **RADJI**, le chef de département du laboratoire central de l'ITAF pour son accueil et son soutien durant la réalisation de ce travail.

Un énorme merci à tous ceux qui m'ont aidé, m'ont conseillé, m'ont ouvert leurs portes, parfois même avec un sourire, et qui se reconnaîtront sans que je n'ai à citer leurs noms. Enfin, que toute personne, qui est de près ou de loin a contribué à la réalisation de ce travail, trouve ici l'expression de ma gratitude et mes remerciements.

## RESUME

L'activité d'une collection de huit souches bactériennes endophytes initialement isolées de plantes spontanées et appartenant aux genres *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. sur la levée et la stimulation de la croissance du blé dur (*Triticum durum* Desf.) cv. Hidab, du concombre (*Cucumis sativus* L.) cv. Marketer et de la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) cv. Marmande a été testée au cours de ce travail.

L'estimation de l'effet de la promotion de la croissance *in vitro* met en évidence la sécrétion d'hormones comme l'AIA et des enzymes telles que la catalase ainsi que la solubilisation du phosphore; la levée et la croissance des plantes. La solubilisation du phosphore a été mise en évidence chez toutes les bactéries endophytes testées, elle varie de 2,07 à 19,56 mg/l). De même, la production d'AIA est un caractère métabolique présent chez les souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* testées, elle varie de 1,59 à 28,02 µg/ml. D'autres traits biochimiques ont été détectés chez ces souches endophytes, comme la production de produits volatils tels que l'HCN et l'ammoniac.

Les résultats des tests de la promotion de la croissance *in planta* montrent une production de l'enzyme ACC désaminase, ainsi qu'un effet phytostimulateur significatif sur la croissance induit par les bactéries endophytes. *Pseudomonas* spp. PS1 se montre comme la souche ayant l'effet le plus marquant sur la phytostimulation des trois espèces étudiées en particulier sur le concombre.

Des gains appréciables ont été obtenus pour l'ensemble des paramètres étudiés enregistrés par la souche *Pseudomonas* spp. PS1. Pour l'ensemble des paramètres étudiés, les vitro-semis bactérisés des trois espèces testées ont révélé une augmentation de la promotion de la croissance comparés aux témoins.

**Mots-clés** : *Bacillus* spp., bactérie endophyte, *in vitro*, *in planta*, promotion de la croissance, *Pseudomonas* spp.

## Abstract

The collection activity of eight endophytes bacterial strains initially isolated from spontaneous plants and pertaining to the kinds *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. on the lifting and the stimulation of the growth of the durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cv. Hidab, of the cucumber (*Cucumis sativus* L.) cv. Marketer and of the tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) cv. Marmande was tested during this work.

The estimation of the promotion effect of *in vitro* growth highlights the secretion of hormones like the AIA and the enzymes such as the catalase as well as the solubilization of phosphorus. The solubilization of phosphorus was highlighted in all the endophytes bacteria tested on solid medium and liquid and varies (2,07 - 19,56 mg/l). In the same way, the production of AIA is a metabolic character present at the stocks of *Bacillus* and *Pseudomonas* tested at varying rates of 1,59 to 28,02 µg/ml. Other biochemical features were detected at these endophytes stocks, like the production of volatile products such as the HCN and ammonia.

The results of the tests in planted show a production of enzyme ACC desaminase, as well as significant a phyto-stimulator effect on the growth induced by the endophytes bacteria. *Pseudomonas* spp. PS1 is shown like the stock having an outstanding effect on the phyto-stimulation of the three species studied in particular on cucumber.

Appreciable profits were obtained for the whole of the studied parameters recorded by the stock *Pseudomonas* spp. PS1. For the whole of the studied parameters, bacterized of the three species tested revealed an increase in the promotion of the growth compared to the controls.

**Key words:** *Bacillus* spp., endophyte bacteria, *in vitro*, *in planta*, promotion of growth, *Pseudomonas* spp.

## ملخص

تمت دراسة هذا العمل بغرض تحديد نشاط مجموعة متكونة من 08 سلالات بكتيرية داخلية، مستخلصة من نباتات تلقائية النمو و تنتمي إلى صنفى *Bacillus* و *Pseudomonas spp.* على إنتاش و تحفيز نمو القمح (*Triticum durum Desf.*) من صنف "هضاب"، الخيار (*Cucumis sativus L.*) من صنف "مركتر" و الطماطم (*Lycopersicum esculentum L.*) من صنف "مرموند".

تقييم تأثير تحفيز النمو مخبريا أظهرت إفراز هرمونات مثل AIA و الأنزيمات مثل كتلاز كذلك إماهة الفسفور التي تعتبر خصائص، لها دخل مباشر أو غير مباشر في إنتاش و نمو النباتات.

تبينت إماهة الفسفور عند كل الأصناف البكتيرية الداخلية المدروسة في وسط صلب و سائل و تتراوح ما بين (2.07 إلى 19.56 ملغ/ل). كذلك إنتاج AIA هي خاصية الأيض موجودة عند أصناف *Bacillus* و *Pseudomonas* المدروسة بقيم تتراوح ما بين (1.58 إلى 28.02 مكغ /مل). تم تحديد خصائص بيوكيميائية أخرى لهذه الأصناف الداخلية المدروسة من إنتاج مواد متطايرة (volatils) مثل HCN و الأمونياك.

أظهرت النتائج التجريبية على النبات إنتاج الأنزيم ACC *désaminase* كذلك له تأثير إيجابي كمحفز على النمو الناتج عن البكتيريا الداخلية.

أظهر *Pseudomonas spp. PS1* أنه السلالة الأكثر تأثير في تحفيز نمو أنواع النباتات الثلاثة التجريبية و خاصة على نبات الخيار. سجلت أرباح معتبرة لجميع المعلمات المدروسة.

السلالات الثمانية المجربة تمكنت من تحفيز نمو الأنواع النباتات الثلاثة المدروسة . في جميع المعلمات التي تمت دراستها، أظهرت النبيتات المخبرية الخاضعة للبكتيريا الداخلية إرتفاعا في تعزيز النمو مقارنة بالشواهد.

**مفاتيح البحث :** تحفيز النمو، البكتيريا الداخلية، *Pseudomonas spp.*، *Bacillus spp.*

*in planta*، *in vitro*

## TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b>	01
<b>RESUME</b>	02
<b>ABSTRACT</b>	03
<b>ملخص</b>	04
<b>TABLE DES MATIERES</b>	05
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX</b>	06
<b>INTRODUCTION</b>	12
<b>CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES BACTÉRIES ENDOPHYTES, LEURS EFFETS SUR LA SANTÉ DE LA PLANTE ET LA PRATIQUE D'UTILISATION EN AGRICULTURE DE LA BIO-FERTILISATION</b>	15
1.1 Endophytes- définitions	15
1. 2 Caractéristiques, origines et voies de pénétration des bactéries endophytes	15
1. 3 Systèmes diazotrophes endophytiques	19
1.4 Exemples d'association bactéries endophytes/plantes	21
1.4.1 Endophytes des plantes ligneuses	21
1.4.2 Endophytes des plantes herbacées	22
1.5 Interaction bactéries endophytes –plantes	23
1.5.1 Promotion de la croissance	23
1.5.1.1 Solubilisation du phosphore	25
1.5.1.2 Production des phytohormones	25
1.5.1.3 Production d'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-deaminase	27

1.5.1.4 Production d'ammoniac	28
1.5.1.5 Production d'hydrogène cyanide (HCN)	29
1.5.1.6 Activité catalase	29
1.5.1.7 Production des sidérophores	30
1.5.2 Réduction de l'incidence des maladies	31
1.5.3 Phytoremédiation	32
1.5.4 Résistance aux différents stress	33
1.5.4.1 Tolérance à la salinité	33
1.5.4.2 Résistance au stress hydrique	33
1.5.4.3 Tolérance au pH	34
1.5.5 Effets sur la physiologie des plantes	35
1.5.6 Résistance aux herbivores	35
1.6 Biofertilisants microbiens et leur utilisation en Agriculture	35
1.6.1 Définition et mode d'action des biofertilisants	35
1.6.2 Caractéristiques et intérêts agronomiques des <i>Pseudomonas fluorescens</i>	36
1.6.3 Caractéristiques et intérêts agronomiques des <i>Bacillus</i> spp.	38
<b>Chapitre 2: Matériels et méthodes</b>	<b>40</b>
2.1 Lieu de l'étude	40
2.2 Matériel biologique	40
2.3 Matériel végétal	41
2.4 Milieux de culture	42
2.5 Mise en culture des souches bactériennes et préparation des suspensions de densité cellulaire connue	42
2.6 Analyse de la production <i>in vitro</i> de métabolites secondaires impliqués dans la promotion de la croissance par les bactéries endophytes testées	44

2.6.1 Solubilisation du phosphore	44
2.6.2 Estimation quantitative de la solubilisation du phosphore	44
2.6.3 Production de l'acide indole acétique (AIA)	45
2.6.4 Estimation de la production d'AIA	46
2.6.5 Production de substances volatiles (HCN)	46
2.6.6 Production d'ammoniac	47
2.6.7 Activité de la catalase	47
2.6.8 Production d'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-deaminase	47
2.7 Etude de la germination et de la promotion de la croissance	48
2.7.1 Préparation de l'inoculum bactérien	48
2.7.2 Désinfection des semences	48
2.7.3 Bactérisation des semences	48
2.8 Evaluation des paramètres de la croissance	49
2.8.1 Taux de germination	49
2.8.2 Les paramètres de croissance (levée)	49
2.8.2.1 Longueur de la tige	50
2.8.2.2 Longueur de la racine	50
2.8.2.3 Poids frais et sec de la partie aérienne	50
2.8.2.4 Poids frais et sec de la partie racinaire	50
2.9 Analyse statistique	50
<b>Chapitre 3:Résultats</b>	<b>52</b>
3.1 Promotion de la croissance <i>in vitro</i> par les bactéries endophytes	52
3.1.1 Quantification de la solubilisation du phosphore	52
3.1.2 Production de l'acide-indole-acétique	54

3.1.3 Cyanogènèse	57
3.1.4 Production d'ammoniac	57
3.1.5 Activité de catalase	58
3.2 Promotion de la croissance <i>in planta</i> par les bactéries endophytes	59
3.2.1 Production d'Aminocyclopropane-1-carboxylate- deaminase (ACC)	59
3.2.2 Evaluation de la croissance	60
3.2.2.1 Taux de germination	60
3.2.2.2 Effet des souches bactériennes sur la longueur moyenne finale de la tige	62
3.2.2.3 Effet des souches bactériennes sur le poids frais moyen de la partie aérienne	63
3.2.2.4 Effet des souches bactériennes sur le poids sec moyen de la partie aérienne	64
3.2.2.5 Effet des souches bactériennes sur la longueur moyenne de la partie racinaire	65
3.2.2.6 Effet des souches bactériennes sur le poids frais moyen des racines	68
3.2.2.7 Effet des souches bactériennes sur le poids sec moyen de la de la partie racinaire	69
3.2.2.8 Evaluation de l'indice de vigueur	70
3.2.2.9 Evaluation des gains des différents paramètres de croissance étudiés <i>in planta</i>	72
<b>Chapitre 4: DISCUSSION</b>	76
<b>CONCLUSION</b>	86
<b>APPENDICES</b>	89
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	100

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1: Application de l'AFP (Autofluorescentprotein) pour l'étude de l'interaction endophyte-plante	16
Figure 1.2: Principales voies de colonisation et de pénétration des bactéries endophytes sur le système racinaire	17
Figure 1.3: Photo au microscope électronique de la surface d'un fruit avec des Bactéries des levures (Y), et des champignons filamenteux (F)	18
Figure 1.4: Espace intercellulaire sous épidermique du Riz ( <i>Oryza sativa</i> L.) colonisé par les bactéries endophytes associatives	20
Figure 1.5: Fixation de l'azote atmosphérique par une bactérie endophyte ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> ) du blé ( <i>Triticum aestivum</i> ) inoculée par une souche de <i>K.pneumoniae</i> fixatrice d'azote (Kp342) et une souche mutée pour la nitrogénase (nifH)	22
Figure 1.6: Illustration des différents mécanismes des PGP (plant growth promotion) et BC (agents de biocontrôle) par les bactéries bénéfiques endophytiques des plants	24
Figure 1.7: Représentation schématique de l'effet de l'absence (gauche) ou de la présence droite) de PGPR producteurs d'ACC désaminase quand la plante subit un stress (biotique ou abiotique	28
Figure 2.1: Dépôt des suspensions bactériennes sur milieu PVK	44
Figure 2.2: Mise en germination de la semence (blé, concombre, tomate)	48
Figure 3.1: Halo de solubilisation autour des huit colonies bactériennes testées	52
Figure 3.2: Evaluation du phosphore soluble par les souches bactériennes endophytes à partir du phosphore bicalcique	53

Figure 3.3: Effet de la solubilisation du phosphore bicalcique par les souches bactériennes endophytes sur le pH du milieu	54
Figure 3.4: Production d'acide indole acétique en présence du tryptophane (sur milieu solide, sur milieu liquide)	55
Figure 3.5: Evaluation de la production de l'AIA par les souches bactériennes endophytes	56
Figure 3.6: Production d'HCN des huit souches bactériennes endophytes testées sur milieu additionné de glycine	57
Figure 3.7: Production d'ammoniac par les huit souches bactériennes endophytes testées	58
Figure 3.8: Réaction catalase des souches bactériennes endophytes testées	59
Figure 3.9: Elongation racinaire après 5 jours d'incubation (blé, tomate)	59
Figure 3.10: Effet de la production d'ACC sur l'élongation racinaire (blé, tomate)	60
Figure 3.11: Germination de la semence (blé, concombre, tomate)	61
Figure 3.12: Effet des souches bactériennes sur le taux de germination (blé, concombre, tomate)	62
Figure 3.13: Effet des souches bactériennes sur la longueur moyenne de la tige (blé, concombre, tomate)	63
Figure 3.14: Effet des souches bactériennes sur le poids frais moyen de la partie aérienne (blé, concombre, tomate)	64
Figure 3.15: Effet des souches bactériennes sur le poids sec de la partie aérienne (blé, concombre, tomate)	65
Figure 3.17: Effet des souches bactériennes sur la longueur moyenne	67

des racines (blé, concombre, tomate)

Figure 3.18: Effet des souches bactériennes sur le poids frais des racines (blé, concombre, tomate) 69

Figure 3.19: Effet des souches bactériennes sur le poids sec des racines (blé, concombre, tomate) 70

Figure 3.20: Effet des bactéries endophytes testées sur l'indice de vigueur du blé 71

Figure 3.21: Effet des bactéries endophytes testées sur l'indice de vigueur du concombre et la tomate 72

Tableau 2.1: Les souches bactériennes endophytes étudiées et leurs espèces végétales d'origine 41

Tableau 3.1: Solubilisation du phosphate bi-calcique par les souches bactériennes endophytes testées 53

Tableau 3.2: Production qualitative et quantitative d'Acide Indole Acétique (AIA) en présence de tryptophane 56

Tableau 3.3: Evaluation des Gains des différents paramètres de croissance étudiés *in planta* 74

## INTRODUCTION

Les terres agricoles abritent une panoplie de microorganismes différents qui peuvent être en interaction ou en symbiose avec les plantes. Certains peuvent provoquer des dommages et des maladies chez les plantes, tandis que d'autres sont bénéfiques et contribuent au développement des cultures.

La capacité des micro-organismes de produire et de sécréter plusieurs métabolites qui permettent la croissance et la santé de la plante est considérée comme l'un des facteurs les plus importants dans la fertilité du sol [1].

L'amélioration des rendements agricoles en quantité et en qualité, passe par l'emploi de fertilisants d'origine chimique comme les engrais minéraux et les régulateurs de croissances des plantes. Même si les résultats de l'application de produits chimiques ont témoigné leurs efficacités, leurs effets négatifs deviennent aujourd'hui une problématique. En outre, des préoccupations croissantes concernant les impacts de ces produits sur la santé humaine et les écosystèmes naturels sont de plus en plus considérées dans le cadre du concept de l'agriculture durable [2].

La fertilisation très répandue dans les pratiques agricoles, bien que généralement très efficace pour augmenter la production végétale, son utilisation a engendré certaines contaminations environnementales. Afin de diminuer ce méfait, plusieurs pratiques de gestion sont envisagées. Parmi celles-ci, on retrouve l'intéressante possibilité de manipuler la flore microbienne car cette dernière qui est reconnue pour son implication dans un bon nombre de processus fondamentaux liés à la fertilité du sol.

Les endophytes sont des microorganismes qui colonisent les tissus internes des plantes sans causer de symptômes apparents, ils jouent un rôle crucial dans les écosystèmes naturels et agricoles en agissant comme biofertilisants, épurateurs, éléments structurants la matrice du sol et agents de lutte biologique [3]. Ils sont

considérés comme le second génome de la plante du fait de leurs capacités à synthétiser des métabolites secondaires très divers et qu'ils constituent relativement une source potentielle pour des fins d'exploitation dans la médecine, la pharmacie, l'industrie, et l'agriculture [4].

Plusieurs bactéries endophytes ont montré leurs effets pour la croissance de la plante et l'augmentation de la disponibilité nutritive en fournissant des phytohormones [5], des composés métaboliques de faible poids moléculaire [6], des enzymes [7], des substances antibiotiques [8] et des sidérophores [9].

Il a été rapporté que les endophytes peuvent augmenter la résistance aux pathogènes qui les rendent particulièrement intéressants pour le contrôle biologique [10]. D'autres effets bénéfiques des endophytes ont été signalés pour les plantes et incluent la fixation d'azote (N<sub>2</sub>) et la solubilisation d'oligoéléments tels que le phosphore (P) [11 ; 12]. L'augmentation de la résistance à la sécheresse [13], la protection thermique [14] et la survie sous stress osmotique [15], l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante, la synthèse des phytohormones ou de vitamines [16], et la diminution de la toxicité des métaux lourds [17] ont également été rapportées comme effets positifs sur la croissance végétale.

Parmi les organismes en faveur de la croissance, la plupart sont des membres apparentés aux genres *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp. qui ont été appliqués à une large gamme d'espèces agricoles dans le but d'augmenter la biomasse et la croissance des plantes ainsi que le contrôle des maladies [18]. Ces études se sont basées sur la bactérisation des plantes cultivées en apportant des populations bactériennes au moment du semis.

Les espèces appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* peuvent produire des phytohormones ou des régulateurs de croissance qui induisent les cultures à former un plus grand nombre de poils absorbants qui ont pour effet d'augmenter la surface d'absorption des racines des plantes pour l'absorption de l'eau et des nutriments. Les phytohormones synthétisées comprennent l'acide indole-acétique, les cytokinines, les gibbérellines et les inhibiteurs de la production d'éthylène. L'acide indole-3-acétique est une phytohormone qui est connue pour être impliquée dans l'initiation de la racine, la division cellulaire, et l'élargissement de la cellule [19]. Cette hormone est très souvent produite par les microorganismes endophytes [20].

D'un point de vue agronomique, les espoirs attendus de ces organismes sont importants à l'échelle mondiale et permettent de substituer une partie des engrais azotés coûteux et polluants. Actuellement, diverses formulations commerciales des organismes microbiens sont en vente. Des formulations bactériologiques de *Rhizobium* spp. et la souche brevetée de *Bacillus subtilis* (MBI600) sont disponibles dans plusieurs pays afin de favoriser la nodulation des légumineuses et de diminuer l'apport de la fertilisation azotée sous forme d'engrais minéraux pour les cultures [21].

En considérant ce qui a été introduit plus haut, notre étude porte sur la recherche d'une activité de promotion de la croissance d'une collection de bactéries endophytes. Les bactéries étudiées appartiennent aux genres ; *Bacillus* et *Pseudomonas*; *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, deux souches apparentées au genre *Bacillus* spp. et deux autres à *Pseudomonas* spp. préalablement identifiées par séquençage de l'ADN ribosomique du 16S [22].

Ces souches bactériennes appartiennent à la collection du laboratoire de phytobactériologie. Ce sont des organismes endophytes isolés de diverses plantes spontanées [22 ; 23].

La recherche des effets de promotion de la croissance des bactéries endophytes a été conduite selon deux essais ; *in vitro* et *in planta* :

L'effet de la promotion de la croissance *in vitro* des huit souches bactériennes endophytes a été réalisé dans le but de rechercher chez ces souches, la capacité de production des métabolites secondaires tels que la solubilisation du phosphore, la production d'acide indole acétique (AIA), la production de l'Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-deaminase, la production de l'ammoniac, la production d'hydrogène cyanide (HCN) et l'activité de la catalase.

Une recherche de l'activité de promotion de la croissance *in planta* de ces mêmes bactéries endophytes sur trois espèces cultivées différentes, à savoir, le blé dur, la tomate et le concombre a été conduite en analysant différents paramètres de la croissance végétale.

## CHAPITRE 1

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES BACTERIES ENDOPHYTES, LEURS EFFETS SUR LA SANTE DE LA PLANTE ET LA PRATIQUE D'UTILISATION EN AGRICULTURE DE LA BIO-FERTILISATION

### 1.1 Endophytes- définitions

L'origine étymologique du mot "endophyte" provient du grec "endo" qui signifie "de dans" et "phyton" "plante", à l'intérieur de la plante. L'usage de ce terme est aussi large que sa définition et le spectre des hôtes ainsi que les organismes qui les habitent (ex : Bactéries, champignons...etc.) [24].

Le terme endophyte a été utilisé pour la première fois par Debary [25] pour décrire les champignons qui colonisent l'intérieur des tissus végétaux des tiges et des feuilles [26].

Les endophytes sont des microorganismes (bactéries et champignons) qui peuvent coloniser et survivre à l'intérieur des tissus d'une plante apparemment saine [27], contrairement aux épiphytes qui se développent à la surface externe [28].

### 1.2 Caractéristiques, origines et voies de pénétration des bactéries endophytes

Les bactéries endophytes vivent dans les tissus de la plante sans lui apporter de préjudices et bénéficient d'autres avantages en plus de la résidence [29]: tel que mentionné dans les travaux de Paulitz et Belanger [30], les bactéries endophytes appartenant au groupe des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif ont été isolées à partir de nombreuses espèces végétales.

La diversité des endophytes bactériens cultivables est liée non seulement à la variété des espèces végétales colonisées, mais aussi par rapport aux nombreux taxons impliqués, dont la plupart appartiennent aux genres bactériens telluriques

comme les *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus* et *Azospirillum* (figure 1.1) [31].

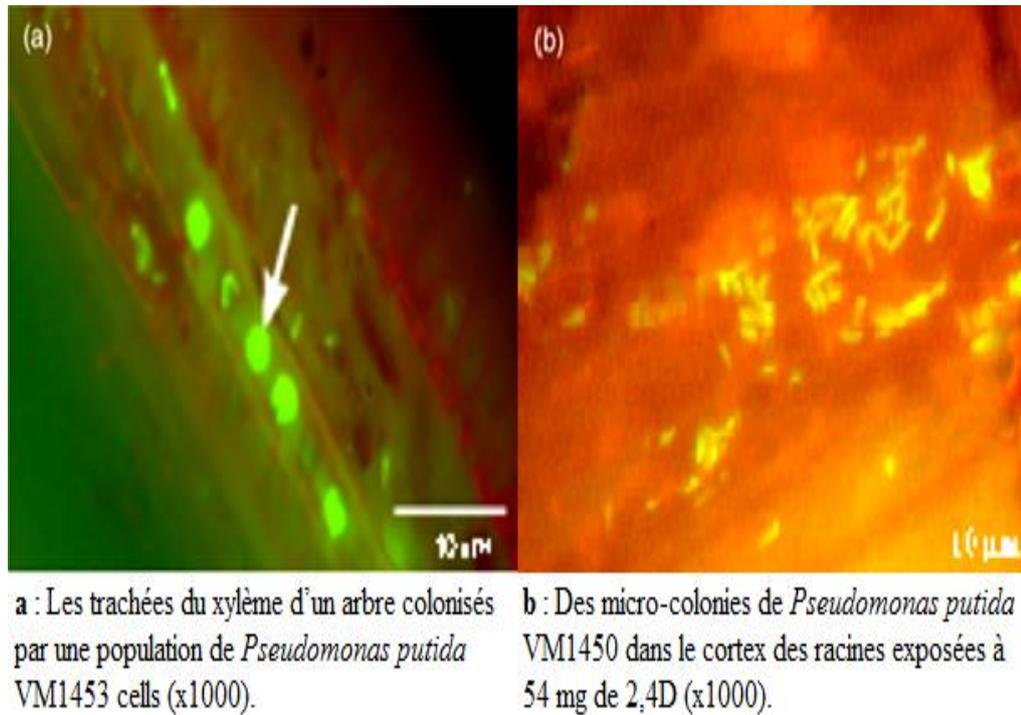


Figure 1.1: Application de l'AFP (Autofluorescentprotein) pour l'étude de l'interaction endophyte-plante [32].

Un inventaire des bactéries endophytes publiées a été rapporté par Hallmann et ses associés [28], mais la liste n'est pas complète, car il y'a beaucoup d'intérêt dans ce domaine et de nouveaux endophytes sont constamment signalés. La plupart des plantes cultivées ou non appartenant à diverses familles botaniques peuvent être hébergées par des endophytes bactériens.

Les endophytes entrent dans les tissus végétaux principalement par la zone racinaire. Cependant, les parties aériennes des plantes comme les fleurs, les tiges et les cotylédons peuvent également être des voies d'entrée aux bactéries [29].

Certaines bactéries sont capables de pénétrer à travers les stomates comme cela a été montré pour *Gluconobacter diazotrophicus* sur la canne à sucre [33] et pour les *Streptomyces galbus* sur rhododendron [34]. Dans ce dernier cas, la production d'enzymes non spécifiques dégradant la cire aurait pu faciliter la colonisation de la surface de la feuille et la mise en place ultérieure de ce microorganisme endophyte [34].

Les emplacements préférés de la fixation des bactéries et l'entrée fréquente sont, la zone apicale des racines avec la couche à paroi mince de la surface racinaire, la zone de chevelure de la racine (zone de pénétration active) et la zone de la racine basale au profil de petites fissures causées par l'émergence des racines latérales (zone de pénétration passive) (figure 1.2). Sur ces sites, les bactéries sont souvent disposées en microcolonies comprenant plusieurs centaines de cellules [35].

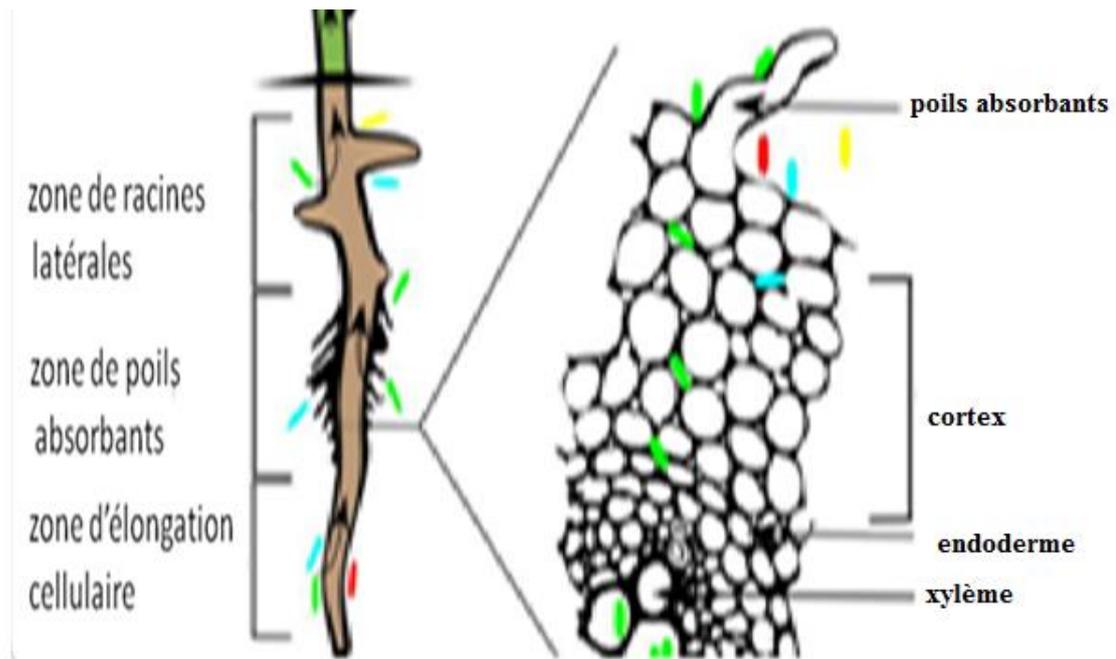


Figure 1.2: Principales voies de colonisation et de pénétration des bactéries endophytes sur le système racinaire [35].

Les feuilles et autres parties aériennes abritent de nombreuses espèces bactériennes et fongiques sous forme de levures, de champignons filamenteux ou encore de spores en dormance (figure 1.3) [36].



Figure 1.3: Photo au microscope électronique de la surface d'un fruit avec des bactéries (B), des levures (Y), et des champignons filamenteux (F) [37].

Il est probable que la concentration des éléments nutritifs dans le xylème diminue le long de l'axe de la plante. Cela peut expliquer le fait que la densité de la population de bactéries endophytes et leur diversité diminue avec la distance de la racine et que seul un petit nombre de bactéries atteint les parties supérieures des pousses, feuilles et les organes reproducteurs tels que, les fleurs, les fruits et les graines [38].

Diverses microflores endophytes bactériennes ont été isolées dans plusieurs parties asymptomatiques des plantes (feuilles, tiges, graines) [38] et par visualisation microscopique [39]. Plus probablement, les cellules bactériennes pénètrent dans les organes reproducteurs à travers les tissus vasculaires de la plante. Il est également possible que si l'une des cellules reproductrices (cellule d'ovule ou de gamètes mâles) porte un microorganisme, l'embryon résultant de l'endosperme peut être colonisé ce qui explique le transfert vertical des endophytes de la plante à la graine [40].

Beaucoup de graines portent une diversité d'endophytes [41]. En étant transmis par les semences, les endophytes assurent leur présence dans de nouvelles plantes qui se propagent par voie végétative, comme cela a été décrit chez la pomme de terre et la canne à sucre et peuvent transmettre leurs endophytes à la prochaine génération sans passer par le processus d'infection.

La richesse de la rhizosphère en sucres, acides aminés, acides organiques, isoflavonoïdes, régulateurs de croissance et en enzymes libérés par la plante rend ce

microenvironnement un site d'une remarquable activité biologique et d'une richesse naturelle en vers de terre, nématodes, protozoaires, champignons, algues et bactéries [42]. Ce qui laisse déduire que la plupart des bactéries endophytes proviennent de la rhizosphère [43].

### 1.3 Systèmes diazotrophes endophytiques

Les microorganismes capables de fixer biologiquement l'azote sont appelés "diazotrophes" ou "diazotrophiques" puisqu'ils réduisent l'azote moléculaire ( $N_2$ ) en ammonium ( $NH_4$ ) grâce à leur activité enzymatique spécifique, par action de la nitrogénase.

Les bactéries endophytes sont réparties en trois groupes distincts: symbiotiques, associatifs et autotrophes dont deux sont les plus connus et étudiés [44]. Il s'agit en l'occurrence, des bactéries endophytes symbiotiques caractérisées par leur localisation à l'intérieur d'une structure spécifique dite nodosité et des bactéries endophytes associatives qui se logent dans les espaces intercellulaires [44].

Le système diazotrophique endophyte symbiotique est communément qualifié de symbiose fixatrice d'azote. Il est illustré par des associations symbiotiques et spécifiques établies entre les couples de bactéries type Rhizobia, des plantes légumineuses et des actinomycètes du genre *Frankia* avec des plantes actinorhiziennes telles que celles appartenant au genre *Casuarina*.

Dans le cas des Rhizobia, le tissage de la symbiose a lieu à l'intérieur des cellules corticales des racines donnant une bêtaïne et un acide aldonique, signe d'initiation de la symbiose, une structure nodulaire où les diazotrophes sont hébergés [45]. A l'intérieur de ces structures, les bactéries sont différenciées en bactéroïdes capables de réduire l'azote moléculaire en ammonium assimilable. En contre partie, la plante assure l'approvisionnement du bactéroïde en carbone résultant de la photosynthèse [46]. Ce processus débute par la sécrétion des exsudats racinaires riches en flavonoïdes.

Le système diazotrophique endophyte associative englobe toutes les bactéries diazotrophes vivant en étroite association avec la plante hôte et fixant directement l'azote dans les espaces intercellulaires (figure 1.4), sans être transformées en bactéroïdes. Elles sont également qualifiées de fixateurs non symbiotiques [47].

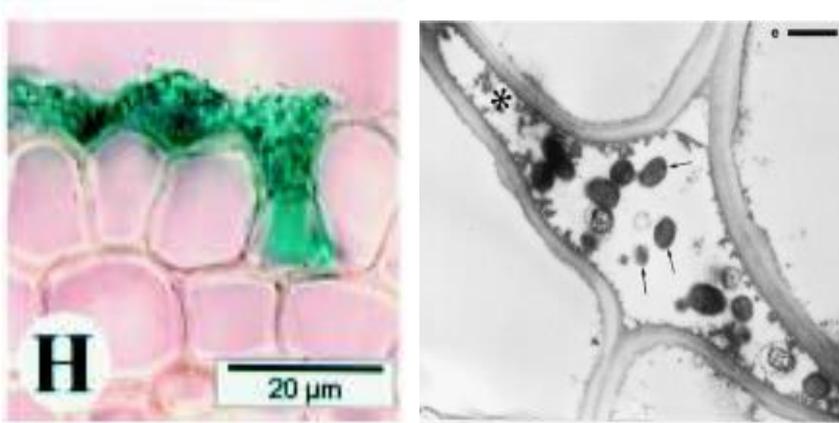


Figure 1.4 : Espace intercellulaire sous épidermique (apoplaste) du Riz (*Oryza sativa* L.) colonisé par des bactéries endophytes associatives [48].

La plupart de ces bactéries identifiées jusqu'à présent font partie des espèces appartenant aux genres, *Azospirillum*, *Acinetrobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Lavobacterium*, *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Azorhizobium* [47].

Il est rare que les bactéries endophytes pénètrent dans les cellules végétales et provoquent la formation de structures morphologiques spécifiques comme font les bactéries des nodules des racines. Toutefois, récemment, Huang et *al.* [49] ont montré que *Bacillus subtilis* GXJM08 colonise la racine de la plante légumineuse *Robinia pseudoacacia* L. dans un mode similaire à celui utilisé par le genre *Rhizobium*. Les changements les plus spectaculaires comprennent (i) la déformation des poils absorbants de la racine (gonflement, ramification dichotomique), (ii) le développement de fils d'infection par des bactéries entre les parois cellulaires des cellules corticales des racines, et (iii) la formation de bactéroïdes à l'intérieur de la cellule corticale de la plante.

Une fois que les cellules bactériennes ont franchi la barrière exodermique, elles peuvent rester sur le site d'entrée, comme il a été montré pour *Baenibacillus polymyxa* sur *Arabidopsis* ou se déplacer plus à l'intérieur et occuper l'espace intercellulaire du cortex. Seules quelques bactéries sont capable de pénétrer dans la barrière endodermique et d'envahir les vaisseaux du bois [50 ; 51].

Cela se produit généralement à travers les cellules endodermiques non subérisées dans la zone apicale des racines et / ou dans la zone de la racine de la

base, où les racines latérales émergentes interrompent la continuité de la bande de Caspari dans la paroi des cellules endodermiques.

Plusieurs tentatives ont été faites pour trouver les sources de carbone qui pourraient être crucial pour la vie des endophytes [52]. Shishido et ses collaborateurs [53], ont comparé les profils du carbone des souches endophytes *Paenibacillus polymyxa* PW-2R et *Pseudomonas fluorescens* Sm-3RN, qui étaient capables de métaboliser le D-sorbitol et l'acide D galacturonic tandis que les souches de la rhizosphère étaient dépourvues de cette propriété.

Il a été constaté que contrairement à la plupart des bactéries rhizosphériques, des souches de *Pseudomonas* spp. endophytes isolées à partir de plants de concombre ont pu utiliser l'arabinose, un des sucres disponibles le plus abondamment dans le fluide du xylème de diverses plantes [52].

Dans une autre étude, l'expression bactérienne induite de plusieurs gènes codant pour l'alcool déshydrogénase a été détectée à l'intérieur des racines de riz au cours de leur colonisation par *Azoarcus* sp. BH72. Les souches mutantes avec des gènes codant pour perturber l'alcool déshydrogénase colonisent l'intérieur de la racine moins efficacement que le type sauvage [54].

#### 1.4 Exemples d'association bactéries endophytes/plantes

##### 1.4.1 Endophytes des plantes ligneuses

En forêt naturelle, les arbres interagissent avec des myriades de microorganismes tels que les champignons et les bactéries [55].

Les plantes actinorhiziennes représentent environ 200 espèces réparties en 24 genres dans huit familles chez les Angiospermes [56]. Presque tous les genres peuvent être nodulés par *Frankia* chez les familles de *Casuarinaceae*, *Coriariaceae*, *Eleagnaceae*, *Datisticaceae* et *Myricaceae*, alors que la nodulation se produit moins souvent chez les *Betulaceae*, *Rhamnaceae* et *Rosaceae* [57].

Les travaux sur la promotion de la croissance de semis d'espèces ligneuses par des bactéries avant 1989 sont rares, seuls les auteurs Pokojska-Burdziej [58] et Parker et Dangerfield [59] ont respectivement étudié l'effet PGPR sur *Pinus sylvestris* et *Pseudotsuga menzesii*. Depuis lors, les études sur les inoculants bactériens pour les conifères ont augmenté et la promotion de la croissance des espèces du genre

*Pinus*, *Picea*, *Tsuga* et *Pseudotsuga* ont été les plus étudiées [60 ; 61]. Les bactéries utilisées pour ces fins appartiennent principalement aux genres *Bacillus* [62], *Pseudomonas* [63] et *Arthrobacter* [64]. Les bactéries endophytes du genre *Frankia* (à Gram positif, filamenteuses et sporulantes) nodulent les plantes ligneuses appartenant à différentes familles de dicotylédones, dont les genres *Alnus*, *Eleagnus*, *Casuarina* ou *Myrica* [65].

#### 1.4.2 Endophytes des plantes herbacées

Les bactéries endophytes se trouvent dans les racines, tiges, feuilles, graines, fruits, les tubercules, les ovules et aussi à l'intérieur des nodules de légumineuses [66]. C'est le cas des systèmes associant des plantes de la famille des légumineuses et certaines bactéries à Gram négatif, communément appelées les Rhizobia ou bactéries nodulant les légumineuses (*Fabaceae*) [67].

Plusieurs études ont mis en évidence un effet promoteur sur la croissance des plantes par une contribution en apport azoté des bactéries endophytes lors des interactions entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* et la canne à sucre [68], *Azoarcus* sp. BH72 souche colonisant le riz [69] et la graminée *Leptochloa fusca* L. Kunth [70] ou encore *Klebsiella pneumoniae* 342 et le blé [71] (figure 1.5).

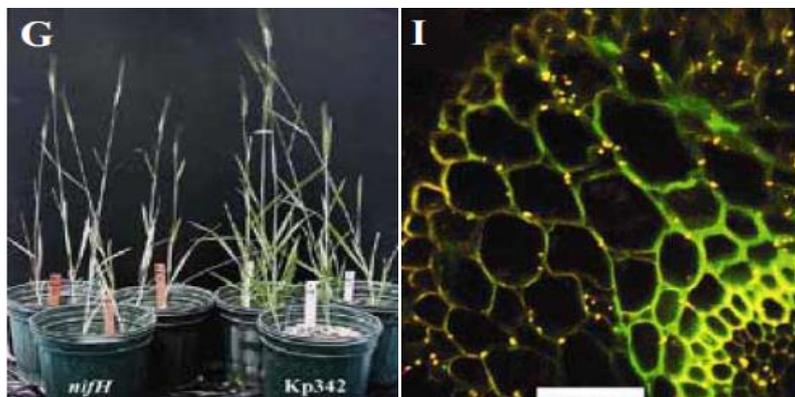


Figure 1.5 : Fixation de l'azote atmosphérique par une bactérie endophyte (*Klebsiella pneumoniae*) du blé (*Triticum aestivum*) inoculée par une souche de *K. pneumoniae* fixatrice d'azote (Kp342) et une souche mutée pour la nitrogénase (nifH) et donc incapable de fixer l'azote. I: Immunolocalisation de la protéine NifH (en jaune) dans une section de racine colonisée par Kp342 (en vert). Les bactéries exprimant la nitrogénase (NifH) et donc fixant l'azote apparaissent (en jaune). Barres = 50µm [71].

En 2001, Garbeva et ses collaborateurs [72] ont suivi des populations d'endophytes de pomme de terre par PCR-électrophorèse sur gel. Leurs résultats suggèrent la présence d'endophytes non cultivables dans les tissus de la pomme de terre. Dans les expériences précédentes, l'analyse par T-RFLP ainsi que par séquençage des gènes d'ARNr 16S, ont permis de trouver un large spectre phylogénétique de bactéries endophytes capables de coloniser les plantes de pomme de terre, y compris les membres de l'embranchement des Proteobacteria ( $\alpha$  Proteobacteria,  $\beta$  Proteobacteria,  $\gamma$  Proteobacteria) ainsi que les bactéries à Gram positif, le groupe des Flexibacter-Cytophaga et les Planctomycetales [73].

Des corrélations à la promotion de la croissance des plants de tomate ont été observées à des niveaux d'inoculations qui ont permis de confirmer cette propriété chez des populations endophytes mais pas chez les populations rhizosphériques [74]. Par ailleurs, une étude a montré que le genre *Rhizobium* a été trouvé comme un endophyte naturel des plantes de maïs dans les champs agricoles traditionnels, dans lesquels le maïs et le haricot ont été cultivés en association [75].

## 1.5 Interaction bactéries endophytes –plantes

### 1.5.1 Promotion de la croissance

La promotion de la croissance des plantes (PGP) a été démontrée chez de nombreuses bactéries endophytes [51]. Les bactéries endophytes présentent plusieurs mécanismes par lesquels elles peuvent promouvoir la croissance et la santé des plantes. Elles augmentent la croissance de la plante grâce à l'amélioration de l'apport en nutriments et en minéraux, la résistance aux agents pathogènes et la production agricole [76] (figure1.6).

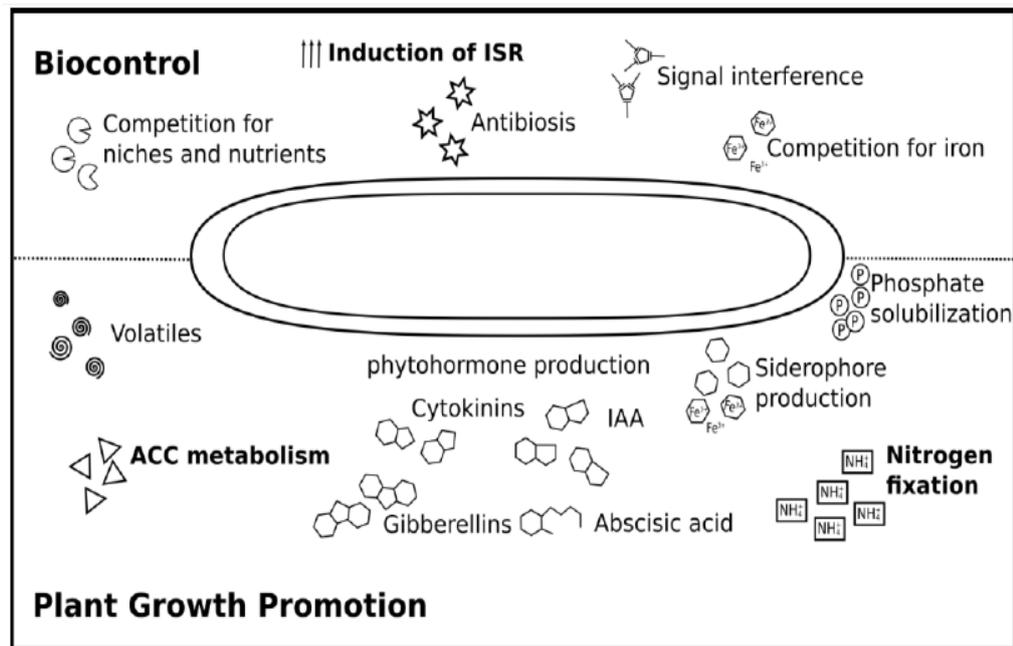


Figure 1.6 : Illustration des différents mécanismes des PGP (plant growth promotion) et des BC (agents de biocontrôle) par les bactéries bénéfiques endophytiques des plantes [76].

Les bactéries endophytes stimulent la croissance des plantes par un certain nombre de mécanismes. Il s'agit notamment de la solubilisation du phosphore [77] et la production d'acide indole acétique [78].

Les organismes endophytes peuvent également fournir des vitamines indispensables aux plantes [79]. En outre, d'autres effets bénéfiques sur la croissance des plantes ont été attribués aux endophytes et incluent l'ajustement osmotique, la régulation stomatique, la modification de la morphologie des racines, l'induction de la résistance systémique acquise (SAR) de l'hôte ou encore l'amélioration de la disponibilité des minéraux [80].

Des travaux ont montré que comme pour les bactéries rhizosphériques, la présence d'endophytes bactériens chez les plantes génère une activité de promotion de la croissance des plantes. Cette dernière activité est le résultat de la production de phytohormones, de l'implication des enzymes dans le métabolisme, des régulateurs de croissance, tels que l'éthylène, l'acide 1-aminocyclopropane- le 1-carboxylique (ACC) deaminase, les auxines, l'acétoïne, le 2,3-butanediol et les cytokinines [81].

La stimulation de la croissance par les bactéries endophytes peut être aussi une conséquence de la fixation d'azote [71], de produits volatils tels que le 2-3 butanediol et l'acétoïne produits par les bactéries et qui semblent être un mécanisme responsable de la promotion de la croissance végétale [82].

#### 1.5.1.1 Solubilisation du phosphore

Le phosphore est un élément indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes. Il joue un rôle essentiel dans le transfert de l'énergie nécessaire à la croissance et à l'amélioration de la production des plantes.

La concentration du phosphore dans le sol, varie de 200 à 5000 ppm soit 0,02 à 0,5% [83]. Cependant, une grande partie du phosphore inorganique soluble appliqué au sol comme engrais chimique est immobilisée rapidement et devient non disponible pour les plantes [84]. L'enrichissement du sol en P suite à des applications de fertilisants, dépend des caractéristiques physico-chimiques de chaque sol. Dans les sols acides, les oxydes libres et les hydroxydes d'aluminium et de fer fixent le phosphore, tandis que dans les sols alcalins, il est fixé par le calcium, ce qui rend le fertilisant peu efficace.

Dans les sols agricoles, la solubilisation de phosphore inorganique est étroitement liée à l'activité des micro-organismes du sol. Plusieurs rhizobactéries promotrices de la croissance telles que les *Rhizobia*, les *Pseudomonas* et les *Bacillus*, ont été décrites comme étant des bactéries solubilisatrices du phosphore (PSB) [85]. En effet, certaines souches bactériennes chimiotrophes tirent leur énergie de l'oxydation de certains éléments chimiques avec production d'acides, alors que certains chercheurs associaient la solubilisation du phosphore à une baisse du pH du milieu [86 ; 87].

#### 1.5.1.2 Production des phytohormones

L'implication directe des bactéries endophytes dans l'amélioration de la croissance et le développement des plantes *via* la production de diverses phytohormones, est une propriété largement reconnue [88].

Les espèces d'*Azospirillum* inoculées à diverses plantes ont pu stimuler la production des auxines, des acides gibbérelliques et des cytokinines [89]. L'apport de l'inoculum de *Gluconobacter diazotrophicus* chez la canne à sucre a eu des

effets positifs sur la production des phytohormones activant ainsi le développement de la biomasse dont bénéficie toute la plante [68].

Des résultats similaires ont été trouvés chez le riz inoculé avec *Serratia meliloti* et *Azoarcus caulinodans*. Contrairement aux témoins, leur présence dans la plante a provoqué une accumulation significative des AIA et GA3 dans les racines et les feuilles [90].

Les travaux ont montré que les endophytes induisent non seulement la production des phytohormones exogènes, mais aussi, l'élévation du niveau d'hormones endogènes chez les plantes céréalières [91]. Rodelas et al [92] ont rapporté que les endophytes microbiens synthétisent et diffusent au profit de la plante des composés chimiques promoteurs de la croissance comme les phytohormones (auxines, cytokinines et gibbérellines), les riboflavines et les vitamines (thiamine et l'acide pantothénique), ce qui suggère que ces composés peuvent être des molécules candidates pour favoriser la croissance des plantes.

L'AIA est une phytohormone qui est connue pour être impliquée dans l'initiation de la racine, la division cellulaire et l'élargissement de la cellule. Les bactéries produisant de l'AIA sont sensés augmenter la croissance des racines et la longueur des racines, ce qui entraîne une plus importante zone racinaire qui permet à la plante d'accéder à plus de nutriments du sol [93].

L'AIA, montre aussi son effet positif sur la rhizogénèse [94]. Il régule l'expression de gènes associés à la biosynthèse ou le catabolisme et la signalisation d'autres hormones [95]. Par ailleurs, il est impliqué dans la résistance mais aussi dans la sensibilité des plantes lors de stress biotiques [96].

Les gibbérellines favorisent la croissance des plantes par la stimulation de la dégradation des protéines DELLA. Ces dernières induisant l'expression de gènes codant des enzymes de détoxification (catalases et peroxydases) dont le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) constitue la forme la plus stable, régulant ainsi les taux de formes actives d'oxygène (FAOs) lors de réactions de stress [97].

Les cytokinines quant à elles, sont impliquées dans la différenciation vasculaire, la balance en nutriments, la croissance des racines, des tiges et des inflorescences et la sénescence foliaire [98].

### 1.5.1.3 Production d'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-deaminase

Les contraintes environnementales peuvent être la cause de la production d'éthylène hormonal chez les plantes et qui se traduit par des réactions d'inhibition de la croissance. Habituellement, l'éthylène est une hormone végétale qui empêche l'allongement de la racine. De nombreuses bactéries du sol codent pour une déaminase (gène *acdS*) qui dégrade le précurseur direct de l'éthylène, à savoir l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) [99].

Certaines bactéries produisent des ACC désaminases qui dégradent l'ACC réduisant ainsi la formation d'éthylène chez les plantes. C'est de cette manière qu'*Achromobacter piechaudii* induit une tolérance systémique contre la sécheresse et le sel et favorise la croissance des plantes [100].

Toutefois, certaines souches de *Pseudomonas* possèdent le gène de l'ACC désaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) qui est impliqué dans l'amélioration de la croissance de la plante hôte [101]. Cette enzyme peut cliver le précurseur de l'éthylène l'ACC et ainsi réduire le taux d'éthylène dans la plante (figure 1.7).

De même, l'ACC désaminase est une enzyme multimérique qui clive l'ACC à  $\alpha$ -cétobutyrate et de l'ammoniac et diminue ainsi les niveaux d'éthylène dans les plantes hôtes [102].

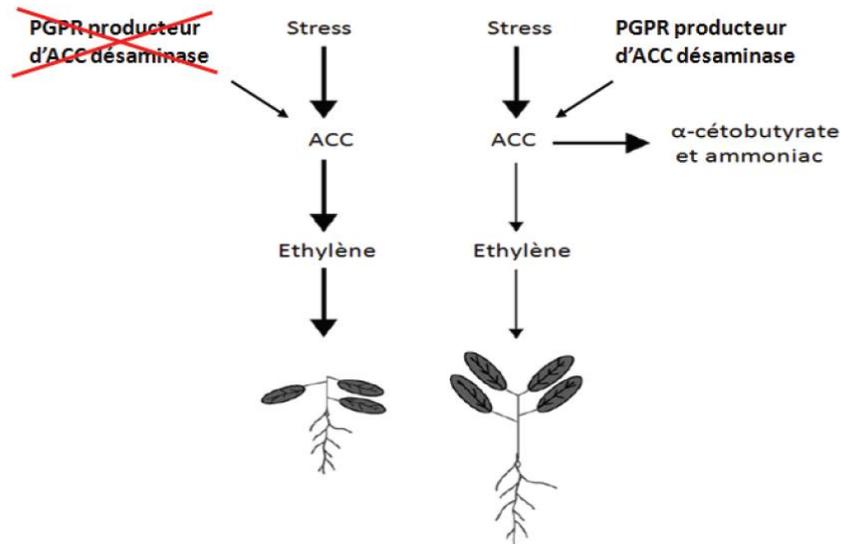


Figure 1.7: Représentation schématique de l'effet de l'absence (gauche) ou de la présence droite) de PGPR producteurs d'ACC désaminase quand la plante subit un stress (biotique ou abiotique). La taille des flèches indique le degré relatif du flux [101].

#### 1.5.1.4 Production d'ammoniac

La fixation biologique qui représente 65% de la fixation d'azote annuelle est assurée par des bactéries diazotrophes qui possèdent le complexe enzymatique de la nitrogénase, responsable de la réduction de l'azote moléculaire. Ce complexe est constitué de deux métalloprotéines qui comportent trois groupements prosthétiques différents. La protéine I est un hétérotétramère de 220 kDa contenant quatre sous-unités ( $\text{Fe}_4\text{S}_4$ ) et un cofacteur composé de fer et de molybdène (FeMo-co) qui est le site catalytique de la réaction de réduction du  $\text{N}_2$  [103].

La protéine II est un homodimère de 60 kDa comportant un simple groupe  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  qui est réduit grâce à un donneur d'électron, le plus souvent la ferrédoxine. La fixation d'ATP provoque un changement de conformation de la protéine II, qui s'associe à la protéine I pour former la nitrogénase active. Les électrons sont transférés vers le composant I, grâce à l'hydrolyse du MgATP; quatre cycles sont nécessaires pour la réduction d'un  $\text{N}_2$  en deux  $\text{NH}_3$ . La nitrogénase catalyse également la réduction d'analogues stériques de l'azote, comme l'acétylène [104].

#### 1.5.1.5 Production d'hydrogène cyanide (HCN)

La biosynthèse de métabolites secondaires, tel que l'HCN a été démontrée chez un nombre restreint d'espèces bactériennes, comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Chrobacterium violaceum* [105]. Elle est influencée par plusieurs facteurs environnementaux incluant le fer, le phosphore et les concentrations en oxygène [106].

Bien que la formation de cyanure d'hydrogène par les bactéries soit connue depuis de nombreuses années [107], les données quantitatives sur la capacité de production de l'HCN de nombreuses espèces sont souvent absentes. Les micro-organismes cyanogènes sont capables de mobiliser le fer, le cuivre, le nickel, l'argent, l'or et le platine [108]. Les glycosides cyanogènes jouent généralement le rôle protecteur contre les herbivores par la libération d'HCN et des cétones à partir du tissu végétal blessé [109].

La glycine est un précurseur direct de cyanure qui est formée par décarboxylation oxydative. Typiquement, le cyanure est principalement formé au cours d'une brève période de croissance bactérienne et plus spécialement durant la phase stationnaire [106]. De plus, l'HCN synthétase est l'enzyme responsable de la production d'HCN et de CO<sub>2</sub> à partir de la glycine [110].

#### 1.5.1.6 Activité catalase

La catalase est une enzyme qui scinde une molécule de peroxyde d'hydrogène en une molécule d'oxygène et une molécule d'eau. L'addition d'une goutte d'eau oxygénée sur une lame contenant une préparation bactérienne, provoque un dégagement de molécules d'O<sub>2</sub> qui se traduit par une formation des petites bulles d'air [111]. La catalase décompose l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en oxygène moléculaire sans besoin de réducteurs et donc peut offrir à la plante un mécanisme de dégradation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> efficace nécessitant un minimum d'énergie. Parallèlement, elle entraîne une augmentation du taux d'oxygène [112].



Les catalases des plantes supérieures sont des hémoprotéines tétramériques qui existent en multiples isozymes codées par des gènes nucléaires; elles interviennent dans divers processus physiologiques: le développement, la défense et la sénescence [113].

L'expression des catalases est affectée par plusieurs facteurs environnementaux tels que la lumière [114], l'ozone [115], la température [116], la salinité [117] et les blessures [118]. Le rôle des catalases dans la défense contre les agents pathogènes a été étudié à l'aide des plantes transgéniques montrant une surexpression ou une diminution de l'expression de cette enzyme [119].

L'implication des systèmes antioxydants dans les interactions plantes-agents pathogènes a été étudiée chez des plantes infectées par des parasites différents (champignons, bactéries et virus); de leur stratégie d'attaque (parasites biotrophes, nécrotrophes, extra- ou intra-cellulaires); ou de leur virulence [120].

La variation de l'activité catalase suite à l'infection dépend du pathosystème étudié. En effet, une augmentation de l'activité catalase a été observée chez l'orge suite à l'inoculation par une race avirulente de *Blumeria graminis* [121]. Une corrélation positive a été trouvée entre l'activité catalase dans l'embryon immature du maïs et la résistance à *Aspergillus flavus* [122]. Le gène Cat2St chez la pomme de terre a été induit suite à l'infection par une espèce de nématode et de bactérie phytopathogène [123]. Une augmentation de l'activité catalase a été mise en évidence chez *Aabidopsis thaliana* et *Pseudomonas syringae* [124]. L'endophyte bactérien de la pomme de terre *Pseudomonas* spp. a montré une résistance accrue à l'égard des agents pathogènes de *Pectobacterium atrosepticum* par amorçage des réactions de défense de l'hôte, avec l'activité enzymatique et le système antioxydant de la plante produisant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la peroxydase de gaïacol (GPOX) et de l'ascorbate peroxydase (APX) [125 ; 126].

#### 1.5.1.7 Production des sidérophores

Les sidérophores sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire, compris entre 200 et 2000 daltons, dont le rôle est de solubiliser, de chélater et d'extraire le fer ferrique de nombreux complexes minéraux ou organiques et de le rendre ainsi accessible aux microorganismes [127].

Les sidérophores sont synthétisés et sécrétés pour la solubilisation d'ions ferriques par des microorganismes aérobies, tels que les bactéries, certains champignons mais aussi les organismes supérieurs en réponse à des conditions de carence en fer [128].

Les sidérophores sont très importants pour la croissance et la survie des bactéries dans le sol et les environnements aqueux [129]. Après sécrétion par la bactérie, les sidérophores chélatent avec une haute affinité le fer dans l'environnement extracellulaire et le transportent via des voies d'assimilation spécifiques [130].

#### 1.5.2 Réduction de l'incidence des maladies

La suppression des maladies des plantes due à l'action de microorganismes endophytes a été démontrée dans plusieurs pathosystèmes [131].

Plusieurs mécanismes peuvent contrôler cette suppression, soit directement à l'intérieur de la plante sur l'agent pathogène par l'antibiose [132], la production de composés antimicrobiens [133], la compétition pour les nutriments [134], ou indirectement par l'induction de la réponse de la résistance des plantes [135], la production de sidérophores [136] et la dégradation accrue de plusieurs polluants [137].

Récemment, des études ont montré que les bactéries colonisant l'intérieur des plantes sont capables de promouvoir la croissance des plantes et contribuent à la suppression des agents pathogènes [138]. Les compétitions entre les bactéries endophytes et les agents pathogènes sont observées en raison de la disponibilité limitée des nutriments à l'intérieur des tissus végétaux. Cette propriété est due essentiellement au fait que les champignons et les bactéries endophytes produisent des molécules antibiotiques [139]. En outre, la production de substances antimicrobiennes, telles que les antibiotiques ou l'HCN, est un mécanisme important de lutte contre les phytopathogènes [140].

Les endophytes inhibent et tuent efficacement les champignons et les bactéries en produisant un mélange de composés volatils [141]. A titre d'exemple, l'inhibition *in vitro* du flétrissement du chêne causé par *Ceratocystis fagacearum* a été obtenue avec 183 bactéries endophytes sur 889 isolats testés [142]. Les endophytes appartenant au groupe des *Actinobactéries* sont des *antagonistes* efficaces du champignon pathogène du blé *Gaeumannomyces graminis* [143], et plusieurs endophytes ont montré également un antagonisme contre *Rhizoctonia solani* [144]. Les endophytes bactériens sont capables de supprimer la prolifération des nématodes, ce qui peut profiter d'autres cultures en rotation avec

les plantes hôtes [145]. A titre d'exemple, les populations de nématodes élevées ont été réduites dans la fétuque inoculée par les endophytes à la fois dans la culture en pot et en essai sur le terrain [146]. Les endophytes bactériens et leur rôle dans l'ISR (Résistance Systémique Induite) ont été examinés par Kloepper et Ryu [125] et Pavlo et al. [126] qui ont démontré que l'endophyte bactérien de la pomme de terre, *Pseudomonas* spp. augmente la résistance envers le pathogène *Pectobacterium atrosepticum* amorçant les réactions de défense de l'hôte.

### 1.5.3 Phytorémediation

Plusieurs métaux lourds nécessaires en quantité infime pour certains processus, peuvent devenir néfastes quand ils sont présents à des doses élevées et polluantes. La toxicité des métaux lourds dépend donc de leur concentration dans le sol, de leur nature, de la présence d'autres métaux et du type d'organisme qu'ils affectent.

Siciliano et al. [147], ont montré que les plantes cultivées dans le sol contaminé naturellement par des xénobiotiques nécessitent la présence des endophytes ayant des gènes dégradant les contaminants. En effet, dans les sites de terrain contaminés par les nitro-aromatiques, des gènes codant pour la dégradation de ces derniers composés étaient plus fréquents chez les souches endophytes que dans les communautés microbiennes de la rhizosphère ou du sol [147].

De même, Van Aken et al. [148] ont également montré qu'une souche phyto-symbiotique de *Methylobacterium* qui a été isolée à partir du peuplier hybride (*Populus deltoïdes* x *Populus nigra*) était capable de biodégrader de nombreux composés nitro-aromatiques tels que le 2,4,6-trinitrotoluène.

En 2005 Newmann et Reynolds [149] ont résumé des avantages de l'utilisation des organismes endophytes pour lutter contre la pollution des xénobiotiques. Ils ont constaté que lorsque cela est nécessaire pour l'ingénierie génétique par voie de dégradation des xénobiotiques, le mieux serait d'utiliser des bactéries plutôt que les plantes transgénique, car elles sont plus faciles à manipuler.

#### 1.5.4 Résistance aux différents stress

##### 1.5.4.1 Tolérance à la salinité

Comme l'acidité, les sols salins constituent un environnement défavorable pour la croissance de la plupart des plantes et de leurs bactéries endophytes. Contrairement à leurs plantes hôtes, les endophytes symbiotiques et associatives peuvent tolérer et survivre en présence d'une salinité élevée que se soit en culture ou dans le sol [47].

Plusieurs études ont révélé une grande variabilité dans la tolérance à la salinité chez les bactéries endophytes symbiotiques ou associatives. En effet, les rhizobiums isolés des nodules des légumineuses, telles que *Hodysarum*, *Acacia*, *Prosopis* et *Leucaena*, ont été en culture pure tolérants à 500-800 Mm NaCl [47] et ceux isolés des nodules de Lupin ont été susceptibles de croître en présence de 10% NaCl [150]. Les espèces de *Bacillus* en l'occurrence *B.endophyticus* sp.isolées à partir de tissus de cotonnier (*Gossypium* sp.) ont manifesté une croissance optimale en présence de 10% de NaCl [151].

L'adaptation des bactéries aux fortes concentrations en sels est due à leur faculté de synthèse et d'accumulation intracellulaire des solutés compatibles. Ces solutés ont un rôle d'osmorégulation et de protection des bactéries contre les effets du stress salin. Les principaux solutés rencontrés chez les bactéries sont: les ions K<sup>+</sup>, les acides aminés comme la glycine, la betaïne, la proline, le glutamate, divers glucides et le N-acetylglutaminy-glutamine amide [152].

##### 1.5.4.2 Résistance au stress hydrique

Le stress hydrique provoque habituellement une série d'adaptations de la plante pour qu'elle puisse survivre. Des travaux ont montré que la présence des endophytes peut avoir un impact sur ces différentes adaptations. Une bonne façon d'améliorer et de maximiser l'absorption d'eau est de développer un système racinaire profond et dense. Ces dernières caractéristiques augmentent la surface de la racine, ce qui conduit à augmenter l'absorption d'eau et de minéraux. Par exemple, la papaye inoculée par les bactéries endophytes *Pantoea ananatis*, *Bacillus subtilis* et *Microbacterium esteraromaticum* ont montré une augmentation dans le développement de la racine [153]. Le système racinaire supérieur

constitue un moyen simple pour optimiser l'absorption de l'eau disponible dans le sol, ce qui permet d'améliorer la capacité de la plante à la sécheresse.

Une autre technique permettant d'éviter la sécheresse est la réduction de la transpiration. Les stomates de fétuque des plantes inoculées par les endophytes se ferment plus rapidement sous les conditions de stress hydrique que les plantes non inoculées [154].

Une bonne manière de faire face à la sécheresse est d'avoir des réserves d'hydrates de carbone utilisables durant les périodes de stress. Une fonction importante de la tolérance à la sécheresse c'est d'être capable de maintenir la pression osmotique normale. L'accumulation de solutés dans le tissu permet de maintenir la turgescence et la pression, qui à son tour facilite les processus physiologiques et biochimiques. Les plantes infectées par les endophytes produisent un certain nombre de ces solutés; des sucres solubles dans l'eau, le mannitol et l'arabitol, la proline et l'ectoïne [155]. La teneur en eau des plantes infectées par les endophytes est alors maintenue à des niveaux plus élevés que celle des plantes non infectées en période de sécheresse. Ceci peut être dû à une plus grande accumulation de solutés dans les tissus infectés par les endophytes.

L'amélioration de la tolérance au stress abiotique du maïs, peut être réalisée par la co-inoculation par le *Rhizobium* et les *Pseudomonas*, cette opération est accompagnée par une augmentation des niveaux de proline, une diminution des fuites d'électrolytes et par le maintien de la teneur en eau des feuilles [156].

#### 1.5.4.3 Tolérance au pH

Le pH du sol joue un rôle prépondérant aussi bien dans la survie et la prospérité des rhizobactéries que dans la croissance de leur plante hôte. L'acidité est généralement plus néfaste que l'alcalinité [157].

Généralement, les endophytes associatifs et symbiotiques sont des bactéries neutrophiles et basophiles [151]. Pour les Rhizobia, le pH optimal de la croissance serait compris entre 6,5 et 7,5 [158]. Toutefois, Jordan [159] a montré que les espèces colonisées par les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* peuvent tolérer des pHs allant de 4.5 et qui ont manifesté une croissance optimale à pH 5.5, et même peuvent croître à des pHs plus acides comme c'est le cas de

*Gluconocetobacter diazotrophicus* qui se montre capable de croître à pH 3 et de fixer l'azote à pH 2.5 [160].

#### 1.5.5 Effets sur la physiologie des plantes

La colonisation de la racine de la plante affecte à la fois la morphologie et la physiologie de la plante hôte. Une réponse typique après inoculation avec *Azospirillum* est renforcée par une prolifération des racines latérales et des poils racinaires. En général, cela est accompagné par des changements dans la physiologie de la racine comme l'augmentation de l'absorption minérale et hydrique, l'augmentation de la respiration des racines, le retard dans la sénescence des feuilles et l'augmentation du poids sec [161].

#### 1.5.6 Résistance aux herbivores

Les endophytes sont connus pour augmenter la résistance aux herbivores [162]. Plusieurs résultats ont montré que les tissus végétaux colonisés par les endophytes réduisent l'alimentation et l'intensité des œufs de pucerons et d'autres groupes d'insectes [163]. La plante colonisée par les endophytes réduit la survie, la croissance et le taux de développement des insectes se nourrissant sur ses organes. Ces effets sont dus à la présence de métabolites secondaires ayant une propriété insecticide produits par les endophytes dans les tissus végétaux [164]. Ces métabolites secondaires sont souvent des alcaloïdes, quelques-uns sont nommés les alcaloïdes ergotines comme: les clavines, l'acide lysergique, les ergopeptides qui sont souvent la cause de l'intoxication des fétuques en pâturage [155].

Les graminées hébergeant des endophytes ont été signalées à être aussi plus résistantes aux nématodes du sol avec une résistance probablement attribuable aux alcaloïdes présents dans les racines ou la sécrétion de composés phénoliques dans la rhizosphère sous forme d'exsudats constituant des composés répulsifs [155].

### 1.6 Les biofertilisants microbiens et leur utilisation en Agriculture

#### 1.6.1 Définition et mode d'action des biofertilisants

Les biofertilisants microbiens sont principalement des microorganismes fixateurs d'azote, vivant libres ou en association avec des plantes hôtes. Ces

microorganismes utilisent l'azote de l'air comme source d'azote et fournissent ensuite soit par exsudation, soit par décomposition après leur mort, soit à travers la plante à laquelle ils sont associés, de l'azote organique ou minéral qui contribue à maintenir ou améliorer la fertilité du sol et la production végétale.

Les microorganismes producteurs de substances de croissance ou de substances qui favorisent la solubilisation du phosphore du sol sont également considérés comme des biofertilisants [165]. L'usage de biofertilisants tels que l'azote (N<sub>2</sub>) fixé par les bactéries et les micro-organismes bénéfiques peut réduire les applications des engrais chimiques et par conséquent le coût de la production.

#### 1.6.2. Caractéristiques et intérêts agronomiques des *Pseudomonas* spp.

L'édition de 2005 du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" rapporte une soixantaine d'espèces appartenant au genre *Pseudomonas* [166].

Décrite pour la première fois par Migula en (1894) [167], l'espèce *Pseudomonas fluorescens* est une bactérie appartenant à la classe des *Gamma proteobacteria*, à Gram négatif, oxydase positive, en forme de bâtonnet. Elle est mobile grâce à ses multiples flagelles polaires, aérobie à métabolisme strictement respiratoire et chimioorganotrophes [168]. De plus, la deuxième partie de son nom (*fluorescens*) est dû au fait qu'elle est fluorescente quand elle est observée sous lumière UV de longueur d'onde de 254 nanomètre. Cette fluorescence est due à la production d'un pigment appelé fluorescéine.

Les souches de *Pseudomonas fluorescens* ont fait l'objet de nombreuses études à cause de leurs intérêts en agriculture et leurs rôles dans l'environnement. L'inoculation de certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* à des plantes appartenant à différentes familles botaniques, s'accompagne d'une augmentation du rendement, d'une stimulation de la croissance et/ou d'une amélioration de l'état sanitaire des plantes [169].

Les *Pseudomonas* spp. sont des bactéries ubiquitaires dans les sols agricoles qui ont de nombreux caractères les rendant bien adaptés comme PGPR. Les souches les plus efficaces des *Pseudomonas* spp. ont été les *fluorescens* (FLPs) [170]. Ces dernières présentent des particularités du fait qu'elles peuvent maintenir un sol sain et qu'elles sont plus diverses métaboliquement et fonctionnellement [171].

Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et sont capables de former des associations de type mutualistiques avec leurs hôtes. Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui ont un effet promoteur sur la croissance des plantes.

Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les 'Mycorrhization Helper Bacteria' (MHB) et les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste à l'égard des organismes phytopathogènes [172]. La grande diversité des mécanismes d'action de ces *Pseudomonas* est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires et à induire l'ISR chez les plantes [173].

Les *Pseudomonas* produisent notamment de nombreux métabolites antifongiques [174]. En effet, la plupart des *Pseudomonas* produisent des métabolites antifongiques dont les phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) qui sont les AFM les plus fréquemment détectés [175]. Ces bactéries sont également capables de synthétiser des sidérophores appelés pyoverdines ou pseudobactines. Ces molécules sont impliquées dans l'amélioration de la croissance et de la santé des plantes et contribuent à l'acquisition du fer par les végétaux [176]. Elles élicitent les réactions de défense des plantes et, du fait de leur forte affinité pour le fer, limitent la croissance saprophyte de certains microorganismes phytopathogènes [176].

La présence d'inoculats de *Pseudomonas fluorescens* dans la combinaison d'engrais microbiens joue un rôle efficace dans la stimulation du rendement et les paramètres de croissance chez le pois chiche [177]. Les isolats des racines, des pousses et du sol rhizosphérique fournissent des augmentations considérables des masses fraîches et sèches de canne à sucre [178]. Un essai d'une souche de *Pseudomonas* (GRP3) conduit en plein champ a montré une forte augmentation du rendement des légumineuses [179]. Les souches spécifiques de *Pseudomonas fluorescens-putida*, ont été récemment utilisées pour inoculer des semences de diverses plantes cultivées afin de promouvoir leur croissance et augmenter les rendements. Une étude a montré que les *Pseudomonas*, appelé PGPRs, colonisent rapidement les racines des plantes de la betterave à sucre, la pomme de terre, et le radis et permettent statistiquement l'augmentation du rendement

jusqu'à 144% dans les essais sur le terrain [180]. Par ailleurs, les souches de *Pseudomonas putida* (G11-32 et 31-34) et *Pseudomonas fluorescens* (36-43) ont révélé une augmentation de la nodulation et la fixation de l'azote chez le soja (*Glycine max* L.) [181].

### 1.6.3 Caractéristiques et intérêts agronomiques des *Bacillus* spp.

Ce sont des bactéries en forme de bacilles (bâtonnets) à Gram positif, sporulantes, aérobies. Certaines espèces de *Bacillus* spp. produisent des substances toxiques pour d'autres types d'êtres vivants. C'est le cas de *Bacillus thuringiensis*, bactérie pathogène pour les larves de la chenille processionnaire du pin [182].

Les souches de *Bacillus thuringiensis* en voie de sporulation produisent une protéine qui forme une inclusion cristalline bien visible au microscope. Cette protéine est toxique pour les larves d'insectes [183]. Les *Bacillus* spp. cultivés à grande échelle sont récoltés après le début de la sporulation, séchés pour être incorporés aux produits phytosanitaires à pulvériser sur les arbres forestiers (bioinsecticides) [184].

Par ailleurs, les *Bacillus* endophytes se caractérisent par la production de divers antibiotiques et enzymes hydrolytiques telles que les protéases thermostables, l' $\alpha$  amylase et la glucose-isomérase [183]. Elles jouent un rôle important dans la protection contre les champignons et les bactéries pathogènes [185].

Le *Bacillus* est le genre le plus abondant dans la rhizosphère et l'activité PGPR de certaines de ces souches a été connue il y'a quelques années, résultant en une vaste connaissance des mécanismes impliqués [186]. Il y'a un certain nombre de métabolites qui sont produits par ces souches, qui permettent la disponibilité de plus en plus des éléments nutritifs pour les plantes [187].

Les espèces du genre *Bacillus* sont caractérisées par leur large spectre d'hôtes. Elles résident habituellement à l'intérieur des tissus de diverses espèces végétales, telles que le cotonnier [188], le petit pois [189], les céréales [188] et la Vigne [190].

Naturellement présent dans le voisinage immédiat des racines de la plante, le *Bacillus subtilis* est capable de maintenir le contact stable avec les plantes

hôtes et favorise leur croissance. Cette bactérie a été décrite comme une future voie permettant d'augmenter l'état sanitaire de la plante [191].

Des travaux ont montré que la bactérie *Bacillus licheniformis* lorsqu'elle est inoculée sur la tomate et le poivron, elle montre une colonisation considérable et pourrait être utilisée comme un biofertilisant [192].

Jaizme-Vega *et al* [193], ont évalué l'effet d'une population de rhizobactéries de *Bacillus* spp. sur les premiers stades de développement de deux types de micropropagation du bananier. Ces auteurs ont conclu que ces populations bactériennes peuvent être décrites comme une perspective à améliorer la santé des plantes et le taux de survie dans les pépinières commerciales.

Les formulations à base de *Bacillus* sont également utilisées pour augmenter le potentiel de rendement, la croissance et la nutrition des plantes de framboisier sous des conditions de croissance organiques [191]. Le *Bacillus megaterium* a été utilisé dans l'amélioration des paramètres comme la vigueur, la longueur et la teneur en matière sèche de la racine de la menthe [194]. L'espèce *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* (PSB) et les bactéries solubilisantes du potassium (KSB) sont utilisées dans la solubilisation des éléments nutritifs comme le phosphore et le potassium, elles sont par conséquent suggérées pour leur usage comme engrais potentiels [195].

En conclusion, les *Bacillus* colonisent les racines de la plante et agissent simultanément comme biofertilisants et comme agents de protection (biopesticide) à l'égard des pathogènes telluriques tels que, les bactéries, les champignons et les nématodes.

## CHAPITRE 2

### MATERIELS ET METHODES

Les objectifs de cette présente étude ont été expérimentés selon deux protocoles:

- Une recherche de l'effet de la promotion de croissance *in vitro* de huit souches bactériennes endophytes par l'analyse des métabolites secondaires telles que la solubilisation du phosphore, la production d'acide indole acétique (AIA), la production d'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-deaminase, la production de l'ammoniac, la production d'hydrogène cyanide (HCN) et l'activité de la catalase.
- Une recherche de l'activité de promotion de la croissance *in planta* de ces mêmes bactéries endophytes sur la semence de trois espèces cultivées différentes, à savoir, le blé dur, la tomate et le concombre.

#### 2.1 Lieu de l'étude

L'étude a été menée au niveau des deux laboratoires; le laboratoire de phytobactériologie de l'Université de Blida pour la partie manipulation des souches bactériennes et le laboratoire de la culture *in vitro* de l'Institut d'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAF - siège de Tessala El Merdja) pour les essais de recherche de promotion de la croissance *in vitro et in planta*.

#### 2.2 Matériel biologique

Pour les besoins de notre expérimentation, six souches de *Bacillus* spp. et deux souches des *Pseudomonas* spp. ont été utilisées (Tableau 1).

Les bactéries étudiées appartiennent aux genres ; *Bacillus* et *Pseudomonas* (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, deux

souches de *Bacillus* spp. deux autres de *Pseudomonas* spp., préalablement identifiées par séquençage de l'ADN ribosomique du 16S [225].

Ces souches bactériennes appartiennent à la collection du laboratoire de phytobactériologie. Ce sont des organismes endophytes isolés de diverses plantes spontanées [226 ; 225].

Tableau 2.1: Les souches bactériennes endophytes étudiées et leurs espèces végétales d'origine

Souche bactérienne (code)		Espèce végétale (origine d'isolement)
CR1	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Calendula arvensis</i>
PF3	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Plantago lanceolata</i>
EHR1	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Euphorbia helioscopia</i>
EHF5	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Euphorbia helioscopia</i>
EPR3	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Euphorbia peplus</i>
PS1	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Plantago lanceolata</i>
OS2	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Urtica dioica</i>
OS4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Urtica dioica</i>

### 2.3 Matériel végétal

Dans le but de tester l'effet des bactéries endophytes sur la promotion de la germination et la levée de dormance nous avons utilisé la semence de trois espèces végétales:

- Semence de blé dur (*Triticum durum* Desf. Poacées) cultivar autochtone Hidab fournie par l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de Sétif ;
- Semence de concombre (*Cucumis sativus* L. Cucurbitacées) cultivar Super Marketer fournie par l'Institut Technique des Cultures Maraîchères et Industrielles de Staouali (ITCMI)
- Semence de tomate (*Lycopersicum esculentum* L. Solanacées) cultivar Marmande fournie par l'Institut Technique des Cultures Maraîchères et Industrielles de Staouali (ITCMI).

## 2.4 Milieux de culture

Pour toutes les manipulations, l'eau utilisée est de l'eau distillée. Tous les milieux sont autoclavés à 121°C et 1bar pendant 20 minutes.

Les milieux solides ont les mêmes compositions de base que les milieux liquides et sont additionnés avant autoclavage de 15 g d'agar (appendice B).

## 2.5 Mise en culture des souches bactériennes et préparation des suspensions de densité cellulaire connue

Les huit souches bactériennes utilisées préalablement conservées sur un milieu gélosé, ont été réactivées sur le milieu Levure Peptone Glucose Agar (LPGA) à pH=7. L'ensemencement a été effectué en boîtes de pétri par étalements sectoriels avec une anse stérile, à raison de trois secteurs par boîte, suivie d'une étape d'incubation de 48 à 72h à 28 à 30°C.

Après une étape de vérification de la pureté des colonies obtenues, les souches bactériennes sont homogénéisées dans de l'eau distillée stérile en utilisant un agitateur monotube puis ensemencées sur le milieu de culture (LPGA) et incubées à une température de 28°C pendant 72 heures. Toutes ces étapes sont réalisées dans des conditions d'aseptie générale pour éviter les contaminations extérieures.

A partir de chaque colonie de la culture mère et pour chaque souche bactérienne, des cultures denses sont préparées et incubées à leur tour à 28°C pendant 72 heures.

Pour la réalisation des tests, il est indispensable de travailler avec des clones purs et une concentration cellulaire (densité bactérienne) connue pour les deux genres bactériens étudiés (*Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp.).

Les suspensions des souches bactériennes ont été préparées à partir de cultures préalablement purifiées. Sous la hotte, et dans des conditions aseptiques, nous avons préparé la solution mère en raclant à l'aide d'une anse stérile la culture bactérienne des souches PS1 et PF3, respectivement, souches représentatives de *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp.

Les souches bactériennes à tester cultivées sur le milieu LPGA et âgées de 48h, ont été par la suite mises en suspension dans des tubes à essai

contenant de l'eau distillée stérile. Après agitation, nous avons réalisé une série de dilutions (suspensions-dilutions de  $10^{-1}$ - $10^{-5}$ ) par prélèvement d'un millilitre pour chaque dilution à l'aide d'une micropipette stérile. Le volume prélevé (1 ml) est mis dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile [227].

A l'aide du spectrophotomètre UV-visible, nous avons effectué la lecture de la densité optique de chaque dilution des suspensions bactériennes préparées à la longueur d'onde de 580 nm.

Afin de réaliser le comptage des colonies bactériennes, nous avons prélevé avec une micropipette un volume de 0,1 ml de chaque dilution. Ce volume est étalé en boîtes de pétri contenant le milieu LPGA.

L'étalement a été réalisé en utilisant des billes en verre préalablement stérilisées. Après une étape d'incubation à 28°C pendant 72h, le comptage des colonies est réalisé à l'aide d'un compteur de colonies, où ne sont considérées que les boîtes où apparaissent 30 à 300 colonies suivant la souche bactérienne [227].

Le nombre de colonies dans les boîtes de pétri est dénombré et rapporté à la dilution choisie pour permettre d'estimer la densité bactérienne exprimée en cfu (Colony Forming Units/ml) à une DO donnée (appendice A, annexe 1 et 2).

Pour les tests de production de métabolites secondaires *in vitro*, les suspensions bactériennes sont préparées à une densité optique variant selon l'espèce bactérienne de 0,63 pour *Pseudomonas* spp. à 1,26 pour *Bacillus* spp., ce qui correspond à une concentration cellulaire de  $10^8$ cfu/ml. Cette concentration est souvent indiquée dans des travaux sur la recherche de l'activité antibactérienne [228].

Ces valeurs ont été déduites pour chaque souche bactérienne, car elles dépendent de la concentration en polysaccharides cellulaires constituant la capsule bactérienne et dont la taille est variable d'une bactérie à une autre. En effet, une couche de polysaccharides cellulaires épaisse peut interférer avec la concentration cellulaire des bactéries en donnant une viscosité à la solution et par conséquent une valeur de DO élevée lors de sa mesure [229].

## 2.6 Analyse de la production *in vitro* de métabolites secondaires impliqués dans la promotion de la croissance par les bactéries endophytes testées

### 2.6.1 Solubilisation du phosphore

La solubilisation du phosphore a été évaluée qualitativement selon la méthode décrite par Mehta et Nautiyal [230] sur milieu de Pikovskaya PVK [231] (appendice B, annexe 4), additionné de bleu de bromophénol. Cette méthode est basée sur la décoloration du Bromo-Phenol-Bleu (BPB) suite à un abaissement du pH du milieu par production de phosphatases.

Trois aliquotes de 50 $\mu$ l ( $10^8$ cfu/ml) par boîte de pétri de cultures fraîches âgées de 48h sontensemencées dans le milieu gélosé de PVK à raison de trois répétitions (figure 2.1).

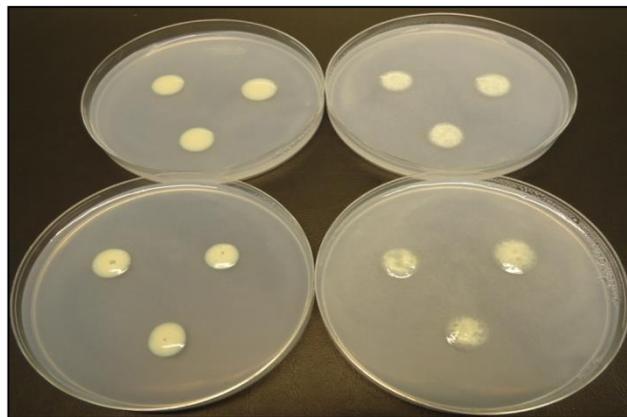


Figure 2.1: Dépôt des suspensions bactériennes sur milieu PVK

Une réaction positive se traduit par la décoloration du milieu solide autour des spots et indique une solubilisation de phosphore. La lecture des résultats est faite après 7 jours d'incubation à 28°C par mesure du diamètre de la colonie bactérienne et le diamètre de la zone halo + diamètre de la colonie [232]. L'indice de solubilisation (IS) est ensuite calculé par le rapport: [diamètre total (halo+colonie)/diamètre de la colonie] x 100.

### 2.6.2 Estimation quantitative de la solubilisation du phosphore

L'estimation quantitative de la solubilisation du phosphore inorganique a été faite selon la méthode décrite par Nautiyal et Mehta [233].

Les isolats bactériens ( $10^8$ cfu/ml) ont été cultivés dans un bouillon nutritif additionné de phosphate (NBRIP) (appendice B) contenant 0,5% de phosphate bicalcique (BCP). Les flacons contenant 50 ml de milieu ont été ensemencés selon trois répétitions avec 500  $\mu$ l de culture bactérienne et incubés à 28 °C à 180

rpm pendant 5 jours dans un incubateur secoueur. Simultanément, le témoin non inoculé a été également maintenu dans des conditions similaires.

Après cette période de croissance, les cultures ont subi une centrifugation à 10000 rpm pendant 10 min, le surnageant a été filtré à l'aide d'un filtre millipore de 0.22µm.

Le phosphore dans le surnageant a été ensuite estimé par la méthode de couleur vanado-molybdate-jaune [234]. A une aliquote de 0,5 ml du surnageant, 2,5 ml de réactif de Barton (appendice B, annexe 7), a été ajouté et le volume a été ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée. L'absorbance de la couleur résultante est lue après 10 min à 430 nm dans un spectrophotomètre UV/Visible.

Le phosphore soluble total a été calculé à partir de l'équation de la courbe de régression standard. Les valeurs de phosphore soluble libéré ont été exprimées en µg/ml, correspondant à la quantité de phosphore soluble, calculées par étalonnage à partir de la courbe standard de dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0-10 ppm). Le pH des surnageants de culture a également été mesuré en utilisant un pH mètre.

### 2.6.3 Production de l'acide indole acétique (AIA)

La production d'AIA est déterminée selon la méthode standard de Loper et Schroth. [235]. Le milieu solide de Luria-Bertani (appendice B, annexe 2) enrichi avec du tryptophane (LBT) a été utilisé pour identifier les isolats producteurs de l'AIA ou des substances apparentées.

Le milieu ainsi préparé est coulé dans des boîtes de Pétri. La gélose est recouverte de papier Whattman n°1 (40 mm de diamètre). Trois colonies isolées ont été déposées sur le même papier à l'aide d'une épingle stérile. Les boîtes de Pétri ont été incubées en position inversée à 28 °C pendant un temps nécessaire pour que les colonies atteignent un diamètre de 2 mm. Le papier Watmann est imprégné de 2,5 ml de solution de Salkowski (2% de  $\text{FeCl}_3$  à 0,5 M dans une solution de 35% d'acide perchlorique).

Après 10 à 30 min, la production d'IAA et/ou de ses analogues se manifeste par la formation d'un halo rose rouge autour des colonies et pour les souches productrices d'autres types d'indole la coloration est jaune à jaune brune.

#### 2.6.4 Estimation de la production d'AIA

La quantification de l'AIA et de ses dérivés a été évaluée par une méthode colorimétrique de Kamilova et al. [236] en utilisant le réactif de Salkowski [237], selon la technique modifiée par Gutierrez-Manero et al. [238]. Un volume de cinquante ml de bouillon nutritif (NB) (appendice B, annexe 2) contenant 0,1% de DL tryptophane a étéensemencé avec 500 µl de chacune des suspensions bactériennes fraîches ( $10^8$ cfu/ml) âgées de 24h et incubées dans l'incubateur secoueur à 28°C et 180 rpm pendant 48 h à l'obscurité.

Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 10000 rpm pendant 10 min à 4° C. Le surnageant a été filtré à l'aide de filtres millipores de 0.22µm. L'estimation de l'indole-3-acétique (AIA) dans le surnageant a été réalisée en utilisant un dosage colorimétrique. Un millilitre de surnageant a été mélangé avec 4 ml de réactif de Salkowski et l'absorbance de la couleur rose résultante a été lue après 30 mn à 535 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à UV/Visible.

L'apparition de la couleur rose dans des tubes à essai indique la production d'AIA comme décrit par Gordon et Weber [239]. La production de l'AIA a été calculée à partir de l'équation d'une courbe type de régression et le résultat est exprimé en µg/ml par rapport au témoin. La concentration de l'acide indole-acétique (AIA) a été déterminée en préparant une courbe d'étalonnage en utilisant de l'acide indole acétique (AIA) comme standard (témoin) (10 à 100 µg/ml).

#### 2.6.5 Production de substances volatiles (HCN)

La cyanogénèse a été évaluée sur un milieu solide selon une méthode adaptée de celle de Baker and Schippers [240]. Les cultures bactériennes ont étéensemencées en stries sur un milieu gélosé nutritif contenant 4,4 g par litre de glycine. Un papier filtre Whatman n°1 trempé dans une solution d'acide picrique à 0,5% (dans du carbonate de sodium à 2%) a été placé à l'intérieur du couvercle de chaque boîte.

Les boîtes ont été scellées avec du parafilm pour éviter l'échappement des vapeurs et incubées à 28° C pendant 4 jours [241 ; 242]. Le virage de la couleur du jaune au brun clair et au rouge brun indique respectivement une production

modérée et élevée d'H<sub>2</sub>CN par la bactérie productrice [243]. Trois répétitions ont été effectuées, le témoin négatif est représenté par un milieu sans inoculum.

#### 2.6.6 Production d'ammoniac

La production d'ammoniac est déterminée selon la méthode de Lata and Saxena [244]. Des cultures bactériennes fraîches âgées de 24h ont été ensemencées dans 10 ml de bouillon de peptone (appendice B, annexe 3) dans des tubes à essai et incubées à 28°C pendant 48 h dans un incubateur secoueur.

Après incubation, un volume de 0,5 ml de réactif de Nessler est ajouté (appendice B, annexe 8) dans chaque tube. Le développement de la couleur jaune pâle à brun foncé indique la production de l'ammoniac.

#### 2.6.7 Activité de la catalase

Le test de la catalase a été réalisé en rajoutant une goutte de 3% de peroxyde d'hydrogène à une colonie de chaque souche bactérienne âgée de 48 h sur une lame de verre propre et en mélangeant avec un cure-dent stérile. L'effervescence indique la présence de l'activité de la catalase [245].

#### 2.6.8 Production d'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-deaminase

L'effet des isolats bactériens sur l'élongation des racines a été étudié par la germination des semences selon la méthode décrite par Belimov et al [246 ; 247].

La surface des semences de blé dur et de la tomate ont été stérilisées avec 6% de NaOCl pendant 10 min puis lavées par la suite trois fois avec de l'eau distillée stérile. Toutes les graines ont été mises à germer à 25°C dans des boîtes de pétri contenant de l'eau gélosée à 0,7% pendant 48h. Les graines germées ont été plongées pendant 1h dans 20 ml de suspension bactérienne ( $10^8$ cfu/ml) préparées à partir des cultures bactériennes cultivées pendant 48h sur milieu NB.

Les graines germées traitées sont transférées sur des boîtes de pétri tapissées de deux feuilles de papier filtre imbibées d'eau distillée stérile. Les graines non traitées servent de témoin. Les boîtes de Pétri sont incubées dans l'obscurité à 30°C avec trois répétitions pour chaque traitement. La longueur des racines a été mesurée en cm au bout de 5 jours d'incubation. La mise en évidence

de l'activité de l'ACC se traduit par une élongation racinaire comparée au témoin non inoculé.

## 2.7 Etude de la germination et de la promotion de la croissance

### 2.7.1 Préparation de l'inoculum bactérien

Les bactéries cultivées sur milieu LPGA pendant 48h à 28°C, étaient suspendues dans un volume de 5 ml de la solution saline (NaCl 0,85%) ajustée à  $10^8$ cfu/ml.

### 2.7.2 Désinfection des semences

Sous une hotte à flux laminaire horizontal, les semences des trois espèces (le blé dur, le concombre et la tomate) ont été désinfectées à l'hypochlorite de sodium à 6% pendant 10 minutes puis rincées 3 fois à l'eau distillée stérile.

### 2.7.3 Bactérisation des semences

Les graines des trois espèces ont été plongées pendant 1h dans 20 ml de suspensions de NaCl ajustées à  $10^8$ cfu/ml, préparées à partir des cultures bactériennes cultivées pendant 48h sur milieu LPGA (Appendice B, annexe 1). Après séchage des graines sur un papier buvard stérile, elles sont ensemencées dans des boîtes de pétri contenant de l'eau gélosée (7g/l) à raison de 5 graines par boîte. Les semences non traitées servent de témoin.

Les boîtes ont été mises dans une chambre de culture à une photopériode de 16 heures de lumière (3000 lux) et 8 heures d'obscurité, sous une température de 24°C (figure 2.2).

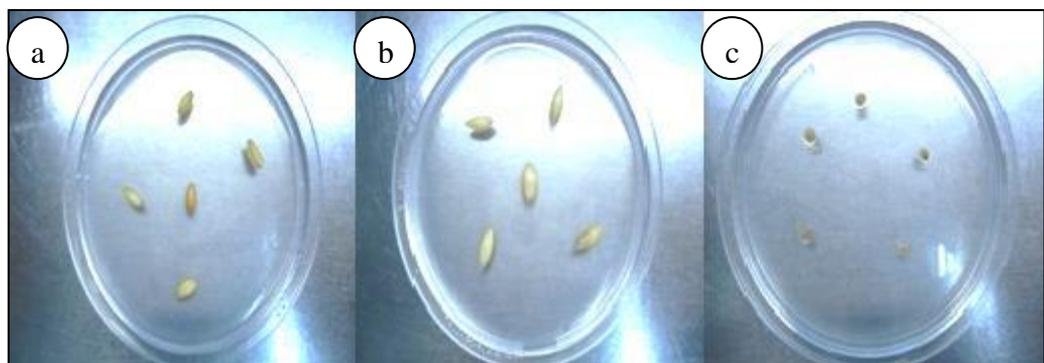


Figure 2.2 : Mise en germination de la semence. a :blé, b : concombre, c : tomate

## 2.8 Evaluation des paramètres de la croissance

Les effets des bactéries endophytes sur la germination et la croissance des plantules des trois espèces ont été évalués par les paramètres suivants:

- Pourcentage de la germination: le nombre de semences germées pendant le séjour de la germination (5jours pour le blé et 7jours pour le concombre et la tomate).
- Biométrie de la partie aérienne.
  - Longueur moyenne de la tige principale.
  - Poids frais de la partie aérienne.
  - Poids sec de la partie aérienne.
- Biométrie de la partie racinaire.
  - Longueur moyenne de la racine principale.
  - Poids frais de la partie racinaire.
  - Poids sec de la partie racinaire.

### 2.8.1 Taux de germination

Après 5 jours de la mise en culture des graines pour le blé et 7 jours pour la tomate et le concombre, le taux de germination a été calculé pour chaque espèce et pour chaque traitement.

### 2.8.2 Paramètres de croissance (levée)

La croissance a été évaluée selon la hauteur (racine, tige) et la masse de la partie aérienne et souterraine est pesée après séchage à l'étuve pendant 48h à 105°C. Après 10 jours pour le blé et 14 jours pour la tomate et le concombre, les graines germées sont alors comptées et la longueur de la tige et la racine des vitro-semis sont mesurés afin de déterminer l'index de vigueur par la présente formule :  $\text{index de Vigueur} = (\text{longueur moyenne de racine} + \text{longueur moyenne de la tige}) \times \% \text{ de germination}$  [248].

L'essai *in planta* a été arrêté à 10 jours pour le blé et 14 jours après la date de semis pour la tomate et le concombre. Les vitro-semis ont été

soigneusement arrachés et rincés à l'eau courante, les racines sont lavées et débarrassées de la gélose adhérente afin de mesurer les paramètres de croissance.

Le poids frais et le poids sec de la biomasse aérienne et racinaire de chaque vitro-semis sont ensuite déterminés.

#### 2.8.2.1 Longueur de la tige

La hauteur de la tige a été mesurée sur un papier millimétré à partir du collet jusqu'à l'extrémité apicale des vitro-semis.

#### 2.8.2.2 Longueur de la racine

Une fois le système racinaire a été étalé, sa longueur a été mesurée sur un papier millimétré.

#### 2.8.2.3 Poids frais et sec de la partie aérienne

Tous les vitro-semis ont été coupés au niveau du collet et pesés immédiatement pour éviter les pertes dues à la déshydratation. Une fois le poids frais noté, les vitro-semis sont mis dans une étuve à une température de 105°C pendant 48 heures afin de déterminer leur poids sec et jusqu'à stabilisation de la lecture de ce dernier.

#### 2.8.2.4 Poids frais et sec de la partie racinaire

Après récupération du système racinaire des vitro-semis, le poids frais a été pesé immédiatement, quant au poids sec, il est déterminé après séchage à l'étuve à une température de 105°C et jusqu'à stabilisation de la lecture.

### 2.9 Analyse statistique

Les effets des différents traitements ont été étudiés par l'analyse de la variance ( $\alpha = 5\%$ ), suivie par un test de comparaison des moyennes (test de Newman-Keuls au seuil 5 %). Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel STATISTICA version 6.

La signification des différences entre les traitements est exprimée en fonction de la probabilité (P) de la façon suivante :

- $P \geq 0,05$  : Différence non significative ;
- $P \leq 0,05$  : Différence significative ;
- $P \leq 0,01$  : Différence hautement significative ;
- $P \leq 0,001$  : Différence très hautement significative.

## CHAPITRE 3

### RESULTATS

#### 3.1 Promotion de la croissance *in vitro* par les bactéries endophytes

##### 3.1.1 Quantification de la solubilisation du phosphore

Le test de solubilisation du phosphore montre que toutes les souches bactériennes endophytes testées étaient capables de solubiliser le phosphate inorganique sous forme bicalcique. Cette solubilisation est révélée par la présence d'un halo autour de la colonie bactérienne, la variation du diamètre de ce halo montre qu'il y a une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphore entre les souches testées (figure 3.1).

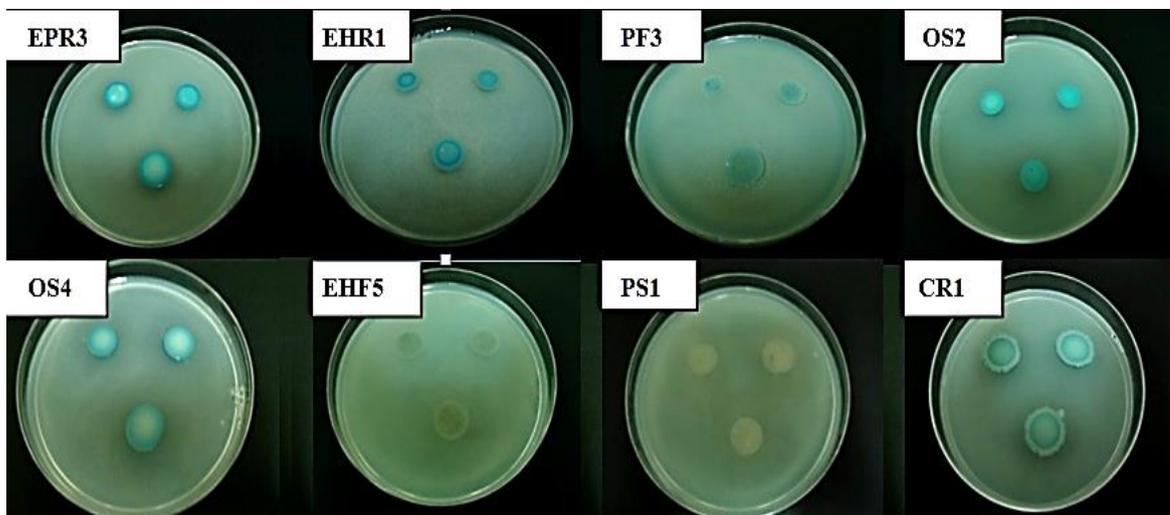


Figure 3.1: Halo de solubilisation autour des huit colonies bactériennes testées  
Le calcul de l'indice de solubilisation permet d'évaluer le pouvoir solubilisateur d'une bactérienne et le comparer à d'autres (tableau 3.1).

Tableau 3.1: Solubilisation du phosphate bicalcique par les souches bactériennes endophytes testées

Souche	Ø colonie (cm)	Ø halo+colonie (cm)	Indice de solubilisation
<i>B. amyloliquefaciens</i> OS4	0,9	1,93	2,15
<i>B.spp.</i> CR1	0,83	1,23	1,48
<i>B. subtilus.</i> EHF5	1,23	3,6	2,92
<i>B. pumilus</i> OS2	1,03	2,2	2,13
<i>P. spp.</i> EPR3	1,27	2,9	2,29
<i>P. spp.</i> PS1	0,83	3,5	4,20
<i>B. cerius</i> EHR1	1,1	3,5	3,18
<i>B.spp.</i> PF3	0,93	1,13	1,21

L'estimation quantitative du phosphore soluble a été évaluée par spectrophotométrie à partir de la courbe de régression de la quantité de  $P_2O_5$  soluble en fonction de la densité.

L'ANOVA a révélé une différence très hautement significative ( $P=0,00015$ ) (appendice C, annexe 1) entre les différents traitements par rapport au témoin (fig 3.2).

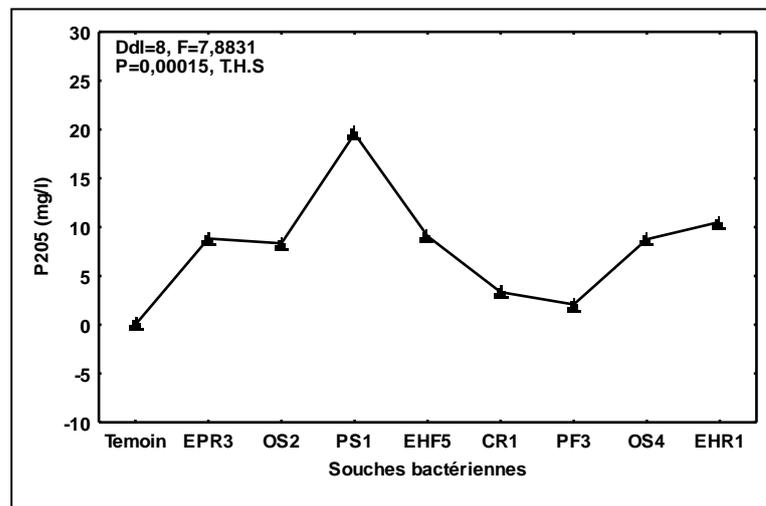


Figure 3.2: Evaluation du phosphore soluble par les souches bactériennes endophytes à partir du phosphate bicalcique

Parmi les souches bactériennes, la souche *Pseudomonas* spp. PS1 a été très efficace par rapport aux autres, avec un indice de solubilisation (IS) égale à

4,20 et une moyenne de 19,56mg/l. Cinq souches (EHR1, OS4, EHF5, EPR3 et OS2) ont montré une activité de solubilisation du phosphate satisfaisante avec un IS variant de 2,13 à 3,18 et une moyenne qui varie de 8,33 à 10,54mg/l. Les deux souches de *Bacillus*spp.CR1 et PF3 ont été positives avec un IS (2,13 et 1,63) et une moyenne de (2,07 et 3,34mg/l) par rapport au témoin (0,00mg/l).

La figure 3.3 nous a donné la relation entre la solubilisation du phosphore bicalcique en phosphore soluble ( $P_2O_5$ ) par les huit souches bactériennes endophytes testées et la baisse du pH. Cette relation étant négative, ce qui explique que cette relation est inverse, c'est-à-dire plus la solubilisation du phosphore augmente plus le pH du milieu diminue.

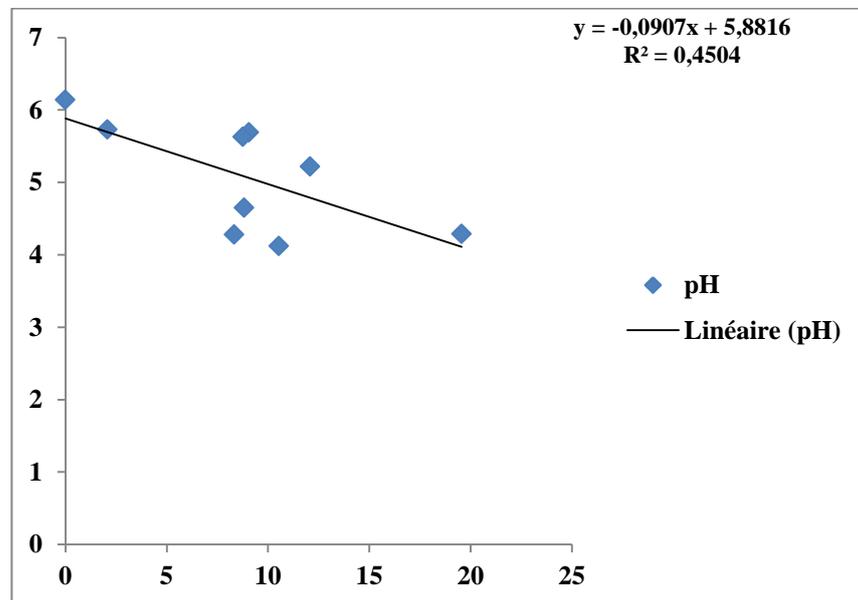


Figure 3.3: Effet de la solubilisation du phosphore bicalcique par les souches bactériennes endophytes sur le pH du milieu.

D'après les résultats nous avons déduit une baisse du pH de milieu de culture selon les souches testées qui varie de 4,12 à 5,73. Le milieuensemencé par la souche de *Pseudomonas* spp. PS1 a enregistré le plus faible pH comparant au témoin (6,14) (fig 3.3).

### 3.1.2 Production de l'acide-indole-acétique

La production qualitative de l'acide indole acétique et/ou de ses composés apparentés a été testée en présence du tryptophane dans le milieu de culture et en additionnant le réactif révélateur de Salkowski. La production de l'AIA a été

observée chez six souches bactériennes testées (PS1, OS2, EPR3, EHF5, OS4, EHR1) (fig 3.4 a et b).

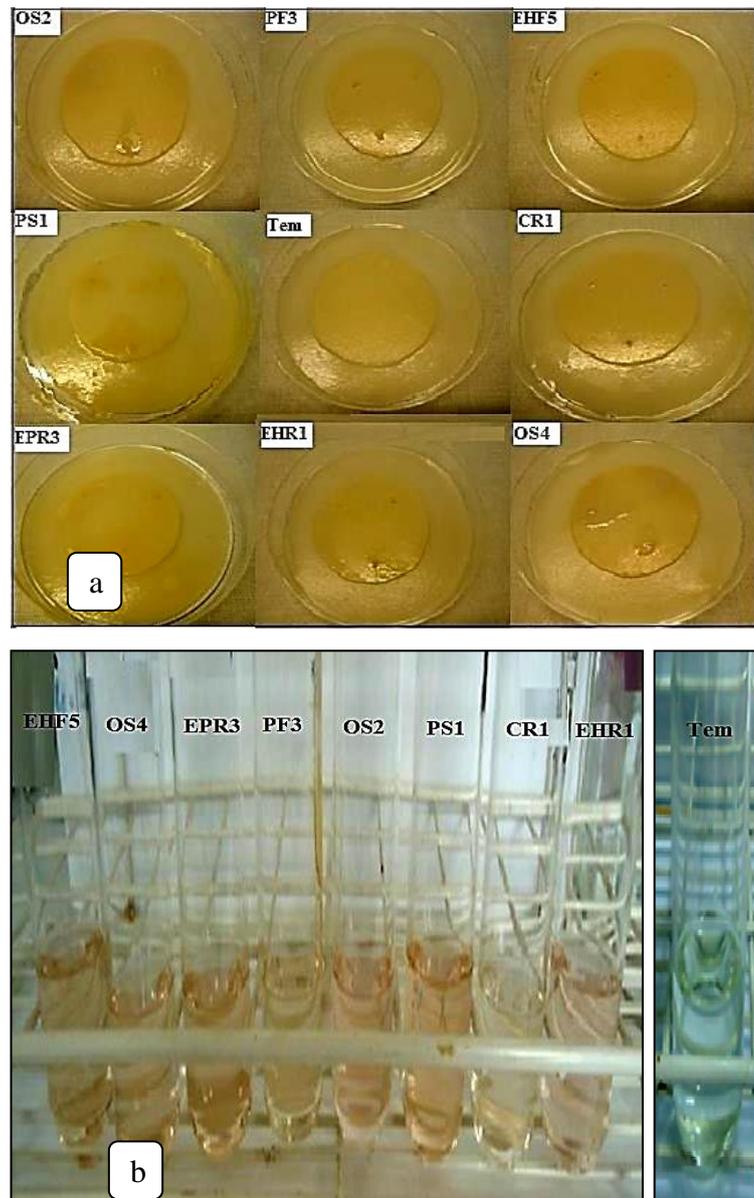


Figure 3.4 : Production d'acide indole acétique en présence du tryptophane  
a: sur milieu solide, b: sur milieu liquide

Les souches productrices de l'AIA ont développé une coloration rose à marron à la suite de l'addition du réactif révélateur (de Salkowski) après 20mn d'incubation. Cependant, les souches *Bacillus* spp. CR1 et PF3 n'ont pas produit de coloration.

L'estimation quantitative de l'acide indole acétique a été calculée par spectrophotomètre à UV à partir de la courbe de régression de la quantité d'AIA produite en fonction de la densité.

L'ANOVA a révélé une différence hautement significative ( $P=0,00689$ ) (appendice C, annexe 2) entre les différents traitements par rapport au témoin (standard) (fig 3.5).

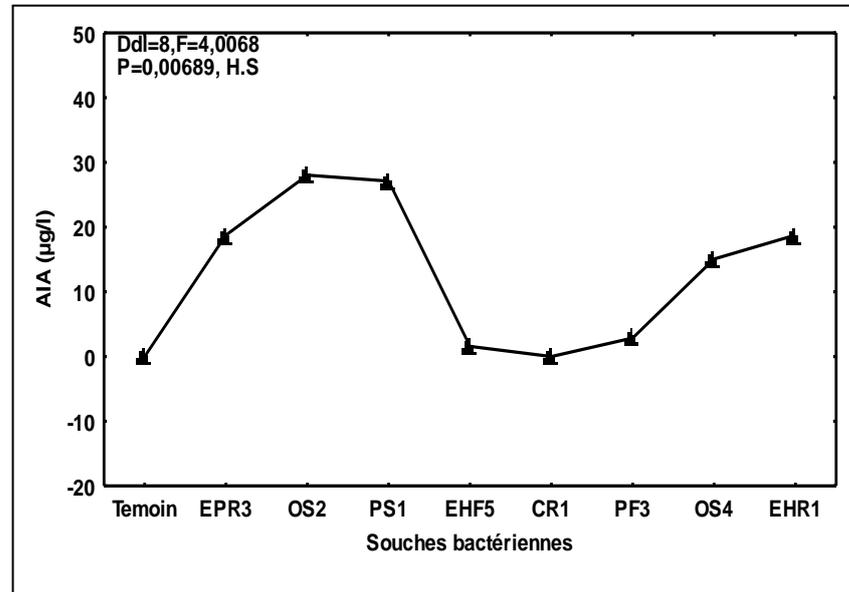


Figure 3.5: Evaluation de la production de l'AIA par les souches bactériennes endophytes

Tableau 3.2: Production qualitative et quantitative d'Acide Indole Acétique (AIA) par les souches bactériennes endophytes en présence de tryptophane.

Souches	Couleur (rose)	AIA en µg/ml
OS4	+	15,084
CR1	-	Nd
EHF5	-	1,586
OS2	++	27,096
EPR3	+	18,780
PS1	++	28,020
EHR1	+	18,780
PF3	-	2,872

- : absence de coloration + : légèrement rose, ++ : rose, Nd: non détectable.

Parmi les souches testées, les deux souches de *Pseudomonas* spp. PS1 et *Bacillus pumilus* OS2 ont été plus efficaces dans la production d'AIA par rapport aux autres souches avec des moyennes respectives de 28,020 et 27,096 µg/ml,

par contre, les souches *Bacillus* spp.PF3 et *Bacillus subtilis* EHF5, ont été les plus faibles avec respectivement les moyennes (2,872 et 1,586 $\mu$ g/ml). La souche *Bacillus* spp. CR1 n'a révélée aucune production d'AIA.

### 3.1.3 Cyanogènèse

La production d'HCN par les huit souches a été testée sur un milieu gélosé nutritif contenant la glycine; ce composé joue un rôle majeur dans la production d'HCN par les microorganismes.

Parmi les souches testées, sept souches (PS1, OS2, EPR3, EHF5, OS4, EHR1et PF3) sont productrices d'acide cyanhydrique. Cette production d'HCN est révélée par la production de couleurs variables selon les souches, la souche *Bacillus* spp. CR1 a révélé une variation de couleur très légère.

Après 24h d'incubation, un léger virage de la couleur du papier Wattman (du jaune vers le marron) imprégné d'acide picrique a été observé chez ces souches productrices d'HCN, pour devenir net entre 48 à 72h, montrant que la production va en s'intensifiant après 48h, révélée par le virage du papier qui pour certaines souches devient marron plus foncé que d'autres (fig 3.6).

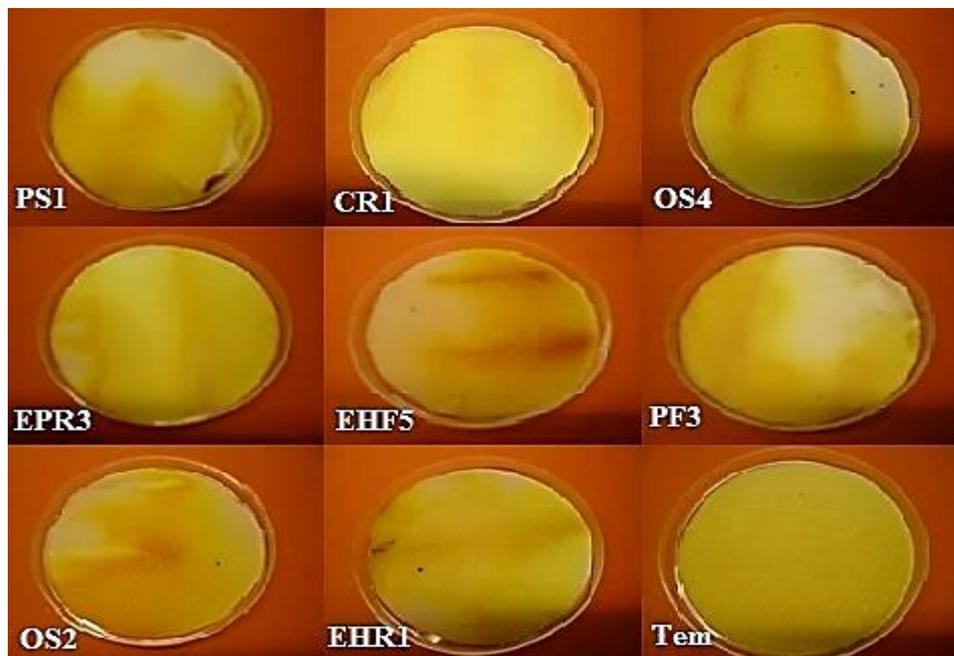


Figure 3.6: Production d'HCN des huit souches bactériennes testées sur milieu additionné de glycine.

### 3.1.4 Production d'ammoniac

D'après les résultats, la production d'ammoniac a été observée chez toutes les souches bactériennes testées avec des taux variables selon les souches.

Toutes les souches ont marqué un virage après ajout du réactif de Nessler et après incubation, du jaune pâle au brun à brun foncé, ce qui indique la production d'ammoniac modérée. Les souches *Pseudomonas* spp. EPR3 et PS1 ont donné une couleur marron foncée qui vire vers le rouge brique, laissant supposer que se sont les plus efficaces dans la production d'ammoniac (fig 3.7).

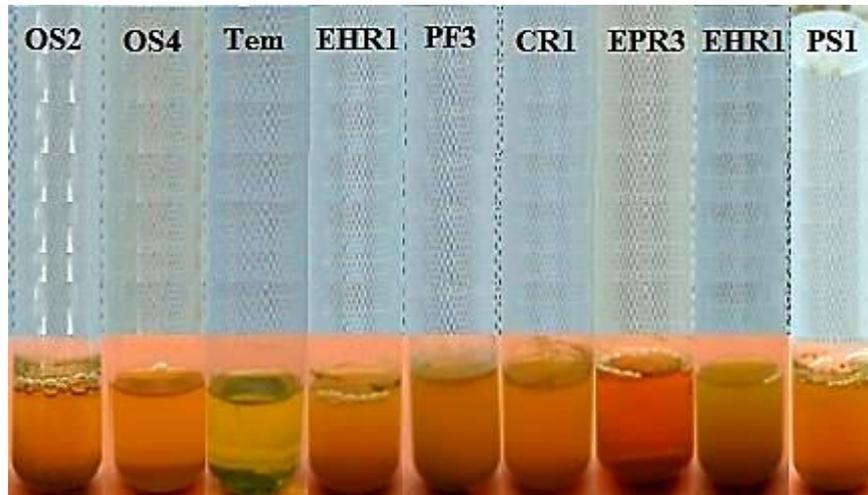


Figure 3.7: Production d'ammoniac par les huit souches bactériennes endophytes testées.

### 3.1.5 Activité de la catalase

D'après nos observations, toutes les souches testées ont produit l'effervescence en ajoutant une goutte de 3% de peroxyde d'hydrogène à une colonie de chaque souche bactérienne, ce qui indique la présence de l'enzyme catalase.

Nous remarquons d'après la figure 3.8 que cette effervescence varie d'une souche à une autre et ceci selon l'ampleur de cette effervescence. Les souches *Pseudomonas* spp. PS1 et *Bacillus amyloliquefaciens* OS4 ont été les plus efficaces. Par ailleurs, la souche *Pseudomonas* spp. EPR3 a été la moins efficace.

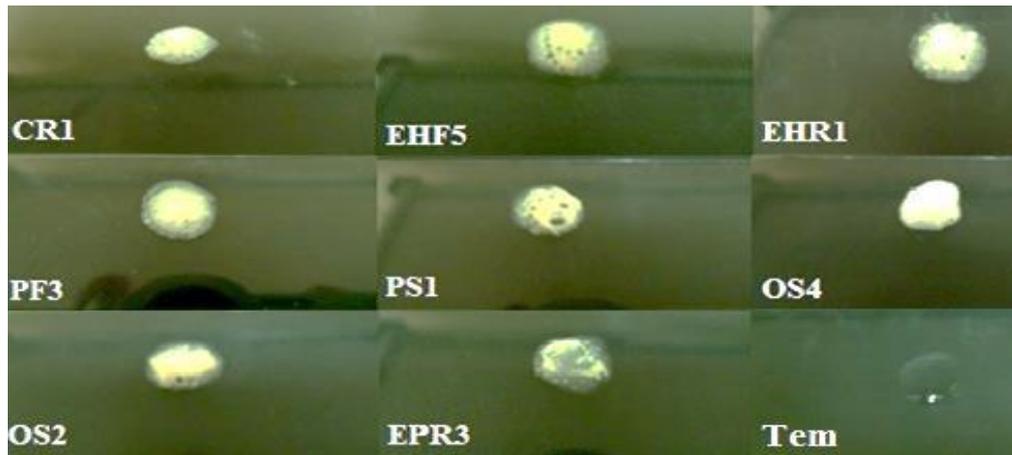


Figure 3.8: Réaction de la catalase des souches bactériennes endophytes testées.

### 3.2 Promotion de la croissance *in planta* par les bactéries endophytes

#### 3.2.1 Production d'Aminocyclopropane-1-carboxylate- deaminase (ACC)

L'effet des isolats bactériens sur l'élongation des racines a été étudié par la germination des semences de blé et de la tomate. La longueur des racines a été mesurée en centimètres après 5 jours d'incubation à 30°C. La mise en évidence de l'activité de l'ACC se traduit par une élongation racinaire comparée au témoin non inoculé.

Les observations de l'élongation racinaire du blé et de la tomate, nous ont montré clairement une différence dans la longueur des racines des différentes souches testées par rapport à leurs témoins (fig 3.9 a et b).

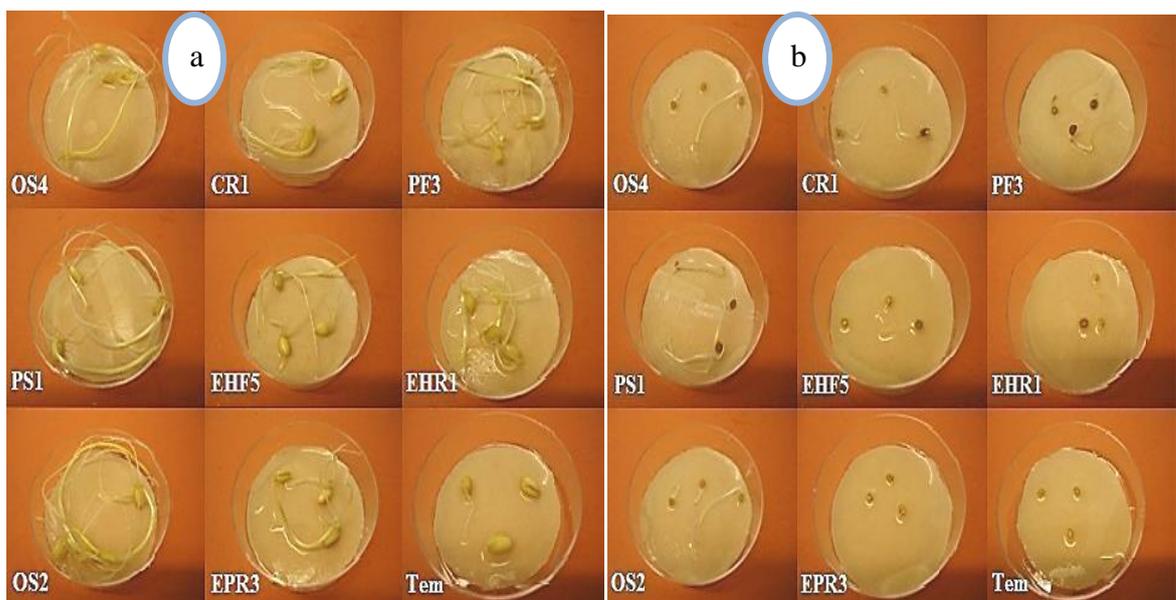


Figure 3.9: Elongation racinaire après 5 jours d'incubation. (a: blé, b: tomate)

L'analyse statistique appliquée à l'élongation racinaire du blé et de la tomate a révélé une différence très hautement significative ( $P=0,00^*$ ) (appendice D, annexe 1) des huit souches testées par rapport au témoin (fig 3.10 a et b), ce qui confirme la production d'ACC. La souche *Pseudomonas* spp. PS1 était la plus efficiente pour les deux espèces végétales testées (blé et la tomate) avec respectivement des longueurs de (3,37 et 2,15) suivie de la souche *Bacillus pumilus* OS2 (3,18 et 1,42). Par ailleurs les souches *Bacillus subtilis* EHF5 et *Bacillus* spp. PF3 ont enregistré une longueur très proche de leurs témoins respectivement pour le blé et la tomate (1,56 ; 1,53) et (0,13 ; 0,11).

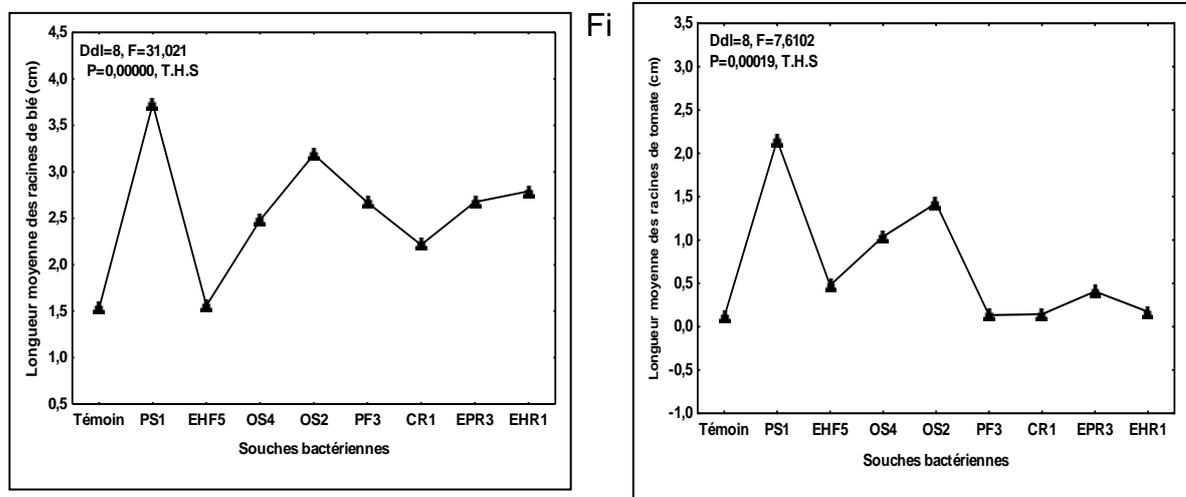


Figure 3.10: Effet de la production d'ACC sur l'élongation racinaire

a: blé, b: tomate

### 3.2.2 Evaluation de la croissance

#### 3.2.2.1 Taux de germination

Nous avons constaté au cours des séjours de la germination du blé, du concombre et de la tomate, une rapidité de germination des graines semées des différents traitements par rapport aux témoins (fig 3.11 a, b et c).

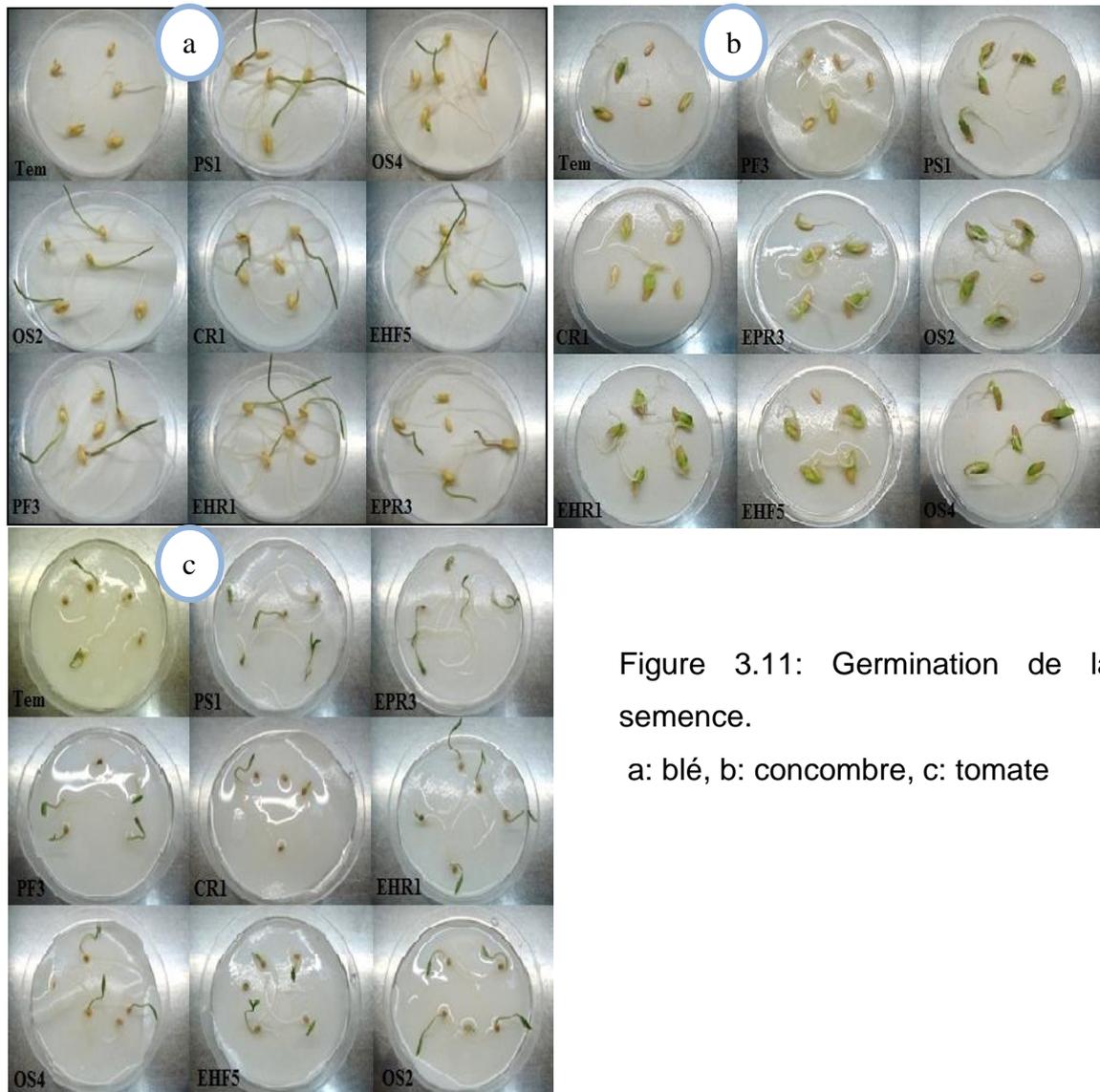


Figure 3.11: Germination de la semence.

a: blé, b: concombre, c: tomate

L'analyse statistique appliquée au taux de germination n'a révélé aucune différence significative entre les différents traitements par rapport aux témoins respectivement pour le blé et le concombre ( $P=0,47$  et  $P=0,07$ ) (appendice D, annexe 2). Par contre, une différence faiblement significative pour la tomate a été révélée ( $P=0,0123$ ) (fig 3.12 a, b et c).

Le meilleur taux de germination a été enregistré chez le blé bactérié par les souches *Bacillus amyloliquefaciens* OS4 et *Pseudomonas* spp. PS1 (100%), par rapport au témoin (86,66%). Par ailleurs, chez le concombre, le meilleur taux de germination a été enregistré chez la semence bactériée par les souches PS1 et OS4 respectivement (100% et 93,33%), par rapport au témoin (73,33%). En revanche, chez la tomate les souches *Pseudomonas* spp. (PS1, EPR3) et *Bacillus amyloliquefaciens* OS4 ont enregistré le meilleur taux de germination (100%).

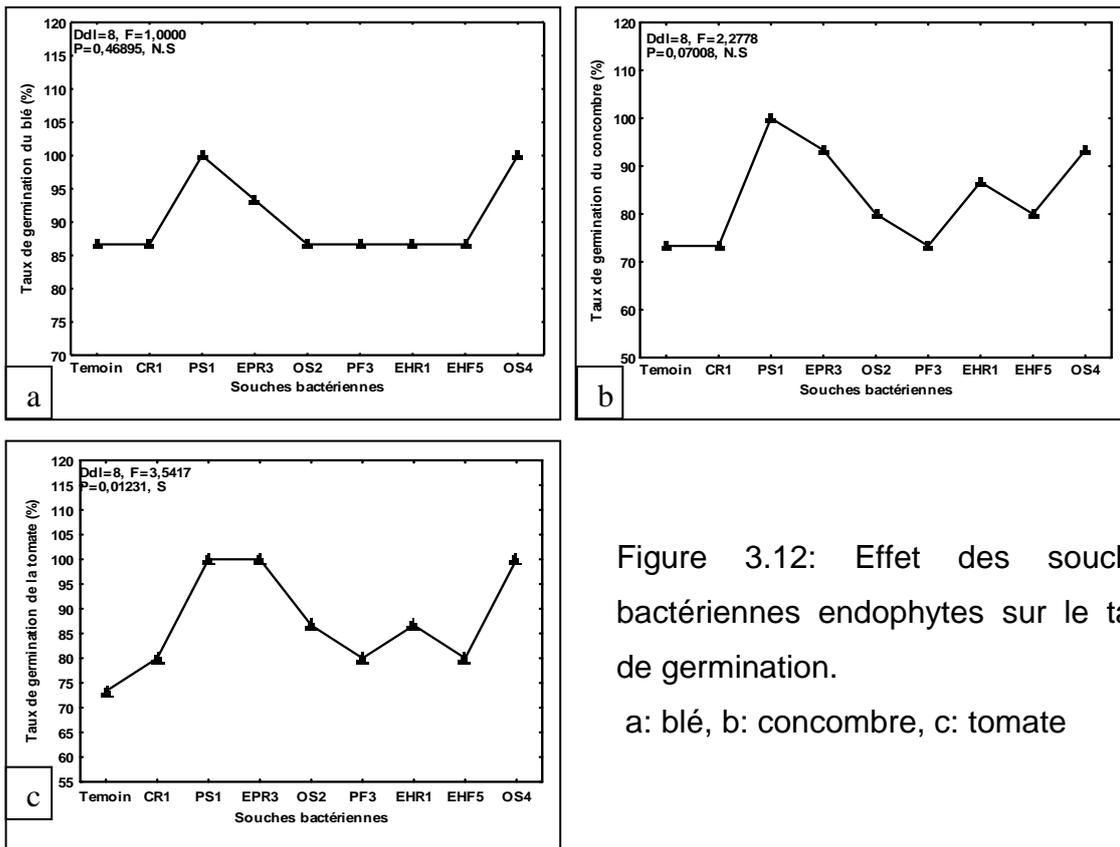


Figure 3.12: Effet des souches bactériennes endophytes sur le taux de germination.

a: blé, b: concombre, c: tomate

### 3.2.2.2 Effet des souches bactériennes sur la longueur moyenne finale de la tige

D'après nos observations et pour les différentes souches testées, nous avons remarqué que la bactérisation de la semence de blé, du concombre et de la tomate a engendré une nette différence de la longueur de la tige des plants par rapport aux témoins non bactérisés (fig 3.16 a, b et c).

L'application des souches bactériennes à la semence de blé, du concombre et de la tomate, montre selon l'ANOVA, des effets hautement significatifs ( $P=0,0028$ ,  $P=0,00^*$ ) (appendice D, annexe 3) (figure 3.13 a, b et c) pour ce paramètre. Les trois espèces traitées présentent une hauteur de la tige supérieure à leurs témoins correspondants.

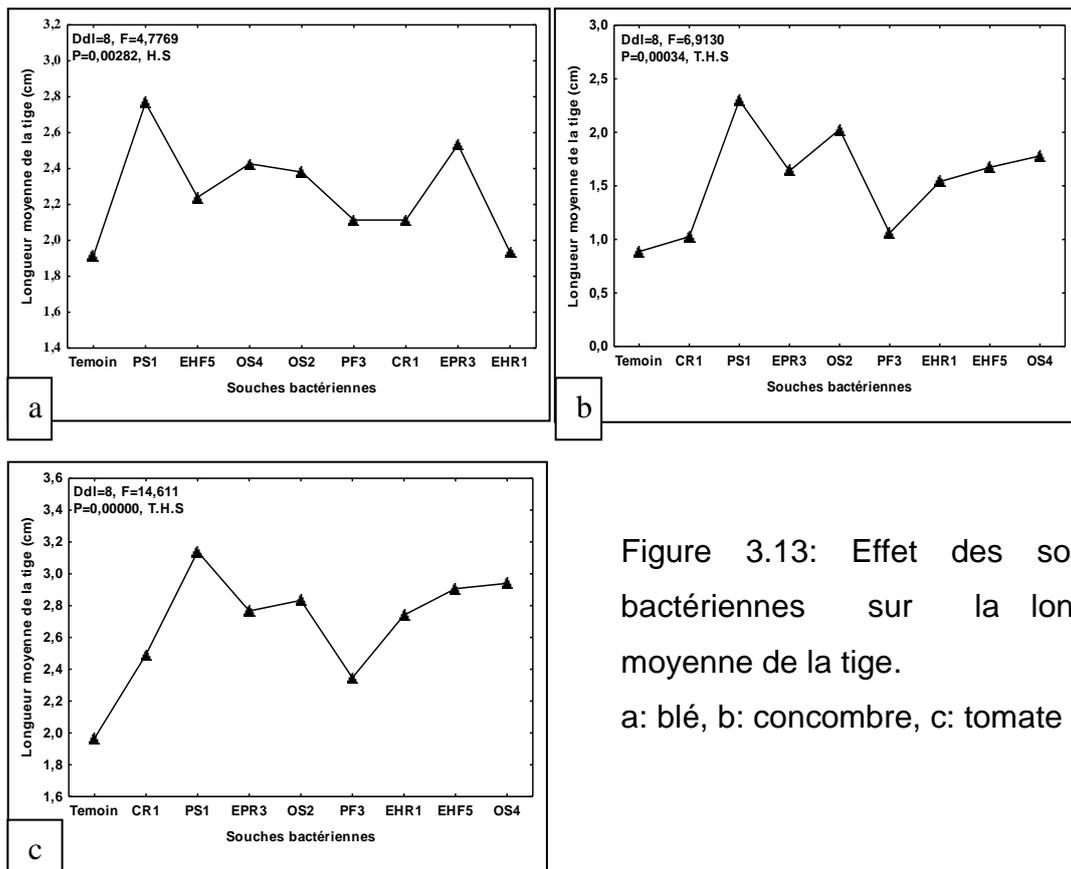


Figure 3.13: Effet des souches bactériennes sur la longueur moyenne de la tige.

a: blé, b: concombre, c: tomate

Cependant, il est à noter la supériorité de l'effet phytostimulateur de la souche *Pseudomonas* spp. PS1 chez toutes les espèces végétales testées (blé, concombre et tomate) avec des valeurs respectivement de (2,76 ; 2,30 et 3,14cm). Par contre, les souches *Bacillus* spp. CR1 et PF3 ont donné les plus faibles longueurs de la tige pour le concombre (1,02 et 1,06cm) et la tomate (2,49 et 2,34cm). Chez le blé, la souche *Bacillus cereus* EHR1 s'est montrée la moins efficace en termes de longueur de la tige (1,93cm).

### 3.2.2.3 Effet des souches bactériennes sur le poids frais moyen de la partie aérienne

D'après les résultats, nous avons remarqué que la bactérisation de la semence du blé, du concombre et de la tomate a induit une nette différence du poids frais de la partie aérienne des plants traités par rapport à leurs témoins et ce, pour les différentes souches testées.

L'analyse de la variance a montré un effet légèrement significatif pour le blé (P=0,047) et un effet très hautement significatif pour le concombre et la tomate (P= 0,00\*) (appendice D, annexe 4) sur ce paramètre (fig 3.14 a, b et c).

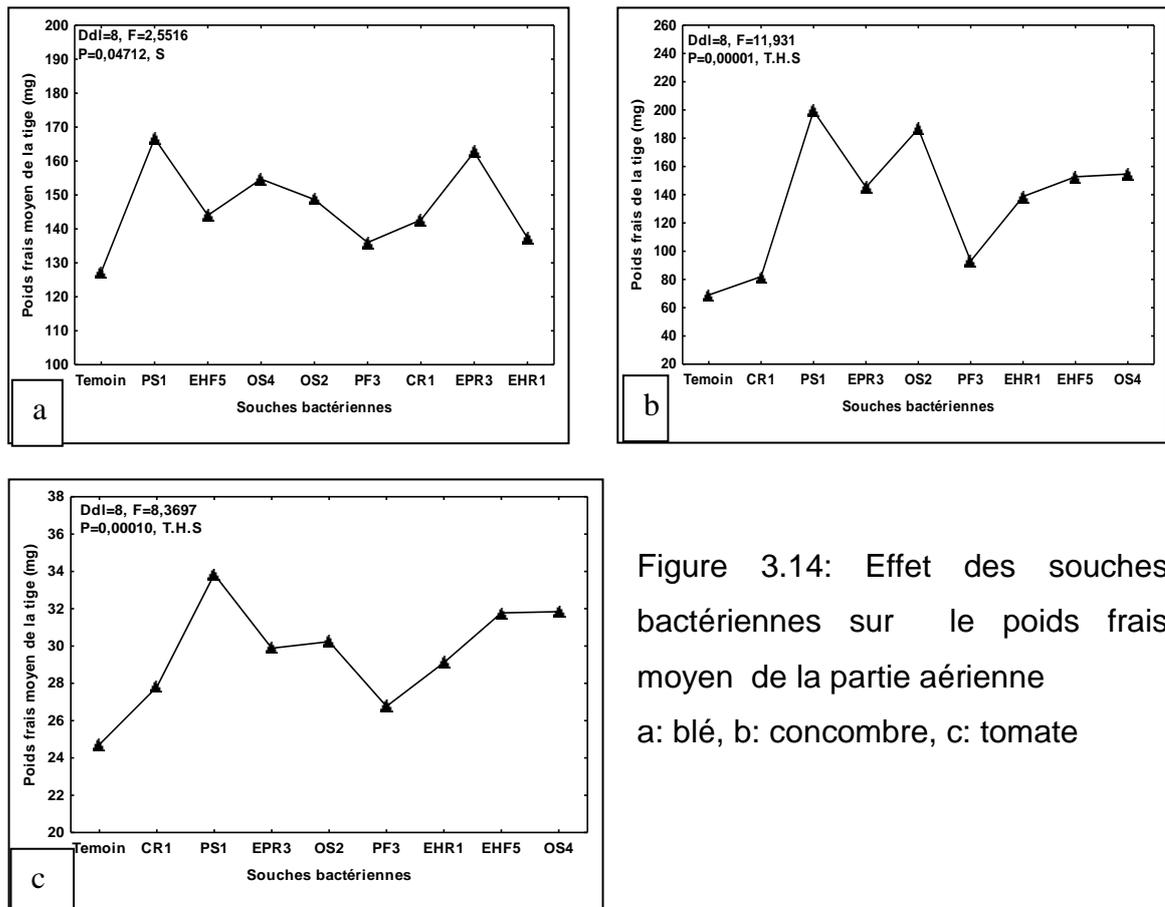


Figure 3.14: Effet des souches bactériennes sur le poids frais moyen de la partie aérienne  
a: blé, b: concombre, c: tomate

La souche *Pseudomonas* spp. PS1 s'est montrée plus efficace en favorisant le développement de la plus importante biomasse aérienne pour les trois espèces testées (blé, concombre et tomate) avec respectivement (166,67 ; 199,33 et 33,85mg). La souche *Bacillus* spp. CR1 s'est révélée la plus faible sur le concombre avec une moyenne de 82,00mg, par contre, chez le blé et la tomate, la souche *Bacillus* spp. PF3 a enregistré le plus faible développement en masse de la partie aérienne avec respectivement les moyennes de 136,00 et 26,77mg.

#### 3.2.2.4 Effet des souches bactériennes sur le poids sec moyen de la partie aérienne

D'après l'analyse de ce paramètre, nous avons remarqué que toutes les souches appliquées à la semence des trois espèces testées ont induit une nette différence du poids sec de la partie aérienne des plants par rapport au témoin.

L'ANOVA, a montré un effet faiblement significatif pour le blé ( $P=0,031$ ) et un effet très hautement significatif pour le concombre et la tomate ( $P= 0,00^*$ ) (appendice D, annexe 5) pour ce paramètre (fig 3.15 a, b et c).

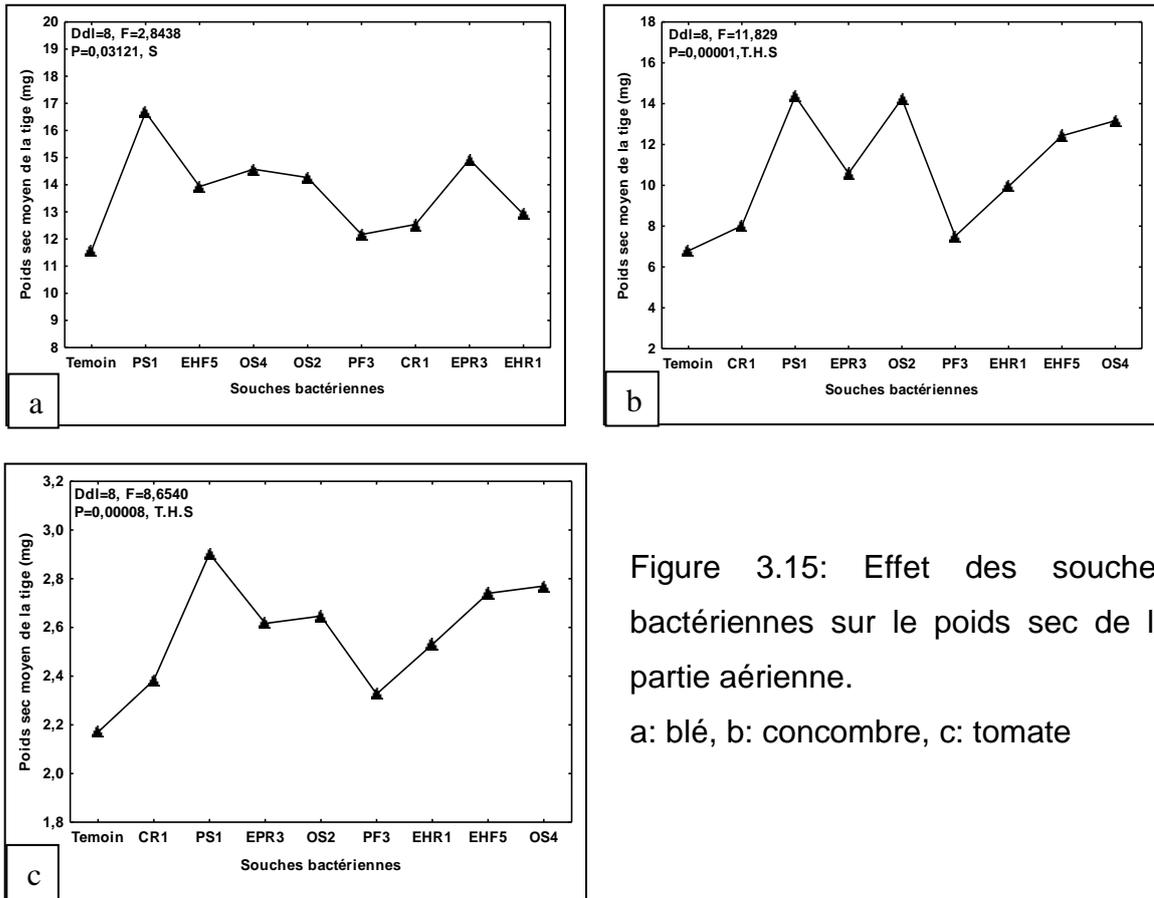


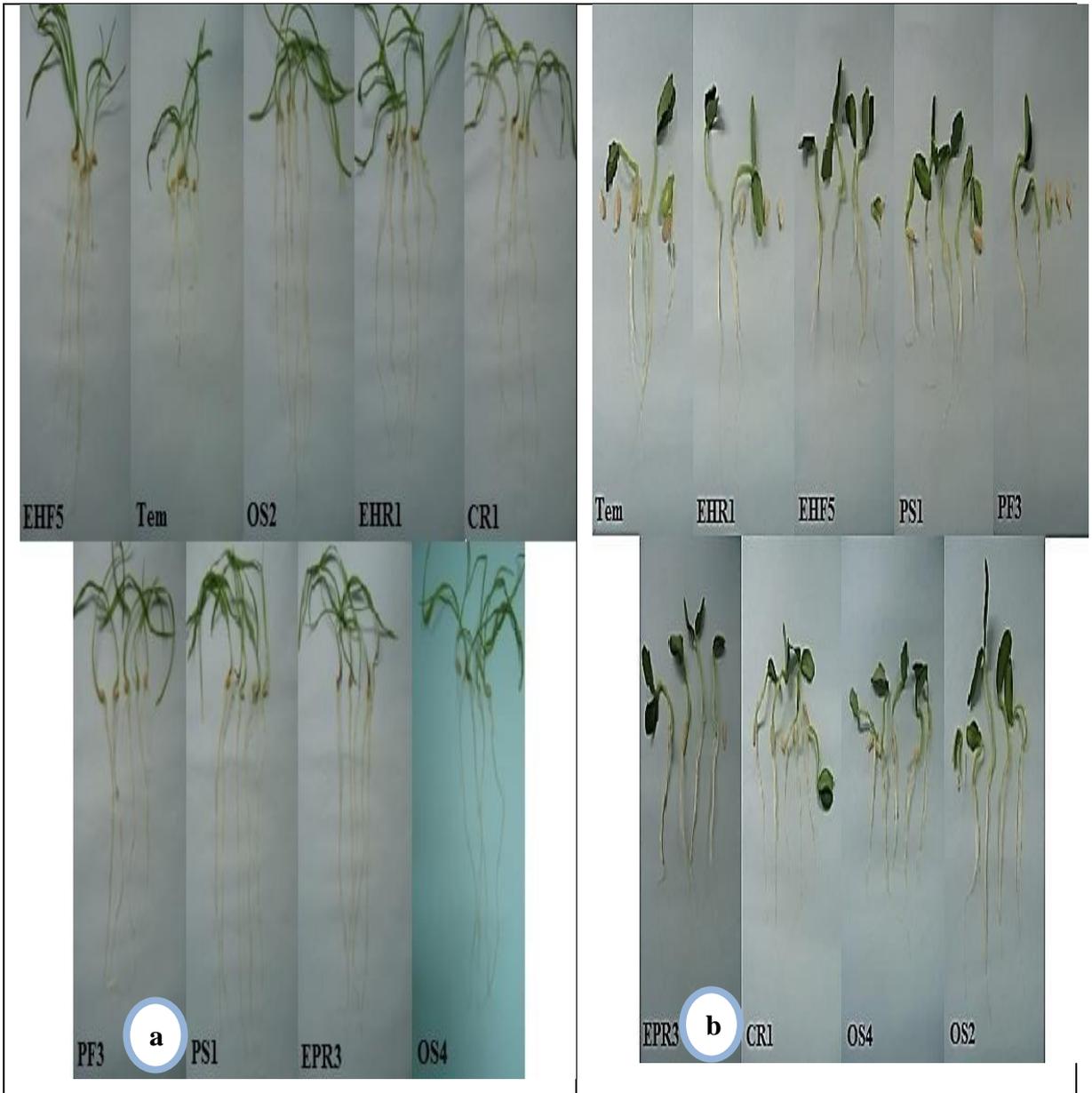
Figure 3.15: Effet des souches bactériennes sur le poids sec de la partie aérienne.

a: blé, b: concombre, c: tomate

Toutes les souches testées ont enregistré un poids sec supérieur à leurs témoins pour les trois espèces étudiées (blé, concombre et tomate). Cependant la souche *Pseudomonas* spp. PS1 a enregistré le plus important poids sec de la partie aérienne respectivement de (16,67 ; 14,37 et 2,90mg) pour les trois espèces, suivie de la souche *Pseudomonas* spp. EPR3 chez le blé (14,93mg), de la souche *Bacillus pumilus* OS2 chez le concombre (14,24mg) et de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* OS4 chez la tomate (2,77mg). Le plus faible poids sec a été donné par la souche *Bacillus* spp. PF3 et ce, pour toutes les espèces respectivement (12,16 ; 7,51 et 2,32mg) par rapport à leurs témoins respectivement (11,58 ; 6,79 et 2,17mg).

### 3.2.2.5 Effet des souches bactériennes sur la longueur moyenne des racines

D'après les résultats, nous avons remarqué que la bactérisation de la semence du blé, du concombre et de la tomate a induit une nette différence de la longueur moyenne des racines par rapport à leurs témoins et ce, pour les différentes souches testées (fig 3.16 a, b et c).



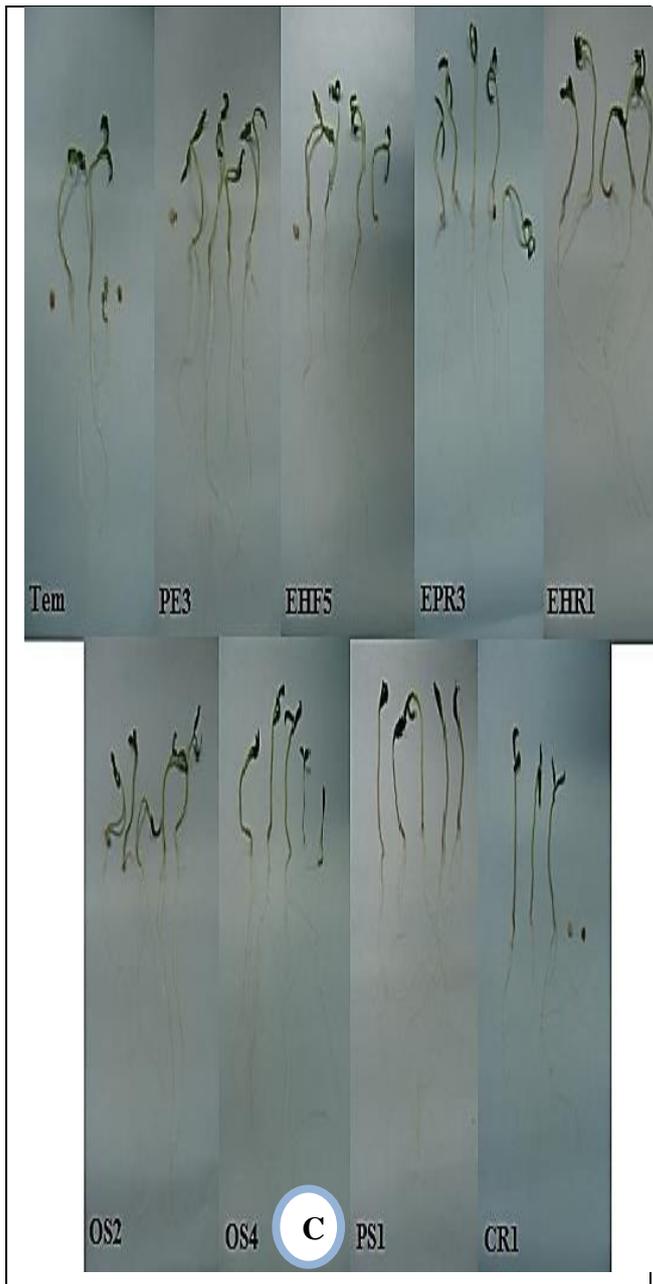


Figure 3.16 : Biomasse de la partie aérienne et souterraine  
a: blé, b: concombre, c: tomate.

L'application de l'ANOVA a permis de déduire que l'effet de la bactérisation de la semence des trois espèces avec les différentes souches bactériennes testées sur la longueur de la racine est très hautement significative ( $P= 0,00^*$ ) (appendice D, annexe 6). Les trois espèces testées présentent une longueur racinaire supérieure à leurs témoins correspondants (fig 3.17 a, b et c).

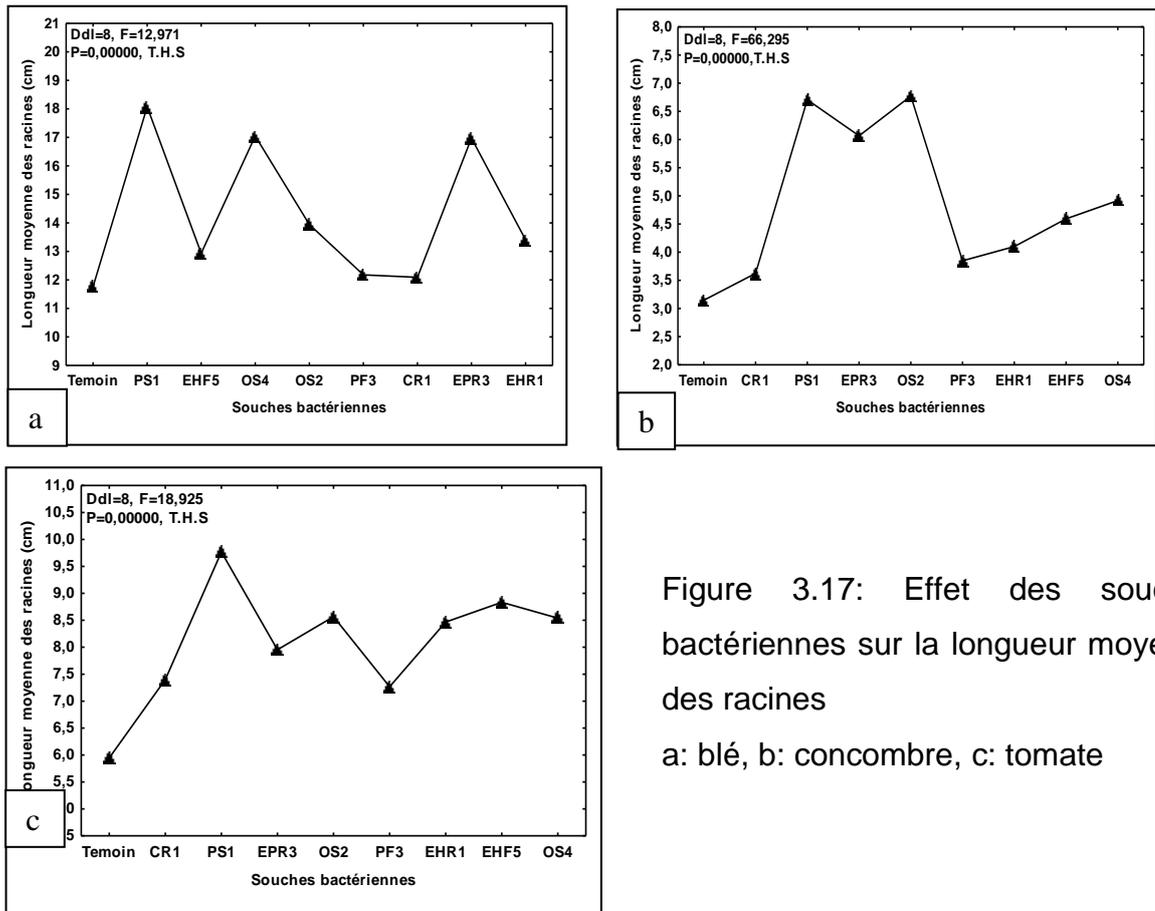


Figure 3.17: Effet des souches bactériennes sur la longueur moyenne des racines

a: blé, b: concombre, c: tomate

La meilleure longueur de la racine a été enregistrée chez les plantules du concombre bactérisées par la souche *Bacillus pumilus* OS2 avec une valeur de 6,77cm suivie de la souche *Pseudomonas* spp. PS1 (6,71cm).

Par contre, chez le blé et la tomate, la meilleure longueur a été donnée par inoculation de la souche *Pseudomonas* spp. PS1 avec une moyenne respective de 18,08 et 9,77cm. Les plus faibles longueurs de la racine ont été enregistrées par la souche *Bacillus* spp. CR1 chez le blé et le concombre avec des valeurs respectives de 12,09 et 3,62cm et la souche *Bacillus* spp. PF3 chez la tomate avec une moyenne de 7,27cm. Par ailleurs, les témoins du blé, du concombre et de la tomate ont enregistré des longueurs respectives de 11,77 ; 3,15 et 5,95cm.

### 3.2.2.6 Effet des souches bactériennes sur le poids frais moyen des racines

Nous avons déduit d'après les résultats obtenus que la bactérisation des trois espèces testées a induit un gain en poids frais de la partie racinaire des différents traitements par rapport au témoin, engendrant après analyse statistique des effets très significatifs ( $P=0,00^*$ ) (appendice D, annexe 7), (fig 3.18).

La souche *Pseudomonas* spp.PS1 s'est montrée la plus efficace pour ce paramètre pour les trois espèces végétales testées (blé, concombre, tomate) en enregistrant des valeurs respectives de 185,33 ; 159,33 et 15,25mg.

Les faibles masses fraîches racinaires ont été enregistrées par la souche *Bacillus subtilis*EHF5 chez le blé avec la valeur de 134mg et la souche *Bacillus* spp.PF3 pour le concombre et la tomate avec des valeurs respectives de 94 et 9,28mg. Par ailleurs, les plus faibles valeurs des trois espèces (blé, concombre, tomate) ont été enregistrées par leurs témoins respectifs (127,33 ; 50,66 et 7,89mg).

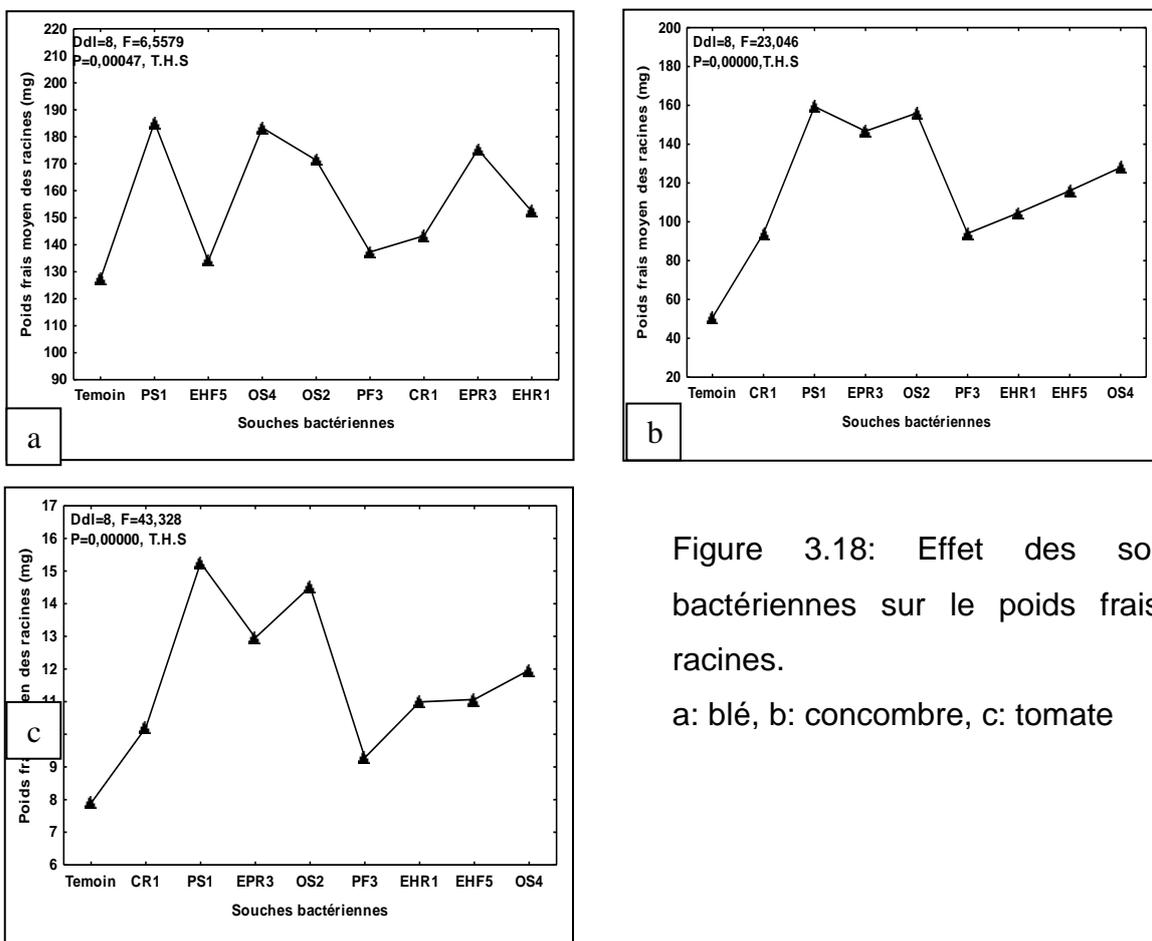


Figure 3.18: Effet des souches bactériennes sur le poids frais des racines.

a: blé, b: concombre, c: tomate

### 3.2.2.7 Effet des souches bactériennes sur le poids sec moyen de la de la partie racinaire

Les résultats ont montré un gain en poids sec de la partie racinaire des trois espèces traitées par les bactéries par rapport à leurs témoins. Les analyses

statistiques montrent des effets très hautement significatifs ( $P=0,00^*$ ) (appendice D, annexe 8), (fig3.19 a, b et c).

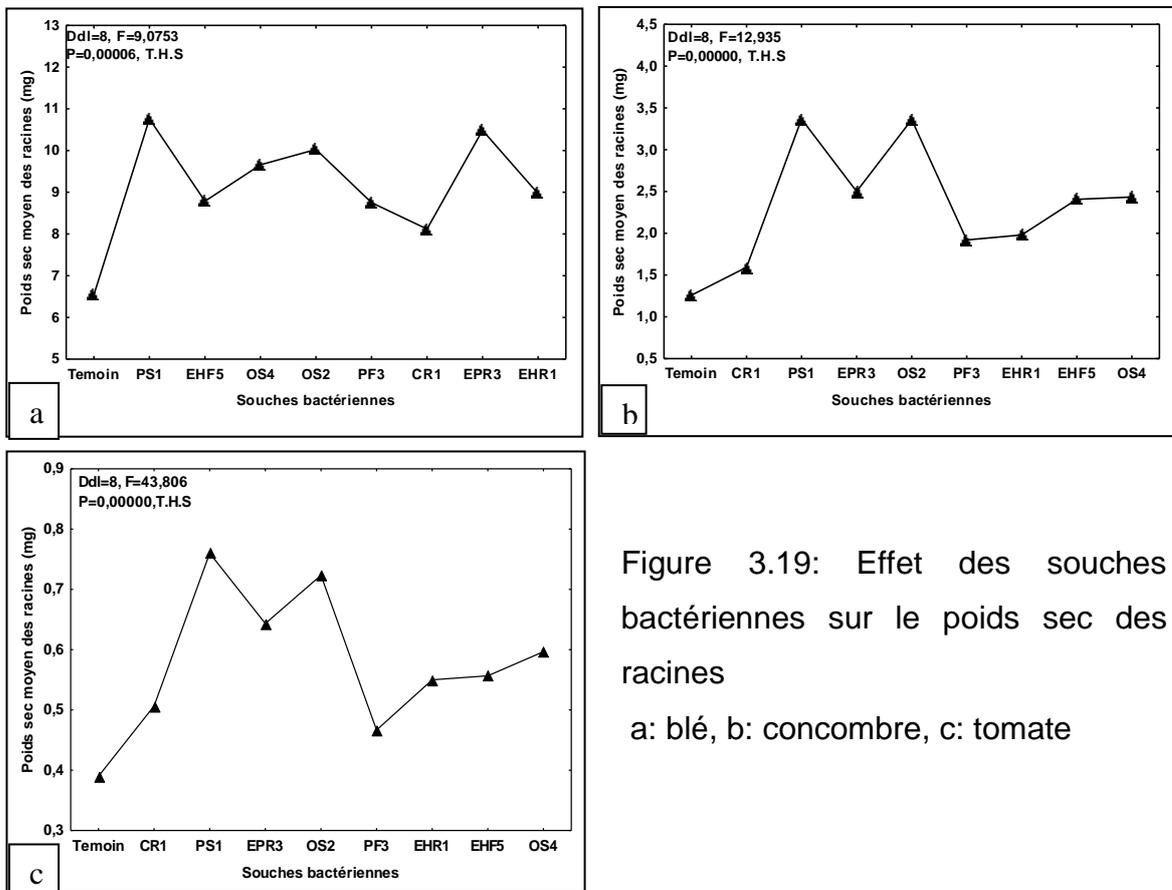


Figure 3.19: Effet des souches bactériennes sur le poids sec des racines

a: blé, b: concombre, c: tomate

Comme pour les paramètres précédents, la souche *Pseudomonas* spp. PS1 s'est montrée la plus efficace pour les trois espèces testées (blé, concombre, tomate), en enregistrant des valeurs respectives de 10,76 ; 3,37 et 0,76 mg.

Les faibles poids secs racinaires ont été enregistrés par la souche *Bacillus* spp. PF3 chez tomate avec la valeur de 0,47mg et la souche *Bacillus* spp. CR1 pour le blé et le concombre avec des valeurs respectives de 8,12mg et 1,59mg.

Par ailleurs, les plus faibles valeurs de poids secs des trois espèces (blé, concombre, tomate) ont été enregistrées par leurs témoins respectifs (6,55 ; 1,26 et 0,39 mg).

### 3.2.2.8 Evaluation de l'indice de vigueur

Nous avons constaté d'après les résultats pour les trois espèces testées, une supériorité de l'indice de vigueur des différents traitements par rapport à leurs témoins (fig 3.20).

L'indice de vigueur le plus élevé a été enregistré par la souche *Pseudomonas* spp. PS1 pour les trois espèces testées : blé, concombre et tomate (294,74 ; 900,67 et 1290,67), suivie par la souche *Bacillus amyloliquefaciens* OS4 pour le blé et la tomate respectivement (259,71 et 1148), et de la souche EPR3 pour le concombre (723,2).

Les plus faibles indices de vigueur ont été donnés par les souches *Bacillus cereus* EHR1, *Bacillus* spp. CR1 et PF3, respectivement chez le blé, le concombre et la tomate (181,41 ; 341,27 et 769,07), comparés aux témoins (178,43 ; 293,73 et 576,53).

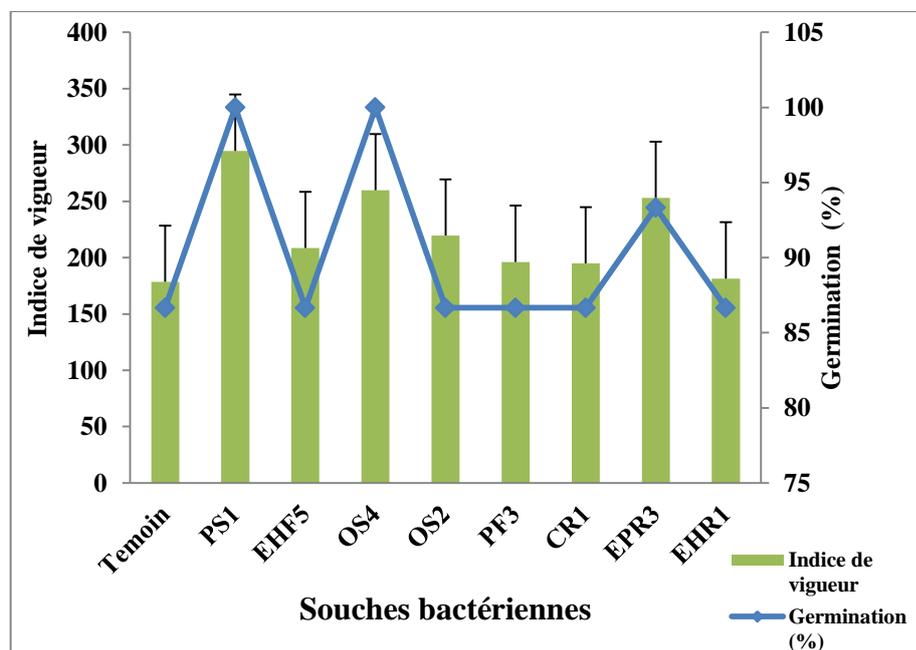


Figure 3.20: Effet des bactéries endophytes testées sur l'indice de vigueur du blé.

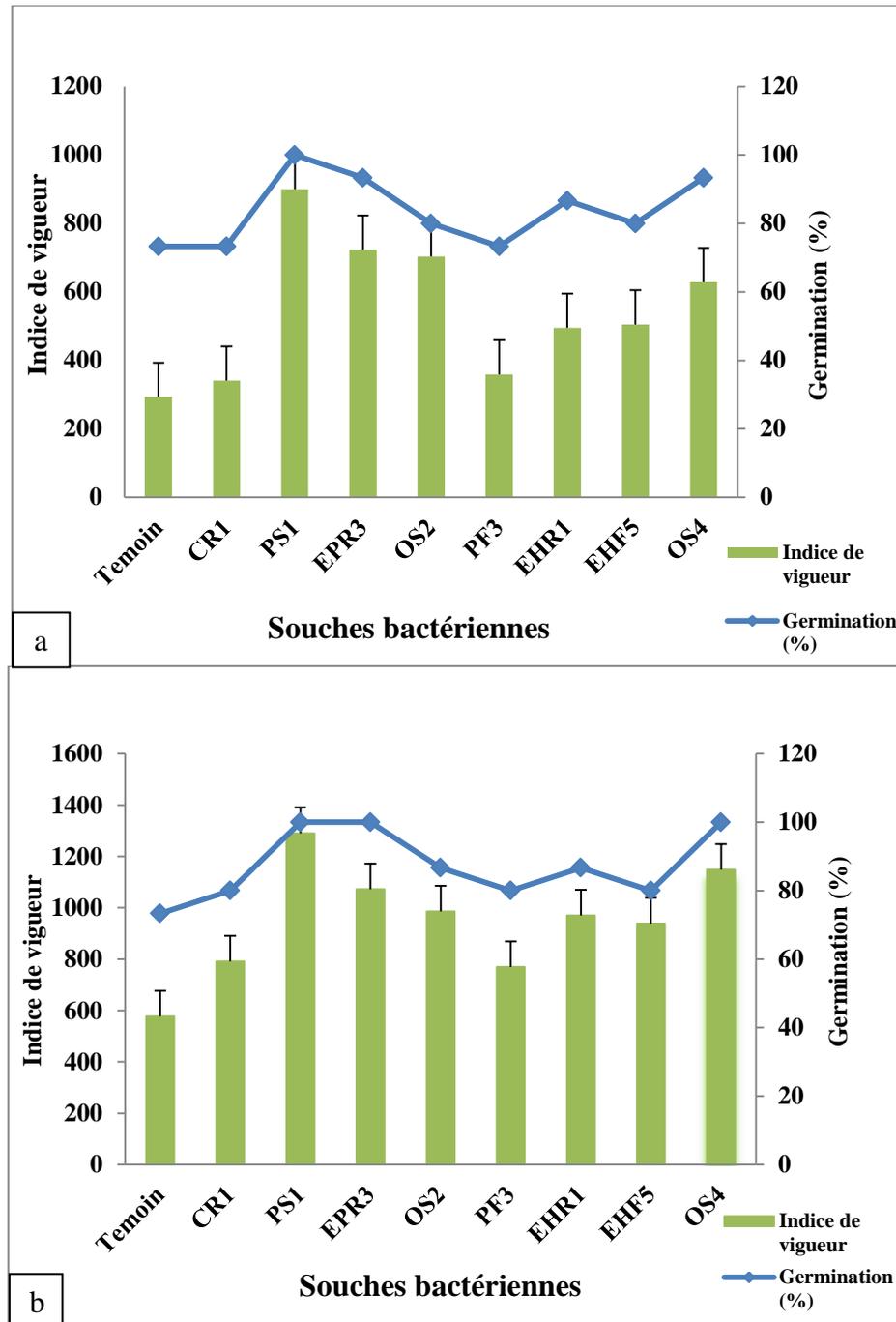


Figure 3.21: Effet des bactéries endophytes testées sur l'indice de vigueur

a: concomre, b: tomate).

### 3.2.2.9 Evaluation des gains des différents paramètres de croissance étudiés *in planta*

D'après les résultats illustrés dans le tableau 3.3 ci-dessous, nous remarquons que la souche *Pseudomonas* spp. PS1 s'est montrée la plus efficace pour tous les paramètres et pour toutes les espèces à l'exception de la longueur

des racines du concombre où la souche *Bacillus pumilus* OS2 a donné le meilleur résultat secondée de très près par la souche *Pseudomonas* spp. PS1 (113,01 et 114,92% pour PS1 et OS2 respectivement).

Nous observons également une variabilité des réponses des autres souches. En effet, certaines souches se sont montrées efficaces pour une espèce et moins pour les autres.

Pour le blé, la souche *Bacillus amyloliquefaciens* OS4 s'est montrée efficace au même niveau que la souche *Pseudomonas* spp. PS1 pour le taux de germination. Alors que, les souches *Bacillus amyloliquefaciens* OS4 et *Pseudomonas* spp. EPR3 se sont montrées efficaces après la souche PS1, et ce, pour l'indice de vigueur, la hauteur de la tige, le poids sec de la partie aérienne et la biomasse racinaire tandis que pour le poids sec de la partie aérienne, c'est les souches *Pseudomonas* spp. EPR3 et *Bacillus pumilus* OS2 qui ont présenté leur supériorité d'efficacité par rapport aux autres souches.

Pour le concombre, la souche *Bacillus amyloliquefaciens* OS4 s'est montrée la plus efficace après la souche *Pseudomonas* spp. PS1, pour le taux de germination. Alors que, pour l'indice de vigueur et la biomasse racinaire c'est la souche *Pseudomonas* spp. EPR3 qui s'est montrée la plus efficace. Par ailleurs, pour la biomasse aérienne, la souche *Bacillus pumilus* OS2 s'est montrée efficace.

Pour la tomate, la souche *Bacillus amyloliquefaciens* OS4 s'est montrée efficace au même niveau que la souche PS1 comme pour le blé, pour le taux de germination. La souche *Bacillus amyloliquefaciens* OS4, s'est montrée la plus efficace après la souche *Pseudomonas* spp. PS1, pour l'indice de vigueur et la biomasse aérienne. Pour la longueur des racines c'est la souche *Bacillus subtilis* EHF5 qui est supérieure. Par contre, pour le poids frais et sec de la partie racinaire, la souche *Bacillus pumilus* OS2 s'est montrée la plus efficace.

Tableau 3.3: Evaluation des gains des différents paramètres de croissance étudiés *in planta* sur les espèces végétales traitées par les bactéries endophytes.

Paramètres	Espèces	Témoin	EHF5	CR1	OS4	PF3	EPR3	EHR1	OS2	PS1	Signification
Germination (%)	Blé	0	0	0	<b>15,39</b>	0	7,69	0	0	<b>15,39</b>	-
	Concombre	0	9,09	0	<b>27,27</b>	0	27,27	18,18	9,09	<b>36,37</b>	-
	Tomate	0	9,09	9,09	<b>36,37</b>	9,09	36,37	18,18	18,18	<b>36,37</b>	*
Indice de vigueur	Blé	0	16,87	9,22	<b>45,55</b>	9,95	<b>41,78</b>	8,63	23,04	<b>65,18</b>	**
	Concombre	0	72,13	16,18	114,12	22,33	<b>146,21</b>	68,63	<b>139,67</b>	<b>206,63</b>	***
	Tomate	0	62,90	37,28	<b>99,12</b>	33,39	85,94	68,27	<b>71,04</b>	<b>123,86</b>	***
Hauteur de la tige	Blé	0	17,28	10,47	<b>26,70</b>	10,47	<b>32,46</b>	1,05	24,61	<b>44,50</b>	**
	Concombre	0	<b>89,77</b>	15,91	102,27	20,45	86,36	75	<b>127,27</b>	<b>161,36</b>	***
	Tomate	0	<b>47,96</b>	27,04	<b>50</b>	19,39	40,82	39,79	<b>50</b>	<b>60,20</b>	***

Poids frais de la tige	Blé	0	13,09	12,04	<b>21,47</b>	6,80	<b>27,75</b>	7,85	16,75	<b>30,89</b>	*
	Concombre	0	<b>121,26</b>	18,84	<b>124,15</b>	34,78	110,62	100,97	<b>170,53</b>	<b>188,88</b>	***
	Tomate	0	<b>28,51</b>	12,5	<b>28,80</b>	8,29	20,87	17,75	22,28	<b>36,93</b>	***
Poids sec de la tige	Blé	0	20,18	8,19	<b>25,71</b>	5,00	<b>28,81</b>	11,38	23,12	<b>43,83</b>	***
	Concombre	0	83,06	18,11	<b>93,96</b>	10,60	55,81	46,53	<b>109,86</b>	<b>111,63</b>	***
	Tomate	0	<b>26,26</b>	9,67	<b>27,64</b>	6,91	20,73	16,58	<b>22,11</b>	<b>33,64</b>	
Longueur des racines	Blé	0	9,94	2,71	<b>44,77</b>	3,48	<b>44,26</b>	13,93	18,43	<b>53,61</b>	***
	Concombre	0	45,71	14,92	56,19	22,22	<b>92,69</b>	30,15	<b>114,92</b>	<b>113,01</b>	***
	Tomate	0	<b>48,40</b>	24,36	43,52	22,18	33,61	42,35	<b>44,03</b>	<b>64,20</b>	***
Poids frais des racines	Blé	0	5,23	12,56	<b>43,98</b>	7,85	<b>37,69</b>	19,63	34,55	<b>45,55</b>	***
	Concombre	0	128,93	85,51	152,61	85,51	<b>189,46</b>	106,57	<b>207,87</b>	<b>214,44</b>	***
	Tomate	0	40,30	29,27	51,96	17,61	0,76	7,35	<b>84,03</b>	<b>93,28</b>	***
Poids sec des racines	Blé	0	34,04	23,96	47,48	33,58	<b>60,15</b>	36,94	<b>53,12</b>	<b>64,27</b>	***
	Concombre	0	91,26	26,19	92,85	52,38	<b>98,41</b>	57,14	<b>166,66</b>	<b>167,46</b>	***
	Tomate	0	46,15	30,77	53,84	20,51	<b>64,10</b>	41,02	<b>84,61</b>	<b>94,87</b>	***

- Non significatif \* Significatif \*\*Hautement significatif\*\*\*Très hautement significatif.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

Notre travail a été réalisé afin d'étudier l'effet phytostimulateur de huit souches bactériennes sur la germination et la levée de trois espèces de plantes cultivées à savoir ; le blé, le concombre et la tomate en évaluant qualitativement et quantitativement les métabolites secondaires produits par ces bactéries endophytes *in vitro* et induisant la croissance *in planta*.

Les résultats obtenus mettent en évidence la sécrétion de quelques métabolites (hormones et enzymes) qui peuvent être impliqués dans la germination, la levée et la croissance des plants.

L'alimentation minérale en phosphore est l'une des principales activités améliorant la croissance des végétaux. Dans cette présente étude, les souches à Gram positif de *Bacillus* spp. (PF3, EHR1, EHF5, OS2, OS4, CR1) et les Gram négatif de *Pseudomonas* spp. (PS1, EPR3) cultivés sur milieu PVK additionné de  $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2$  ont solubilisé le phosphore à des taux appréciables. Par ailleurs, la capacité de certains micro-organismes à transformer le phosphate insoluble sous une forme accessible est une caractéristique fondamentale pour les endophytes [196]. De nombreuses espèces bactériennes en sont capables, parmi elles, celles apparentées aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*. Des halos de solubilisation ont été détectés autour des colonies des huit souches bactériennes testées au cours du test de solubilisation effectué sur le milieu solide (PVK) additionné de  $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2$ , ce qui explique que ces bactéries ont pu solubiliser le phosphore en milieu solide.

La solubilisation du phosphore a été révélée chez toutes les bactéries endophytes testées sur milieu liquide, elle est cependant variable d'une souche à une autre. La quantité du phosphore solubilisé par ces bactéries était supérieure à celle du témoin et il s'avère que la souche *Pseudomonas* spp. PS1 présente une

capacité de solubilisation supérieure à toutes les autres bactéries. Nos résultats corroborent avec ceux de Wani *et al.* [197] qui rapportent que parmi les communautés bactériennes du sol, les souches de *Pseudomonas*, de *Bacillus* et de *Rhizobia* endosymbiotiques ont été décrites comme agents de solubilisation efficaces. Cette propriété permet à ces bactéries de libérer une quantité de phosphore supérieure à celle nécessaire à leur métabolisme, ce qui permet aux plantes d'absorber le surplus ; d'où leurs intérêts dans une biofertilisation rationnée [198].

Il est à souligné en plus que cette solubilisation a été accompagnée d'une baisse de pH. Ces résultats confirment ceux de plusieurs chercheurs qui ont associé la solubilisation des phosphates à une baisse du pH du milieu [199]. Cet abaissement est dû à plusieurs facteurs tels que: la libération d'ions  $H^+$  et la production de substances chélatrices ou d'acides organiques. Les bactéries solubilisant le phosphore (PSBs) secrètent des acides organiques et des phosphatases qui convertissent les formes insolubles des phosphates en ions phosphates solubles monobasique ( $H_2PO_4^-$ ) et dibasique ( $HPO_4^{2-}$ ). Ce phénomène est attribué à la solubilisation minérale du phosphate (SMP) [200].

Dans cet essai, une relation inverse a été observée entre le pH et la quantité du phosphore soluble (plus le phosphore soluble augmente, plus le pH baisse), ceci peut être expliqué par la production des acides organiques des huit souches bactériennes testées qui jouent un rôle significatif dans l'acidification du milieu et facilitant la solubilisation du phosphore. Cette relation inverse entre le pH et le phosphore soluble a été décrite par Illmer et Schinner [201] et Hwangbo *et al.* [202] qui rapportent que les microorganismes libèrent le phosphore par la production d'acides organiques et/ou par la sécrétion d'ions  $H^+$ . Par conséquent, le phosphore peut être libéré par la substitution des protons ou sa complexation avec l'ion  $Ca^{2+}$ .

Lors de la solubilisation du phosphore en milieu liquide, des modifications peuvent se produire au niveau de la paroi cellulaire des microorganismes qui acidifient l'espace périplasmique par une oxydation directe du glucose, ce qui conduit à la libération de différents acides organiques comme l'acide lactique, gluconique, isobutyrique, acétique, glycolique, oxalique, malonique et succinique

[203]. Il y'a une spécificité de production d'acides organiques chez les microorganismes, il est établi que les souches de *Bacillus* libèrent l'oxalate, le 2-cétoglutarate et le succinate [204]. D'autres travaux suggèrent que les souches de *Bacillus atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens* et *B. licheniformis* solubilisent le phosphore par la production d'acides organiques volatiles comme l'acétate, l'isobutyrate, le valérate et l'isovalérate et non volatiles ; comme le lactate, le fumarate et le succinate [205]. Cependant, la production de ces molécules est plus aisée en milieu liquide qu'en milieu solide [206].

L'indice de solubilisation élevé obtenu avec les endophytes testés sur milieu solide montre leur forte capacité de solubilisation du phosphore. Plusieurs travaux similaires à la présente étude ont démontré la capacité des bactéries telles que les espèces de *Bacillus* et de *Pseudomonas* de solubiliser le phosphore [207 ; 208]. La souche *Pseudomonas* spp. PS1 a été la plus performante pour la solubilisation du phosphore, ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Rashid et al., [209] selon lesquels les bactéries à Gram négatif sont souvent plus efficaces dans la solubilisation du phosphore minéral grâce à leur capacité de production de l'acide gluconique impliqué dans ce phénomène. De même, les six souches de *Bacillus* testées dans cette étude ont été aussi performantes pour ce paramètre de croissance végétale, d'ailleurs, les espèces appartenant à ce genre ont été citées parmi les plus importantes communautés bactériennes du sol intervenant dans le cycle du phosphore [197].

Les bactéries bénéfiques peuvent aussi affecter directement la croissance des plantes par la production de molécules biologiquement actives comme les auxines [210]. Ces dernières molécules sont essentielles pour la physiologie des plantes, car elles affectent l'architecture de la racine et de la pousse [211]. D'une manière générale, l'auxine stimule principalement la croissance racinaire permettant à la plante de puiser les nutriments nécessaires à partir du sol, ce qui améliore les capacités de nutrition et la croissance végétale [203]. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur de l'AIA, son addition au milieu artificiel lors de l'analyse de ce paramètre, favorise et augmente la synthèse de cette hormone [210]. Dans les conditions naturelles, les exsudats racinaires constituent une source naturelle du L-tryptophane pour la microflore rhizosphérique [212].

Selon les résultats de la présente étude, la synthèse de l'AIA est variable pour les différentes souches testées. L'analyse des résultats de ce composé révèle une synthèse de cette hormone par les souches de *Bacillus* OS2, EHR1 et OS4 et de *Pseudomonas* PS1, EPR3 avec des concentrations allant de 15,084 à 28,020 µg/ml. Des résultats comparables ont été obtenus par Cherif [213] qui rapporte que L'AIA est synthétisé par certaines souches de *Bacillus* à des valeurs allant de 10 à 30 µg/ml. De même, Kapoor et al. [214] signalent que la production maximale de l'AIA chez sept souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de pommier et trois souches isolées de la rhizosphère de poirier variait dans l'intervalle de 0,50 à 15µg/ml. En revanche, les souches de *Bacillus* spp. PF3 et *Bacillus subtilis* EHF5 de cette étude, ont fait exception et ont produit des quantités faibles (1,586 et 2,872 µg/ml) alors que chez la souche de *Bacillus* spp. CR1, la production s'est révélée nulle.

Les résultats de la présente étude ont révélé des valeurs de production de l'AIA faibles (28,020 à 1,586µg/ml) par rapport à celles présentées dans d'autres rapports. Les travaux d'Ahmad et al. [215] annoncent que les espèces de *Pseudomonas* spp. affichent des niveaux de production de 2,13 et 3,6mg/l alors que ceux de Gravel et al. [216] ont rapporté des niveaux de 3,3 et 6,2mg/l pour *P. putida*. Par ailleurs, Kumar et al. [217] a révélé, que la production d'AIA par les PGPR pourrait varier entre les différentes espèces et souches de rhizobactéries. Il a été montré que le faible niveau de l'AIA produit par les rhizobactéries favorise l'allongement primaire des racines. Ce type de clarification a suggéré que, même à concentration faible d'AIA, les isolats rhizosphériques peuvent être en mesure de stimuler la croissance de la plante [218]. D'ailleurs, Barazani et Friedman [219] indiquent que les bactéries capables de sécréter un taux supérieur à 13,5µg/ml de composés indoliques sont considérées comme étant des PGPR car, de faibles quantités d'AIA de  $10^{-9}$  à  $10^{-12}$  M sont nécessaires pour la croissance primaire des racines [220]. Dans ce même ordre d'idées, Arshad et Frankberg, [221] ont rapporté que lorsque les concentrations d'auxines naturelles comme l'AIA sont très faibles, elles stimuleraient la germination et l'induction des racines par la production de poils racinaires et des racines latérales, mais lorsque celles-ci sont élevées, elles réduiraient l'élongation de ces dernières [222]. Nous suggérons par conséquent que les taux obtenus dans cette étude par les souches de *Bacillus*

*pumilus* OS2, *Bacillus amyloliquefaciens* OS4, *Bacillus cereus* EHR1, *Pseudomonas* spp. (PS1, EPR3), *Bacillus* spp. PF3 et *Bacillus subtilis* EHF5 sont donc suffisants pour stimuler la croissance végétale confirmés ultérieurement par les résultats in planta.

L'acide cyanhydrique est un antibiotique volatil qui est un métabolite secondaire produit par les PGPR impliqué dans l'élimination de divers agents pathogènes [223]. L'HCN est un inhibiteur efficace du cytochrome c oxydase et d'autres métallo-enzymes [224].

La production de l'HCN est une activité très commune chez les genres *Pseudomonas* (88,89%) et *Bacillus* (50%) dans le sol rhizosphérique. Plusieurs études ont rapporté que cette molécule améliore indirectement la croissance des plantes [197 ; 216]. Les résultats de nos essais révèlent que les souches de *Pseudomonas* et de *Bacillus* testées ont plus au moins produits de l'HCN sur le milieu contenant de la glycine à l'exception de la souche *Bacillus* spp. CR1 pour laquelle la production est nulle. Castric [225] rapporte que l'HCN et le CO<sub>2</sub> se forment à partir de la glycine par l'HCN synthétase. Chez les *Pseudomonas* spp. cette enzyme oxyde la glycine en présence d'accepteurs d'électrons, comme le méthosulfate phénazine [285]. Bien que ce composé soit un inhibiteur métabolique général, il est excrété dans le milieu externe comme moyen d'éviter la prédation ou la compétition [227]. Toutefois, la majorité des souches testées ne possèdent pas la capacité de production de l'HCN en quantité importante. En effet, la biosynthèse des métabolites secondaires tels que l'HCN a été démontré chez un petit nombre d'espèces bactériennes, comme *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *Chromobacterium violaceum* [105 ; 106]. En plus de la glycine comme précurseur, d'autres composés peuvent être utilisés tels que le glutamate ou la méthionine [225]. L'absence de la production de l'HCN pour la souche *Bacillus* spp. CR1 peut être expliquée par l'absence des gènes (*hcn*) qui codent pour les protéines responsables de la production de ce métabolite [228].

La production de l'ammoniac est une autre caractéristique des endophytes qui influence indirectement la croissance de la plante. C'est une substance volatile également impliquée dans la suppression de différents agents pathogènes. Toutes les souches bactériennes testées ont produit de l'ammoniac. Nos résultats

confirment ceux de Joseph *et al.* [229] et Ahmed *et al* [215] qui rapportent que la production de  $\text{NH}_3$  est très fréquente chez les *Pseudomonas* et les *Bacillus*.

Toutes les souches bactériennes testées dans la présente étude étaient capables de produire la catalase. Nos résultats confirment ceux obtenus par [217] qui rapportent que l'activité catalase a été détectée dans la plupart des PGPR bactériens de la rhizosphère en particulier ceux appartenant aux genres les plus communs comme *Pseudomonas* et *Bacillus*. Les souches bactériennes testées présentant une activité de catalase doivent être très avantagées et elles peuvent être résistantes à tout type de stress environnemental, biotique et abiotique. Les auteurs suggèrent que les bactéries détentrices de cette activité présentent une compétence dans leurs environnements comparées à celles qui en sont dépourvues [230 ; 231].

La différence dans les résultats concernant le paramètre de l'élongation racinaire chez les six souches testées (PS1, OS2, OS4, EPR3, CR1, EHR1) pour les deux espèces étudiés (blé et tomate) est due probablement à la production de l'ACC désaminase par ces souches. En effet, la synthèse de cette enzyme est corrélée positivement à l'élongation racinaire [99].

La présence de l'ACC désaminase chez les souches testées de *Pseudomonas* et de *Bacillus* peut être utilisée comme un outil pour la sélection des endophytes dans la promotion de la croissance des plantes sous différentes conditions environnementales. En effet, cette enzyme en réduisant les concentrations de l'éthylène endogène soulage la plante de plusieurs stress induits par les infections des organismes pathogènes, la toxicité des métaux lourds, la salinité élevée et même la sécheresse, les contaminants organiques et la prédation des insectes [232].

D'une manière générale, toutes les souches testées étaient capables de produire des métabolites de l'induction directe de la croissance. Néanmoins, il apparait que certaines souches sont plus performantes que d'autres. Ces souches ont montré aussi la production de métabolites de biocontrôle agissant de manière indirecte sur la croissance. En effet, souvent, les effets de stimulation de la croissance ont été considérés comme effets indirects résultant de la réduction et

de l'inhibition des populations microbiennes pathogènes ou délétères, donc comme conséquence de biocontrôle [233].

L'essai de la promotion de la croissance menée *in planta* par l'utilisation des huit souches bactériennes testées (*Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp.) pour les trois espèces cultivées étudiées (blé, concombre et tomate), a montré une amélioration de la croissance végétative significative. L'amélioration de la levée de la germination ainsi que tous les paramètres de croissance étudiés comparés aux témoins se sont montrés significatifs après apport des bactéries endophytes testées. Cette amélioration a permis une augmentation de la biomasse végétative et racinaire des vitro-semis.

Les effets de la biostimulation enregistrés par les huit souches bactériennes PS1, EHR1, CR1, EHF5, PF3, EPR3, OS4 et OS2 sur la levée du blé, du concombre et de la tomate se traduisent par une augmentation et une rapidité du nombre des graines germées des différents traitements, par rapport au témoin pendant un séjour de germination de 5 jours pour le blé et 7 jours pour le concombre et la tomate. Par ailleurs, les souches de *Bacillus amyloliquefaciens* OS4 et de *Pseudomonas* spp. PS1 se sont montrées plus efficaces pour la germination des graines blé et de la tomate (100%). Cependant, pour la germination du concombre, la souche *Pseudomonas* spp. PS1 s'est montrée la plus efficiente affichant un taux maximal de 100%, suivie par les souches *Bacillus amyloliquefaciens* OS4 et *Pseudomonas* spp. EPR3 avec des valeurs respectives de 93,33% et 73,33%.

Les effets de la biostimulation des endophytes dans notre étude n'ont pas influencé significativement le taux de germination pour le blé et le concombre. Nos résultats ne corroborent pas avec ceux de Shaukat et *al.* [234] qui rapportent que les *Azospirillum*, les *Pseudomonas* et les souches d'*Azotobacter* pourraient affecter la germination des semences et la croissance des semis du blé et de tournesol, dans certains cas jusqu'à 100% supérieure à celle des contrôles. Ces constatations peuvent être dues, soit à la durée de la bactérisation et/ou à la concentration de l'inoculum qui est insuffisante. En effet Jacoud et *al.* [235]. rapportent que l'inoculation des bactéries PGPR sur la plante est dépendante à la fois de la densité de l'inoculum, mais également, de la période de contact pour

obtenir un effet sur la croissance. Cette période va de la germination à l'émergence de la racicule.

Par contre, cet effet biostimulateur de la germination de la tomate a été significatif, laissant supposer que la durée de 7 jours était suffisante pour induire un effet positif. Ceci peut être expliqué par le fait que les endophytes régulent le taux de l'éthylène dans les racines en favorisant sa production au début de la germination pour la levée de la dormance de la graine permettant ainsi d'augmenter le taux de la germination [236].

Le suivi de la levée des vitro-semis du blé, du concombre et de la tomate nous a permis d'enregistrer une phytostimulation significative relative aux paramètres de la hauteur de la tige, le poids frais et sec de la biomasse aérienne, la longueur des racines, le poids frais et sec de la biomasse racinaire ainsi que l'indice de vigueur et ce, quelque soit la souche et l'espèce étudiées.

Cette présente étude visant à mettre en évidence l'effet de bactéries endophytes isolées à partir de plantes spontanées nous a permis de déceler une forte stimulation de la croissance végétale par l'appréciation de l'ensemble des paramètres relatifs à la partie racinaire et aérienne. La bactérisation des semis de la tomate conduite *in planta* a en effet induit une amélioration significative concernant la levée et le développement de la biomasse aérienne et racinaire. Ces résultats corroborent avec ceux de plusieurs auteurs sur différentes espèces végétales [237; 238 et 239].

Cette biostimulation de la levée peut être due également à une amélioration des potentialités physiologiques des semences en les prédisposant à une meilleure adaptation et en induisant une germination rapide par la présence des régulateurs de croissance qui accélèrent la levée de la dormance des semences [236]. En effet, les bactéries endophytes sont à l'origine de la synthèse de phytohormones ou de vitamines responsables de la promotion de la croissance, telles que des auxines, dont, l'acide indole acétique (AIA), les cytokinines et les gibbérellines [16 ; 240]. Cette capacité de production de l'une de ces molécules pour les bactéries endophytes testées dans la présente étude a été confirmée *in vitro* et son impact s'est traduit par une nette amélioration de la croissance végétale lors des tests *in planta*. Il a été montré que l'acide indole acétique

d'origine microbienne joue un rôle majeur dans la promotion de la germination chez les orchidées qui manifestent en général une récalcitrance à la croissance. Chez d'autres espèces végétales étudiées, les bactéries endophytes *Azospirillum brasilense* souche AZ39 et *Brayrhizobium japonicum* souche E109 ont été capables de sécréter de l'AIA dans le milieu de culture à des concentrations suffisantes pour produire des changements morphologiques et physiologiques dans les tissus jeunes de semences de maïs (*Zea mays* L.) et de soja (*Glycine max* L.) et étaient responsables d'une croissance précoce [241].

Des résultats ont révélé que certaines bactéries de la rhizosphère stimulent indirectement la croissance en induisant une augmentation de la germination des graines, par la synthèse d'hormones et essentiellement, de gibbérellines qui déclenchent l'activité des enzymes spécifiques en stimulant la synthèse de l'amylase qui augmente la disponibilité en nutriments [242].

Les effets de la biostimulation enregistrés par les huit souches bactériennes comparés par rapport au témoin non bactérisé ont induit une augmentation notable de la biomasse par la stimulation de la croissance du système racinaire (biomasse racinaire). Ce résultat permet par conséquent une plus grande exploitation du milieu de culture, une augmentation de la surface d'échange et une nutrition améliorée. La croissance racinaire se traduit par une vigueur importante des vitro-semis et un meilleur développement de la partie aérienne. Cette biostimulation végétative peut être expliquée par les métabolites secondaires sécrétés par les souches bactériennes testées. En plus, nous avons observé que, toutes les bactéries qui ont stimulé la germination et la levée des trois espèces, dans cet essai, solubilisent en grande quantité le phosphore et produisent sensiblement des quantités appréciables en acide indole acétique et d'ACC deaminase.

Certains auteurs rapportent que la stimulation de la croissance est due à la production des phytohormones, des enzymes impliquées dans le métabolisme des régulateurs de croissance produites par les endophytes, tels que l'éthylène, l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) deaminase, les auxines, l'acétoïne, 2,3-le butanediol, les cytokinines, ou de leurs combinaisons. En effet, le précurseur de l'éthylène, l'acide l'acide 1-aminocyclopropane- 1-carboxylique (ACC) qui est souvent synthétisé dans les conditions de stress biotique ou

abiotique, peut diminuer la concentration de l'éthylène produit par la plante et permet l'élongation racinaire en favorisant le développement de la partie aérienne [243 ; 244]. Après un séjour de 14 jours pour la tomate et le concombre et 10 jours pour le blé, les vitro semis ont montré une performance dans les paramètres de croissance liée à l'indice de vigueur et le gain de croissance de la partie aérienne et racinaire. En effet, les souches de *Pseudomonas* spp. (PS1, EPR3) et de *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus subtilis* se sont montrées les plus réactives pour les trois espèces étudiées. En revanche il a été constaté une différence dans la réaction du génotype notamment pour le blé vis-à-vis de la biostimulation de la levée par ces différentes souches endophytes. Néanmoins, la souche *Pseudomonas* spp. PS1 a montré sa supériorité avec les trois espèces étudiées (blé, tomate et concombre) en particulier pour le concombre. Nos résultats confirment et complètent ceux d'une étude antérieure qui ont annoncé une performance dans les paramètres de croissance liés à la partie aérienne et racinaire de vitro semis de la tomate cultivés sur milieu additionné de filtrats de la souche *Pseudomonas* spp. PS1 [245].

Ces résultats révèlent la performance des métabolites secondaires secrétés par les *Pseudomonas* spp. probablement par la synthèse de sidérophores (pyoverdines ou pseudobactines). Ces molécules sont impliquées dans l'amélioration de la croissance des plantes et contribuent à l'acquisition du fer par les végétaux [246 ; 247]. Nous suggérons par conséquent, leur recherche dans les travaux futurs.

Les résultats de cette étude montrent aussi que les activités des endophytes bactériens testées sont diverses; certaines souches possèdent des capacités remarquables de phytostimulation de la croissance en vue de leur utilisation comme biofertilisants (PS1, EPR3, OS2, OS4, EHF5 et EHR1), alors que d'autres sont dotées exclusivement d'un pouvoir de biocontrôle (*Bacillus* spp. PF3 et CR1) pour lesquels, il serait souhaitable de tester leur pouvoir antifongique et antibactérien.

## CONCLUSION

L'étude relative au rôle des endophytes dans la croissance et son application dans l'amélioration des espèces végétales constitue à l'heure actuelle un enjeu majeur. En effet, leur utilisation rentre dans le contexte de la fertilisation des sols pauvres et la stimulation de la croissance des plantes dont la finalité est de réduire l'application de produits fertilisants et de restaurer la productivité des cultures en zones difficiles.

La diversité des bactéries endophytes et leurs capacités dans la promotion de la croissance des plantes par divers mécanismes a porté sur six souches de *Bacillus* et deux souches de *Pseudomonas*; et elle a mis en évidence les déductions suivantes:

La majorité des souches se sont avérées être des biofertilisants potentiels par l'apport d'éléments nutritifs à la plante. Elles ont la capacité de solubiliser les phosphates à des taux élevés. Par leur production de l'AIA et de l'ACC deaminase, les souches testées peuvent être considérées comme phytostimulatrices. Certaines sont également performantes dans la production des produits volatiles tels que l'acide cyanidrique et l'ammoniac, et la production de la catalase. La présence de ces activités a été signalée chez l'ensemble des souches testées. Ces souches peuvent être aussi efficaces pour le biocontrôle des agents phytopathogènes comme elles peuvent agir indirectement sur la croissance des plantes.

Les effets bénéfiques des microorganismes utilisés comme biostimulants concernent les accroissements de la masse aérienne et racinaire, les élongations racinaires, et les levées accélérées des plantules. Ces augmentations s'expliquent généralement par de meilleurs prélèvements et assimilation des éléments nutritifs par la plante et la production des phytohormones [248]. Toutes les souches se sont révélées positives pour la solubilisation du phosphore et par conséquent, pour la croissance des plantes testées. L'expérience indique que ces souches peuvent être suggérées pour une utilisation potentielle comme des engrais biologiques

(biofertilisants) pour la production des plants de concombre, de tomate par l'absorption et l'assimilation accrue de nutriments (N, P et K) et d'autre part, elles peuvent être utilisées pour surmonter les problèmes de stress environnemental surtout pour le blé. La production de l'AIA a permis également une prolifération du système racinaire de la plante qui entraîne par la suite un développement important de la biomasse aérienne.

Les résultats expérimentaux sur la germination et la levée des semences des trois espèces (blé concombre et tomate), obtenus en conditions *in planta* montrent que la bactérisation des graines par les six souches de *Bacillus* spp. et les deux souches de *Pseudomonas* spp. confère une augmentation significative de la levée et des paramètres morphologiques (hauteur de la tige, longueur des racines, biomasse fraîche et sèche aérienne et racinaire).

Au terme de cette étude, les applications des souches testées de *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp. dans les deux essais *in vitro* et *in planta* ont mis en évidence des potentialités de stimulation de la croissance végétale.

Comme conclusions pertinentes à ce travail, nous signalons deux principaux faits: (1) Toutes les souches bactériennes ont permis une promotion de la croissance végétale par utilisation de ces souches aussi bien *in vitro* que par bactérisation directe de la semence. (2) Cette promotion de croissance s'est traduite par la production *in vitro* de métabolites secondaires et par un gain important *in planta* de tous les paramètres de croissance étudiés qui diffère d'une souche à une autre. Cependant, la souche *Pseudomonas* spp. PS1, s'est montrée comme une excellente phytostimulatrice de la croissance des trois espèces étudiées en particulier sur le concombre. Des gains appréciables ont été enregistrés pour l'ensemble des paramètres étudiés. En effet, la souche de *Pseudomonas* sp. PS1 a enregistré un indice de vigueur dépassant les 206% pour le concombre, les 123% pour la tomate et 65% pour le blé. La croissance de la tige dépasse 161% pour le concombre, 60% pour la tomate et les 44% pour le blé. De même, en poids frais et sec aérien les valeurs respectives sont de 188 et 111% pour le concombre, de (36-43%) pour la tomate et de (30-33%) pour le blé. Egalement, en croissance racinaire les valeurs de gains dépassent les 113% pour le concombre, les 64% pour la tomate et 53% pour le blé. En poids frais et sec

racinaire les gains respectifs sont de (214-167%) pour le concombre, (93-94%) pour la tomate et (45-64%) pour le blé.

La phytostimulation exercée par les huit souches sur les plantes appartenant aux trois espèces étudiées, s'est exprimée à travers un raccourcissement dans le temps de l'émergence des plantules avec des gains importants enregistrés par la souche *Pseudomonas* spp. PS1 dépassant les 36% pour le concombre et la tomate et les 15% pour le blé.

Les résultats obtenus par la présente étude se sont avérés très intéressants et originaux du fait de l'utilisation des bactéries endophytes isolées de plantes spontanées et qui se caractérisent par plusieurs avantages pour la promotion de la croissance des plantes cultivées.

Ces résultats mettent en évidence l'existence de microorganismes comme les *Pseudomonas* spp. et les *Bacillus* spp. ayant des effets positifs directs et indirects sur la croissance de la plante. L'usage des microorganismes comme des inoculants biofertilisants est une approche effective pour substituer les produits chimiques tels que les engrais, les hormones de croissances et les pesticides, et qui pourraient servir de fertilisants dans le cadre de l'agriculture biologique.

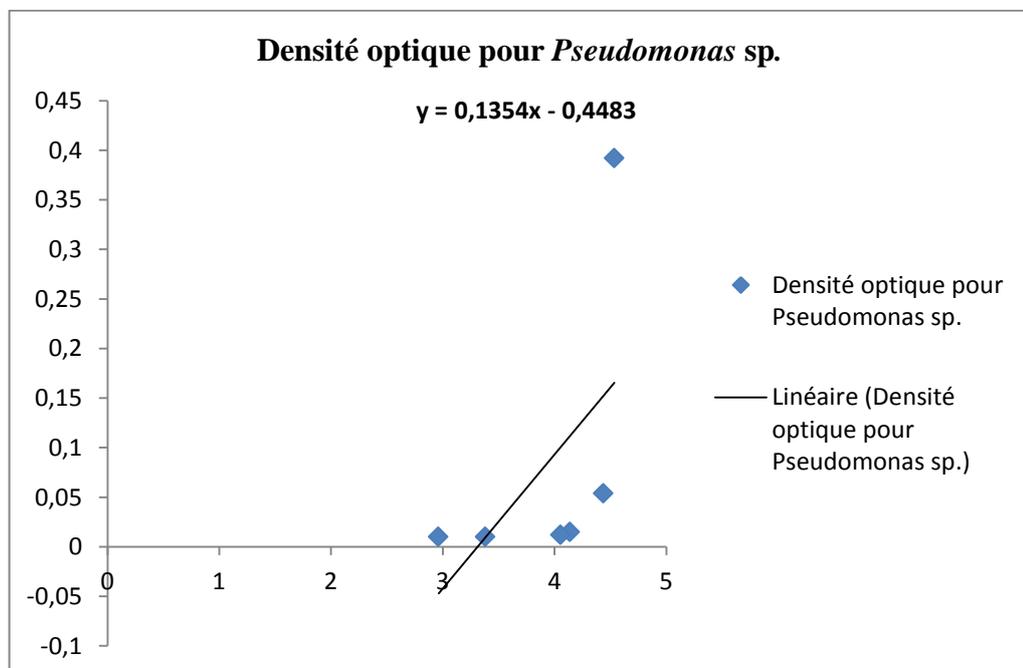
L'étude des mécanismes d'action de ces endophytes bactériens étudiés, associés à l'expression des effets bénéfiques doit être approfondie et reconduite dans des conditions expérimentales plus élaborées. Il serait intéressant d'étudier l'impact de certains facteurs biotiques et abiotiques dans la stimulation de la croissance induite par ces bactéries endophytes. Comme il serait souhaitable également d'identifier et de quantifier les métabolites secondaires secrétés par ces souches bactériennes, comme les acides organiques, les produits volatiles, les sidérophores, les enzymes, l'ACC deaminase, les Cytokinines et les gibbérellines par l'emploi d'autres analyses biochimiques (HPLC et la CPG) ainsi que moléculaires. Il serait souhaitable parallèlement d'étudier in vitro et in planta la tolérance à la salinité de ces souches endophyte qui pourrait contrer le stress abiotique et l'environnement hostile de la plupart des sols agricoles des régions arides et semi arides.

## APPENDICE A

### CALCUL DE LA DENSITE OPTIQUE DES *PSEUDOMONAS* SP. ET DES *BACILLUS* SP. CORRESPONDANT à $10^8$ cfu/ml

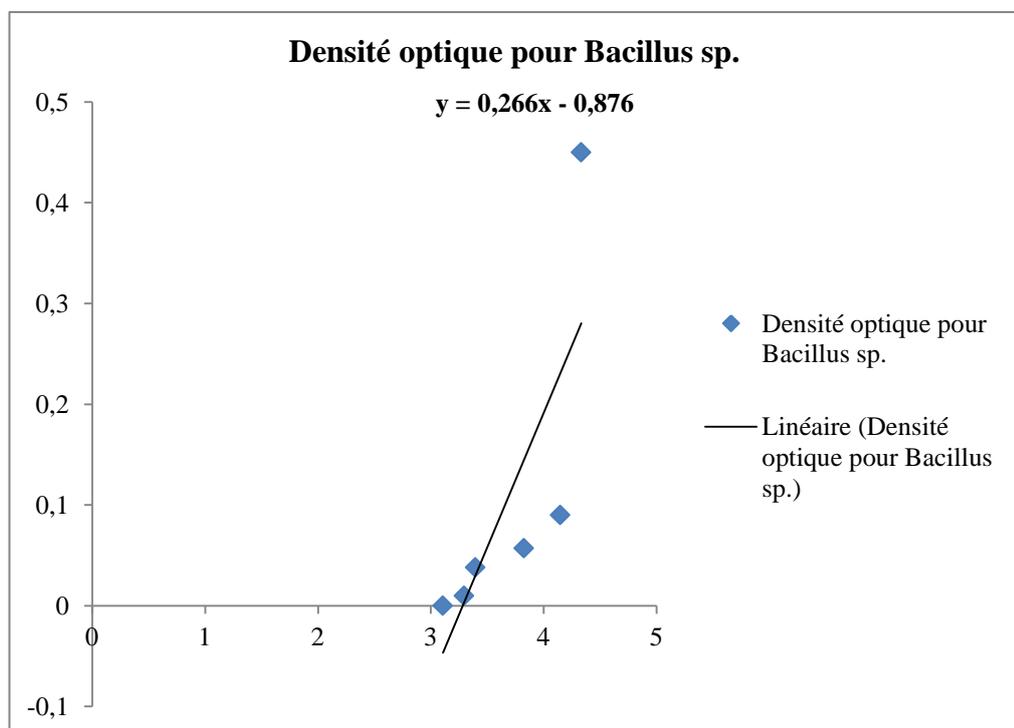
Annexe 1: Densité optique pour *Pseudomonas* spp. PS1.

Souche/répétition	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Boite 1	3156	2720	1512	1148	428	43
Boite 2	3712	2760	1244	1132	53	141
Moyenne	3434	2740	1378	1140	240,5	92
Moyenne*10	34340	27400	13780	11400	2405	920
Log 10	4,535	4,437	4,139	4,056	3,381	2,963
Densité optique	0,392	0,054	0,015	0,012	0,01	0,01



Annexe 2: Densité optique pour *Bacillus* spp. PF3

Souche/répétition	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Boite 1	2112	1264	708	323	214	105
Boite 2	2196	1560	636	175	183	151
Moyenne	2154	1412	672	249	198,5	128
Moyenne*10	21540	14120	6720	2490	1985	1280
Log 10	4,333	4,149	3,827	3,396	3,297	3,107
Densité optique	0,45	0,09	0,057	0,038	0,01	0

**APPENDICE B****COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE UTILISES (POUR UN LITRE DE MILIEU)**

Annexe1: Composition du milieu LPGA (Levure peptone glucose agar)

DESIGNATION	QUANTITE
Bactopeptone	5 g
Extrait de Levure	5 g
Glucose	10 g
Agar	15 g

Le pH est ajusté à 7,2.

Annexe 2: Milieu LBT de Luria bertani enrichi du tryptophane (Bric et al., 1991)

DESIGNATION	QUANTITE
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de sodium	5 g
L-tryptophane	1,02 g
gélose	20 g

Le pH final est ajusté à 7.5.

Annexe 3: Tampon peptone phosphate

DESIGNATION	QUANTITE
Peptone	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,21g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,34 g

Le pH est ajusté à 7,2.

Annexe 4: Milieu PVK (Pikovskaya, 1948)

DESIGNATION	QUANTITE
Sulfate dinitrique	0,5 g
Extrait de levure	0,5 g
Phosphate bicalcique	5g
Chlorure de potassium	0,2g
Sulfate de magnésium (7H <sub>2</sub> O)	0,1g
Glucose	10g
Agar	17g
Sulfate de manganèse	Trace
Bleu de bromophénol	4 ml

Le pH final est ajusté à 6

Annexe 5: Milieu NBRIP

DESIGNATION	QUANTITE
Phosphate bicalcique	5g
Bichlorure de magnésium exahydraté	5g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,25g
Chlorure de potassium	0,2g
Sulfate d'ammonium	0,1g
Glucose	10g

Le pH final est ajusté à 7,2

## Annexe 6: Milieu nutritif gélosé

DESIGNATION	QUANTITE
Extrait de bœuf	3g
Extrait de levure	1g
Peptone	5g
Agar	15g

Le pH final est ajusté à 7,2

## Annexe 7: Réactif de Barton : Solution de métavanadate (Nautiyal et Mehta, 2001)

DESIGNATION	QUANTITE
molybdate d'ammonium	20 g
vanadate d'ammonium	20 g

Solution A: Dissoudre 20 g de molybdate d'ammonium dans 200 ml d'eau chaude et refroidir. Solution B: Dissoudre 20 g de vanadate d'ammonium dans 125 ml d'eau chaude et ajouter 125 ml d'acide perchlorique et refroidir. Verser la solution A dans B en agitant et diluer à un litre.

## Annexe 8: Réactif de Nessler

DESIGNATION	QUANTITE
Chlorure mercurique	10 g
Iodure de potassium	7 g
Hydroxyde de sodium	16g
Eau (exemple l'ammoniac)	Jusqu'à 100ml

Dissoudre 10g  $\text{HgCl}_2$  et 7g de KI dans une petite quantité d' $\text{H}_2\text{O}$ , puis on agitant, ajouter ce mélange longuement à une solution d'eau froide de 16g NaOH dissous dans 50 ml d'eau. Ajusté à 100 ml d'eau. Conserver dans la verrerie borosilicatée fermée par un bouchon en caoutchouc à l'abri de la lumière et du soleil pendant une durée maximal d'un an.

## APPENDICE C

### RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES DE LA PROMOTION DE LA CROISSANCE *IN VITRO*

Annexe 1: Modèle ANOVA appliqué aux effets des huit souches bactériennes sur la solubilisation du phosphore bicalcique

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	1657,485	1	1657,485	132,3534	0,000000
Souches bactériennes	789,775	8	98,722	7,8831	0,000148
Erreur	225,417	18	12,523		

Annexe 2: Modèle ANOVA appliqué aux effets des huit souches bactériennes sur la production d'AIA

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	4197,627	1	4197,627	42,16166	0,000004
Souche	3191,317	8	398,915	4,00677	0,006895
Erreur	1792,085	18	99,560		

## APPENDICE D

### RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES DE LA PROMOTION DE LA CROISSANCE *IN PLANTA*

Annexe 1: Modèle ANOVA appliqué aux effets des huit souches bactériennes sur l'ACC deaminase du blé

	Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
blé	ord. origine	174,5998	1	174,5998	3610,197	0,000000
	Souches	15,5748	8	1,9469	40,255	0,000000
	Erreur	0,8705	18	0,0484		
Tomate	ord. origine	12,22774	1	12,22774	60,12655	0,000000
	Souches	12,38136	8	1,54767	7,61025	0,000186
	Erreur	3,66060	18	0,20337		

Annexe 2: Modèle ANOVA appliqué aux effets des huit souches bactériennes sur le taux de germination du blé, du concombre et de la tomate.

	Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
blé	ord. origine	220503,7	1	220503,7	2126,286	0,000000
	Souches	829,6	8	103,7	1,000	0,468950
	Erreur	1866,7	18	103,7		
concombre	ord. origine	189170,4	1	189170,4	1418,778	0,000000
	Souches	2429,6	8	303,7	2,278	0,070078
	Erreur	2400,0	18	133,3		
Tomate	ord. origine	206281,5	1	206281,5	2320,667	0,000000
	Souches	2518,5	8	314,8	3,542	0,012308
	Erreur	1600,0	18	88,9		

Annexe 3: Modèle ANOVA appliqué aux effets des huit souches bactériennes sur la longueur moyenne finale de la tige du blé, du concombre et de la tomate

	Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
blé	ord. origine	138,9921	1	138,9921	2752,723	0,000000
	Souches	1,9296	8	0,2412	4,777	0,002822
	Erreur	0,9089	18	0,0505		
concombre	ord. origine	64,71259	1	64,71259	655,4772	0,000000
	Souches	5,45994	8	0,68249	6,9130	0,000338
	Erreur	1,77707	18	0,09873		
Tomate	ord. origine	194,1393	1	194,1393	7416,186	0,000000
	Souches	3,0599	8	0,3825	14,611	0,000002
	Erreur	0,4712	18	0,0262		

Annexe 4: Modèle ANOVA appliqué aux effets des huit souches bactériennes sur le poids frais moyen de la partie aérienne du blé, du concombre et de la tomate

	Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
blé	ord. origine	580800,0	1	580800,0	2989,819	0,000000
	Souches	3965,3	8	495,7	2,552	0,047118
	Erreur	3496,7	18	194,3		
concombr	ord. origine	497218,4	1	497218,4	955,7807	0,000000
	Souches	49655,6	8	6207,0	11,9314	0,000009
	Erreur	9364,0	18	520,2		
tomate	ord. origine	23580,60	1	23580,60	8283,455	0,000000
	Souches	190,61	8	23,83	8,370	0,000100
	Erreur	51,24	18	2,85		

Annexe 5: Modèle ANOVA appliqué aux effets des huit souches bactériennes sur le poids sec moyen de la partie aérienne du blé, du concombre et de la tomate

	Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
blé	ord. origine	5090,672	1	5090,672	1903,271	0,000000
	Souches	60,851	8	7,606	2,844	0,031213
	Erreur	48,145	18	2,675		
concombre	ord. origine	3141,077	1	3141,077	1451,733	0,000000
	Souches	204,754	8	25,594	11,829	0,000009
	Erreur	38,946	18	2,164		
tomate	ord. origine	177,6647	1	177,6647	9244,455	0,000000
	Souches	1,3305	8	0,1663	8,654	0,000081
	Erreur	0,3459	18	0,0192		

Annexe 6: Modèle ANOVA appliqué aux effets des huit souches bactériennes sur la longueur moyenne des racines du blé, du concombre et de la tomate

	Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
blé	ord. origine	5497,803	1	5497,803	4000,288	0,000000
	Souches	142,612	8	17,826	12,971	0,000005
	Erreur	24,738	18	1,374		
concombre	ord. origine	638,7016	1	638,7016	7696,573	0,000000
	Souches	44,0117	8	5,5015	66,295	0,000000
	Erreur	1,4937	18	0,0830		
tomate	ord. origine	1763,703	1	1763,703	9174,624	0,000000
	Souches	29,104	8	3,638	18,925	0,000000
	Erreur	3,460	18	0,192		

Annexe 7: Modèle ANOVA appliqué aux effets des huit souches bactériennes sur le poids frais moyen de la partie racinaire du blé, du concombre et de la tomate

	Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
blé	ord. origine	662386,7	1	662386,7	2866,556	0,000000
	Souches	12123,0	8	1515,4	6,558	0,000467
	Erreur	4159,3	18	231,1		
concombre	ord. origine	367033,5	1	367033,5	2272,914	0,000000
	Souches	29771,9	8	3721,5	23,046	0,000000
	Erreur	2906,7	18	161,5		
tomate	ord. origine	3615,509	1	3615,509	9174,005	0,000000
	Souches	136,605	8	17,076	43,328	0,000000
	Erreur	7,094	18	0,394		

Annexe 8: Modèle ANOVA appliqué aux effets des huit souches bactériennes sur le poids sec moyen de la partie racinaire du blé, du concombre et de la tomate

	Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
blé	ord. origine	2247,168	1	2247,168	4009,936	0,000000
	Souches	40,686	8	5,086	9,075	0,000059
	Erreur	10,087	18	0,560		
concombre	ord. origine	144,4908	1	144,4908	1199,057	0,000000
	Souches	12,4701	8	1,5588	12,935	0,000005
	Erreur	2,1691	18	0,1205		
tomate	ord. origine	8,990237	1	8,990237	9300,245	0,000000
	Souches	0,338763	8	0,042345	43,806	0,000000
	Erreur	0,017400	18	0,000967		

Annexe 9: Modèle ANOVA appliqué aux effets des huit souches bactériennes sur l'indice de vigueur du blé, du concombre et de la tomate

	Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
blé	ord. origine	1261714	1	1261714	1206,964	0,000000
	Souches	35031	8	4379	4,189	0,006273
	Erreur	17771	17	1045		
concombre	ord. origine	8174321	1	8174321	813,7594	0,000000
	Souches	1000401	8	125050	12,4488	0,000007
	Erreur	180812	18	10045		
tomate	ord. origine	24328755	1	24328755	2273,901	0,000000
	Souches	1107934	8	138492	12,944	0,000005
	Erreur	192584	18	10699		

**APPENDICE E**

CFU:	Unité de Colonie Formée
BPB:	Bleu de Bromo-Phenol
Log:	Fonction Logarithmique
°C:	Degré Celsius
KSB:	Bactérie Solubilisant de Potassium
PSB:	Bactérie Solubilisant de Phosphore
ug:	Microgramme
D.O:	Densité Optique
T-RFLP:	Fragment Terminal de Restriction de Polymorphisme de Longueur
ARNr:	Acide Ribonucléique ribosomique
ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
PCR:	Réaction en Chaîne par Polymérase
PGP:	Promotion de la croissance des plantes (Plant Growth Promotion)
PGPR:	Bactéries de la rhizosphère bénéfiques à la croissance et à la santé des plantes
GA3:	Acide gibberillique
UV:	Ultraviolet
FAOs:	Formes Actives d'Oxygène
ATP:	Adénosyl Triphosphate
ISR:	Résistance Systémique Induite
pH:	Potentiel Hydrogène
AFP :	AutoFluorescentProtein
GRP3:	Guanyl- Proteine 3 libérée
LPGA:	Milieu de culture extrait de Levure, Peptone, Glucose, Agar.

- NBRIP: Milieu de croissance de Phosphate de l'Institute Botanique National de  
Recherche
- SAR: Résistance Systémique Acquise
- kDa: Kilodalton
- DAPG: 2,4-Diacetyl PhloroGlucinol
- Fe4S4: Clusters fer-soufre
- FeMo-co: Femo-nitrogenase
- Cat 2St: Gene de l'expression de la catalase classe II

## REFERENCES

1. **Ping, L. and Boland, W., 2004.** Signals from underground: Bacterial Volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Trends Plant Sci 9: 261-263.
2. **Murali, M., Amruthesh, K.N., Sudisha, J., Niranjana, S.R. and Shetty, H.S., 2012.** Screening for plant growth promoting fungi and their ability for growth promotion and induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. *J. Phyto. 5*: 30-36.
3. **Wu, S.C., Cao, H.Z., Li, G.Z., Cheung, C.K. and Wong, H.M., 2005.** Effect of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma. 125*: 155-156.
4. **Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J. and Bakker, A.H.M., 2012.** The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in plant Science. 8: 478-486.
5. **Jacobson, C.B., Pasternak, J.J., Glick, B.R., 1994.** Partial purification and characterization of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. *Can J Microbiol 40*: 1019-1025.
6. **Frommel, M.I., Nowak, J., Lazarovits, G., 1991.** Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* sp. *tuberosum*) as affected by a non fluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol 96*: 928-936.
7. **Glick, B.R., 1995.** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol. 41*: 109-117.
8. **Bangera, M.G. and Thomashow, L.S., 1996.** Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol Plant Microbe Interact 9*: 83-90.

9. **O'Sullivan, D.J.O and Gara, F., 1992.** Traits of fluorescent *Pseudomonas* sp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbial Rev* 56: 662–676.
10. **Madhaiya, M., Poonguzhali, S., Senthilkumar, M., Seshadri, S., Chung, H., Yang J., Sundaram, S. and Tongmin, S.A., 2004.** Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 315-324.
11. **Cakmakci, R.I., Aydın, D.F. and Sahin, A.F., 2006.** Plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol. Biochem.*,vol.38: 1482–1487.
12. **Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F., 2006.** Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci. Hortic.* 111(1): 38-43.
13. **Nowak, J., Asiedu, SK., Lazarovits, G., 1995.** Enhancement of in vitro growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plantlets co-cultured with a plant growth promoting *Pseudomonad bacterium*. In: Carre F, Chagvardieff P (eds) *Proc. International Symposium on Ecophysiology and Photosynthetic in Vitro Cultures*, Aix-en-Provence, France CEA, Cadarache, France, pp173–180.
14. **Redman, R.S., Sheehan, K.B., Stout, R.G., 2002.** Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 298: 15-81.
15. **Creus, C.M., Sueldo, R.J., Barassi, C., 1998.** Water relations in *Azospirillum* inoculated wheat seedlings under osmotic stress. *Can J Bot* 76: 238–244.
16. **Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y., 2003.** Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22: 107–149.
17. **Whipps, J.M., 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487–511.
18. **Xiao, H., 2007.** Comparative analysis of the complete genome sequence of The plant growth–promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. New York, USA.
19. **Salisbury, F.B., 1994.** The role of plant hormones. Marcel Dekker, (ed.). New York, USA.
20. **Barazani, O. and Friedman, J., 1999.** Is IAA the major root growth Factor secreted from plantgrowth-mediating bacteria. *J. Chem. Ecol.*, 25: 2397-2406.

21. **Cargeeg, P., 2007.** Bultin technique/Soja. Biostacked Inoculants Combiner pour produire. Amérique du Nord.
22. **Krimi, Z., Raia, A., Djellou,t A., Alim, D., Haddad, N., Khodja, R et Smain, K., 2012.** Bacterial endophytes from spontaneous plants with biological activities. COST FA Meeting Trento. Italy.
23. **Khodja, R. et Smain, K., 2010.** Pouvoir antagoniste d'isolats bacteriens endophytes de diverses plantes adventices à l'égard d'une gamme de bacteries phytopathogènes. pp 36.
24. **Schulz, B. and Boyle, C., 2006.** What are Endophytes? in Soil Biology, V 9 Microbial Root Endophytes. B. Schulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 1-13.
25. **Debary, A.H., 1866.** Morphologie und physiologie der pilze Flechten und Myxomyceten. In: Hofmeister's Handbook of Physiological Botany. Vol II, Leipzig, Germany, pp. 1-316.
26. **Wilson, D., 1995.** Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73: 274-276.
27. **Bacon, C.W. and White, J. F., 2000.** Microbial endophytes. Marcel Dekker Inc. New York, 101:106 p.
28. **Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W., 1997.** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914.
29. **Germaine, k., Kech, E., Borreemans, B., 2004.** Colonization of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes *FEMS Microbiol Ecol* 48: 109- 118.
30. **Paulitz, T.C. and Belanger, R.R., 2001.** Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol* 39: 103-133.
31. **Thakore, Y., 2006.** The biopesticide marked for global agricultural use. *Industrial. Biotechnology.* (3): 194-208.
32. **Kobayashi, D.Y. and Palumbo, J.D., 2000.** Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In C. W. Bacon, and J.F.White, Jr (eds), *Microbial endophytes.* Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y: 199- 233.
33. **James, E.K., Olivares, F.L., Oliveira, A.L.M., Reis, F.B., Silva, L.G., Reis, V.M., 2001.** Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J. Exp. Botany* 52: 747-760.

- 34. Suzuki, T., Shimizu, M., Meguro, A., Hasegawa, S., Nishimura T., Kunoh, H., 2005.** Visualization of infection of an endophytic Actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured *Rhododendron*. *Actinomycetologica* 19: 7-12.
- 35. Zachow, C., Fatehi, J., Cardinale, M., Tilcher, R. and Berg, G., 2010.** Strain-specific colonization pattern of *Rhizoctonia* antagonists in the root system of sugar beet. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74: 124-35.
- 36. Lindow, S.E., Brandl, M.T., 2003.** Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1875-1883.
- 37. Buck, J.W., Walcott, R.R., Beuchat, L.R., 2003.** Recent Trends in Microbiological Safety of Fruits and Vegetables. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP- 2003-0121-01-RV.
- 38. Fürnkranz, M., Lukesch, B., Müller, H., Huss, H., Grube, M., Berg, G., 2011.** Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. *Microb. Ecol.* DOI: 10.1007/s00248-011-9942.
- 39. Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J.G., Gangl, H., Sessitsch, A., 2011.** Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb. Ecol.* 62: 188-197.
- 40. Agarwal, V.K and Sinclair, J.B., 1996.** Principles of seed pathology. Lewis Publication, Boca Raton, Florida.
- 41. Coombs, J.T. and Franco, C.M.M., 2003.** Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4260-4262.
- 42. Pierson, L.S. and Pierson, E.A., 2000.** Microbial gossiping: signalling in the rhizosphere. *Proceedings of 5<sup>th</sup> PGPR Workshop.*
- 43. Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993.** "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analyses of polymerase chain reaction-amplified genes for 16S rRNA." *Applied & Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- 44. Shenoy, V.V., Kalagudi, G.M. and Gurudatta, B.V., 2001.** Towards nitrogen autotrophic rice. *Curr. Sci.* 81: 451-457.
- 45. Phillips, D.A., 2000.** Biosynthesis and release of rhizobial nodulation gene inducers by legumes. In: Triplett E. P. ed. *Prokaryotic Press*, 349-364.

46. **Felix, D.D., 2003.** Defining new roles for plant and rhizobia nodules in sole and mixed plant culture involving symbiotic legumes. *New Phytologist*. 158: 39-49.
47. **Tilak, K.V.B.R., Ranganayaki, N., Pal, K.K., Saxena, A.K., Nautiyal, C.S., Mittal, S., Tripathi, A.K and Johri, B.N., 2005.** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89: 136-150.
48. **Gyaneshwar, P., James, E.K., Mathan, N., Reddy, P.M., Reinhold-Hurek, B and Laqha, J.K., 2001.** Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia macescens*. *J. Bacteriol.* 183:2634-2645.
49. **Huang, B., Zhuang, P., Zhang, H., Fan, L., 2011.** Endophytic colonisation of *Citrus subtilis* in the roots of *Robinia pseudoacacia* L. *Plant Biol.* 13: 925-931.
50. **Timmusk, S., Grantcharova, N., Wagner, E.G.H., 2005.** *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7292-7300.
51. **Gasser, I., Cardinale, M., Müller, H., Heller, S., Eberl, L., Lindenkamp, N., Kaddor, C., Steinbüchel, A., Berg, G., 2011.** Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. *Plant and Soil* 347: 125-136.
52. **Malfanova, N., Kamilova, F., Validov, S., Chebotar, V and Lugtenberg, B., 2013.** Is L-arabinose important for the endophytic lifestyle of *Pseudomonas* spp. *Arch Microbiol.* 195: 9-17.
53. **Shishido, M., Breuil, C and Chanway, C.P., 1999.** Endophytic colonization of spruce by plant growth promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 191-196.
54. **Krause, A., Bischoff, B., Miché, L., Battistoni, F., Reinhold-Hurek, B., 2011.** Exploring the function of alcohol dehydrogenases during the endophytic life of *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 1325-1332.
55. **Bérubé, J., 2007.** l'éclaircie du service canadien des forêts. Centre de foresterie des Laurentides. Numéro 34. ISBN 978-0-662-69844-9. ISSN 1705-5784.
56. **Huss-Danell, K., 1997.** Actinorhizal symbioses and their N<sub>2</sub> fixation. *New Phytol* 136: 375-405.

- 57. Benson, D.R., Clawson, M.L., 2000.** Evolution of the actinorhizal plant symbioses. In: Triplett EW (ed) Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of biological process. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 207-224.
- 58. Pokojaska-Burdziej, A., 1982.** The effect of microorganisms, microbial metabolites and plant growth regulators (IAA and GA3) on the growth of pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.). Pol. J. Soil Sci. 15: 137-143.
- 59. Parker, A.K and Dangerfield, J.A., 1975.** Influence of bacterial inoculations on growth of containerized Douglas-fir seedlings. Can. For. Serv. Bimonth. Res. Notes 31: 14-15.
- 60. Leyval, C. and Berthelin, J., 1993.** Rhizodeposition and net release of soluble organic compounds by pine and beech seedlings inoculated with rhizobacteria and ectomycorrhizal fungi. Biology & Fertility of Soils 15: 259-267.
- 61. Chanway, C.P., 1995.** Differential response of western hemlock from low and high elevations to inoculation with plant growth promoting *Bacillus polymyxa*. Soil Biol. Biochem. 27, 767-775.
- 62. Holl, F.B., Chanway, C.P., Turkingon, R., Radley, R., 1988.** Growth response of crested Wheat grass (*Agropyron cristatum* L.), white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. Soil Biol. Biochem. 20: 19-24.
- 63. O'Neill, G.A., Radley, R.A., Chanway, C.P., 1992.** Variable effects of emergence-promoting rhizobacteria on conifer seedling growth under nursery conditions. Biol. Fertil. Soils 13: 45-49.
- 64. Beall, F and Tipping, B., 1989.** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in forestry. For. Res. Market Proc., Ont. For. Res. Com., Toronto (abstract 117).
- 65. Benson, D.R and Silvester, W.B., 1999.** Biology of frankia strains, actinomycete symbionts of actnorhizal plants. Microbiological Reviews. 57(2) : 293-319.
- 66. Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A and Squartini, A., 2004.** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. Syst. Appl. Microbiol. 27:462-468.
- 67. Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel Gillis, M., Dreyfus, B and de Lajudie P., 2004.** Characterisation of wild legumes

nodulating bacteria(LNB). In the infrared zone of Tunisia. Syst. Appl. Microbiol. 27: 143-153.

- 68. Sevilla, M., Gunapala, N., Burris, R.H., Kennedy, C., 2001.** Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif*<sup>-</sup> mutant strains. MPMI 14: 358-366.
- 69. Miche, L., Battistoni, F., Gemmer, S., Belghazi, M. and Reinhold-Hurek, B., 2006.** Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. Mol Plant Microbe Interact 19, 502-511.
- 70. Hurek, T., Handley, L.L., Reinhold-Hurek, B., and Piche, Y., 2002.** *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. Mol Plant Microbe Interact 15, 233-242.
- 71. Iniguez, A.L., Dong, Y. and Triplett, E.W., 2004.** Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. Mol Plant Microbe Interact 17, 1078-1085.
- 72. Garbeva, P., Overbeek, L.S., Vuurde, J.W., Elsas, J.D., 2001.** Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments, Microbil. Ecol. 41: 369p.
- 73. Grimault, V. and Prior, P., 1994.** Invasiveness of *Pseudomonas solanacearum* in tomato, eggplant and pepper: a comparative study. Eur. J. Plant Pathol. 100: 259-267.
- 74. Pillay, V.K. and Nowak, J., 1997.** Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. Can. J. Microbiol. 43:354-361.
- 75. Gutierrez-Manero, F.J., Ramos Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, FR., Talon, M., 2001.** The plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. Physiol.Plantarum 111: 206-211.
- 76. Kobayashi, D.Y. and Palumbo, J.D., 2000.** Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In C. W. Bacon, and J.F.White, Jr (eds), Microbial endophytes. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y: 199-233.

- 77. Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., Dowling, D.N., 2008.** Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiology Letters, 278: 1-9.
- 78. Verma, S.C., Ladha, J.K. and Tripathi, A.K., 2001.** Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. J. Biotechnol. 91: 127-141.
- 79. Lee, S., Flores-Tankarnacion, M., Contreras-Zentella, M., Garcia-Flores, L., Escamella, J.E. and Kennedy, C., 2004.** Indole-3-Acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis genes. J Bacteriol 186: 5384-5391.
- 80. Pirtila, A., Joensuu, P., Pospiech, H., Jalonen, J., Hohtola, A., 2004.** Bud Endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. Physiol Plant 21: 305-312.
- 81. Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C and Barka, E. A., 2005.** Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1685-1693.
- 82. Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Pare, P.W. and Kloepper, J. W., 2003.** Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:4927-4932.
- 83. Lindsay, W.L., 1979.** Chemical Equilibria in Soils. John Wiley and Sons, NY.
- 84. Goldstein, A.H., 1986.** Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. Am. J. Altern. Agricult. 1, 57–65.
- 85. Igual, J.M., Valverde, A., Cerevantes, E. and Válezquez, E., 2001.** Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. Agronomie, 21, 561-568.
- 86. Hedley, M.J., Hussin, A. and Bolan, N.S., 1990.** New approaches to phosphorus fertilisation. Phosphorus requirements for sustainable agriculture in Asia and Oceania. Proceed. Symp. 6-10 March 1989: pp. 125-142.
- 87. Pelmont, J., 1993.** Bactéries et environnement. Presse Universitaire de Grenoble, 899p.
- 88. Lazarovits, G. and Nowak, J., 1997.** Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. Hort. Sci. 32: 188-192.

89. **Hartmann, A. and Zimmer, W., 1994.** Physiology of Azospirillum. In: Okon Y. (Eds), Azospirillum/plant associations. Boca Raton: CRC, p. 15-39.
90. **Chi, F., Schi, S.H., Cheng, H.P., Jing, Y.X., Yanni, Y.G. and Dazzo, F.B., 2005.** Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7271-7278.
91. **Lupway, N., Clayton, G., Hanson, K., Rice, W. and Bierderbec, k., 2004.** Endophytic bacteria in barley, wheat and canola roots. *Can. J. Plant Sci.* 84: 37-45.
92. **Rodelas, B., Salmerdn, V., Martinez-Toledo, M.V. and Gonzfilez-López, J., 1993.** Production of. Vitamins by Azospirillum brasilense in chemically-defined media. *Plant Soil*, 153, 97-101.
93. **Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O. 2007.**Phytohormone production by three strains of Bradyrhizobium japonicum possible physiological and technological implicatio. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: pp 874-880.
94. **Woodward, A.W. and Bartel, B., 2005.** Auxin: regulation, action, and regulation. *Annals of Botany*, 95, 707-735.
95. **Papanov I., Papanov, M., Teeale, W., Menges, M., Chkrabortee, S., Muray, J. et Palme, K., 2008.** Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 1, 321-337.
96. **Kazan, K. and Manners, J.M., 2009.**Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 14, 373-382.
97. **Achard, P., Renou, J P., Berthome, R., Harberd, N. P. and Genschik, P., 2008.** Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology*, 18, 656-660.
98. **Muller, B. and Sheen, J., 2007.** Advances in cytokinin signalling. *Science*, 318, 68-69.
99. **Glick, B.R., 2005.** Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, 251, 1-7.
100. **Glick, B.R., 2007.** Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26, 227-242.
101. **Glick, B.R., Laskin, A.I., Bennett, J.W., Gadd, G.M., 2004.** Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. In *Advances in Applied Microbiology*, Vol Volume 56. Academic Press, pp 291-312.

102. **Sun, Y., Cheng, Z. and Glick, B. R., 2009.**The FEMS Microbiology Letters, 296, 131-136.
103. **Newton, W. E., 1998.** Nitrogénases : fonction et évolution. Bulletin de la Société Française de Microbiologie, 13, 238-241.
104. **Spaink, H. P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J., 1998.**The Rhizobiaceae : molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer Academic Publishers. 566 p.
105. **Askeland, R. A. and Morrison, S. M., 1983.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1802-1807.
106. **Knowles, C.J. and Bunch, A.W., 1986.** Microbial cyanide metabolism. Adv. Microb. Physiol. 27, 73-111.
107. **Clawson, B.J. and Young, C.C., 1913.** Preliminary report on the production of hydrocyanic acid by bacteria. J. Biol. Chem. 15, 419-422.
108. **Faramarzi, M.A. and Brandi, H., 2006.** Formation of water-soluble metal cyanide complexes from solid minerals by *Pseudomonas plecoglossicida*. FEMS Microbiol. Lett. 259, 47-52.
109. **Seigler, D.S., 1991.** Cyanide and cyanogenic glycosides. Page 35-77 in G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum (ed.). Herbivore: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites, Second edition, Volume 1: The Chemical Participants Academic Press, San Diego, California.
110. **Owen, A., Zdor, R., 2001.** Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemental glycine. Soil Microbiology and Biochemistry, 33 (Suppl 6): 801-809.
111. **Larpent, J .P. et Larpent-Gourgaud, M., 1997.** Mémento technique de microbiologie : Métabolites primaires. Chapitre 7; 1037p.
112. **Scandalios, J.G., Guan, L., Polidors, A.N., 1997.** Catalases in plants: gene structure, properties and expression. Scandalios J.G. (ed) Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences. Cold Spring Harbor NY Laboratory Press. 343- 406.

113. **Yang, T. and Poovaiah, B.W., 2002.** Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 4097- 4102.
114. **Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Camp, W., 1997.** Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress in C<sub>3</sub> plants. *EMBO J*, 16: 4806-4816.
115. **Ruzsa, SM., Mylona, P. and Scandalios, J.G., 1999.** Differential response of antioxidant genes in maize leaves exposed to ozone. *Redox Rep*, 4: 95-103.
116. **Auh, C.K. and Scandalios, J.G., 1997.** Spatial and temporal responses of the maize catalases to low temperature. *Physiol Plant*, 101:149-156.
117. **Mhadhbi, H., Jebara, M., Limam, F., Aouani, M.E., 2004.** Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea-rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiol Biochem*, 42: 717-722.
118. **Guan, L.M. and Scandalios, J.G., 2000.** Hydrogen-peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free Radical Biol Medicine*, 28: 1182-1190.
119. **Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidilitz, H.K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Breusegem, V., 2004.** Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 39:45-58.
120. **De Gara, L., De Pinto, MC., Tommasi, F., 2003.** The antioxidant system vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiol Biochem*, 41: 863-870.
121. **Vanacker, H., Foyer, C.H., Carver, T.L.W., 1998.** Changes in apoplastic antioxidants induced by powdery mildew attack in oat genotypes with race non-specific resistance. *Planta*. 208: 444-452.
122. **Magbanua, Z.V., De Moraes, C.M., Brooks, T.D., Paul Williams, W., Luthe, D.S., 2007.** Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus falvus*? *Mol Plant-Microbe Interact*, 20: 697-706.
123. **Niebel, A., Heungens, K., Barthels, N., Ind, D., Van Montagu, M., and Gheysen, G., 1995.** Characterization of a pathogen-induced potato catalase

and its systemic expression upon nematode and bacteria<sup>1</sup> infection. *MOI. Plant-Microbe Interact.* 8, 371-378.

124. **May, M.J., Parker, J.E., Daniels, M.J., Leaver, C.J., Christopher, S., 1996.** An *Arabidopsis* mutant depleted in glutathione shows unaltered responses to fungal and bacterial pathogens. *Mol Plant Microbe Interact*, 9: 349-356.
125. **Kloepper, J.W., Ryu, C.M., 2006.** Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance 9:33-55.
126. **Pavlo, A., Leonid, O., Iryna, Z., Natalia, K., Maria, P.A., 2011.** Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L). *Biological Control* 56:43-49.
127. **Neilands, J.B., 1995.** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Bio. Chem.* 270: 26723-26726.
128. **Ratledge, C. and Dover, L.G., 2000.** Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu.Rev. Microbiol.* 54: 881-941.
129. **Guerinot, M. L., 1994.** Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 743-772.
130. **Krewulak, K.D. and Vogel, H. J., 2008.** Structural biology of bacterial iron uptake *Biochim. Biophys. Acta* 1778:1781-1804.
131. **Narisawa, K., Tokumasu, S. and Hashiba, T., 1998.** Suppression of clubroot formation in chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. *Plant Pathology*, v.47, p.206-210.
132. **Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G., Arsenault, W.J. and Buchanan, N.A., 1999.** Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathol.* 48:360-369.
133. **Athukorala, S.N.P., Fernando W.G.D., Rashid K.Y., 2009.** Identification of antifungal antibiotic of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canada Jo ma Microbiology* 55: 1021-1032.
134. **Puentea, M., Ching, Y., Lib, I., Yoav Bashana, C., 2009.** Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus Seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 66 (2009) 402-408.

135. **Ongena, M., Jourdan, E., Adam, M., Paquot, A., Joris, B., Arpigny, J.L. and Thonart, P., 2007.** Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9: 1084-1090.
136. **Sessitsch, A., Reiter, B. and Berg, G., 2004.** Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Can. J. Microbiol.* 50:239-249.
137. **Doty, S.L., 2008.** Tansley review: enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytol* 179:318-333.
138. **Balachandar, D., Radja, P., Sundaram, S.P., 2008.** Genetic and metabolic diversity of pink-pigmented facultative Methyloproths in phyllosphere of tropical Plants. *Bra.J.Microbiol.* 39: 68-73.
139. **Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A., 2005.** The Rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol* 7:1673-1685.
140. **Blumer, C. and Haas, D., 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 173:170-177.
141. **Strobel, G.A., Dirksie, E., Sears, J. and Markworth, C., 2001.** Volatile antimicrobials from a novel endophytic fungus. *Microbiology* 147:2943-2950.
142. **Brooks, D.S., González, C.F., Appel, D.N. and Filer, T.H., 1994.** Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Biol. Control*4:373-381.
143. **Coombs, J.T., Michelsen, P.P. and Franco, C.M.M., 2004.** Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biol. Control* 29:359-366.
144. **Parmeela and Johri, B.N., 2004.** Phylogenetic analysis of bacterial endophytes showing antagonism against *Rhizoctonia solani*. *Current Science* 87:687-692.
145. **Sturz, A. and Kimpinski, J., 2004.** Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of rootlesion nematodes in the potato root zone. *Plant Soil* 262:241-249.
146. **West, C.P., Izekor, E., Oosterhuis, D.M., Robbins, R.T., 1988.** The effect of *Acremonium-Coenophialum* on the growth and nematode infestation in Tall Fescue. *Plant and Soil* 112: 3-6.

147. **Sciciliano, S.D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, R.R., Whyte, L.G., Banks, M.K., Schwab, P., Lee, K. and Greer, C.W., 2001.** Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2469-2475.
148. **Van Aken, B., Peres, C., Doty, S., Yoon, J. and Schnoor, J., 2004.** *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pinkpigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilising bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *Populus nigra* DN34). *Evol Microbiol* 54: 1191-1196.
149. **Newmann, L.A. and Reynolds, C.M., 2005.** Bacteria and phytoremediation: New uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology* 23: 6-8.
150. **Zahran, H.H., Räsänen, L.A., Karsisto, K. and Lindström, K., 1994.** Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *World J. Microbiol.* 10: 100-105.
151. **Rivas, R., Velázquez, E., Willems, A., Vizcaino, N., Subba-Rao, N.S., Mateos P.F., Gillis M., Dazzo F.B. and Martinez-Molina E., 2002.** A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root nodule symbiosis with the aquatic legume, *Neptunia natans* (L.F.) Druce. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(11): 5217-5222.
152. **Boncompagni, E., Ostrerás, M., Poggi, M. and Le Rudulier, D., 1999.** Occurrence of choline and glycine betaine uptake metabolism in rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2072-207.
153. **Thomas, P., Kumari, S., Swarna, G.K., Gowda, T.K.S., 2007.** Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host-endophyte interaction in vitro and in vivo. *Canadian Journal of Microbiology* 53:380-390.
154. **Turner, C., 1986.** Adaptation to water deficits - A changing perspective *Australian Journal of Plant Physiology*, 13:175- 190.
155. **Malinowski, D.P., Belesky, D.P., Fedders, J.M., 1999.** Endophyte infection may affect the competitive ability of tall fescue grown with red clover. *J. Agron. Crop Science* 183: 91-102.
156. **Malinowski, D.P., Belesky, D.P., 2000.** Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses:

Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* 40:923- 940.

157. **Bano, A. and Fatima, M., 2009.** Salt tolerance in *Zea mays* (L.) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Boil. Fert. Soils* 45, 405-413.
158. **Coventry, D.R. and Evans, J., 1989.** Symbiotic nitrogen fixation and soil activity. In *Soil Acidity and Plant Growth*, ed. A. D. Robson, pp. 103-107. Aca. Press, Sydney.
159. **Graham, P.H., 1964a.** The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.*35: 511-517.
160. **Jordan, D.C., 1984.** Genus I, *Rhizobium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. ed. Holt, J. G. & Kreig, N. R. pp. 235-242.
161. **Stephan, M.P., Oliveira, M., Teixeira, K.R.S., Martinez-Drets, G. and Döbereiner, J., 1991.** Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 67-72.
162. **Dobbelaere, S., Okon, Y., 2007.** The plant growth promoting effect and plant response. In: Elmerich C, Newton WE (eds) *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Springer, Dordrecht, pp 145-170.
163. **Clay, K., 1990.** Fungal Endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21:275-297.
164. **Clay, K., 1988.** Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69: 10-16.
165. **Suryanarayanan, T.S., Thirumalai, E., Prakash, C.P., Rajulu, M.B.G., Thirunavukkarasu N., 2009.** Fungi from two forests of southern India: a comparative study of endophytes, phellophytes, and leaf litter fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 55:419- 426.
166. **Roger, P. et Dreyfus, B., 1999.** Contribution des biotechnologies a la sécurité alimentaire : le cas des biofertilisants microbiens Laboratoire de Microbiologie IRD (LMI), Université de Provence, Marseille Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), Montpellier. 87-107.
167. **Palleroni, N.J., 2005.** Genus I *Pseudomonas*. Dans "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The proteobacteria*", 2ème édition, vol. 2, part. B,

Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. et Garrity, G.M. (Eds). Springer, New-York, Etats-Unis, p. 323-379.

168. **Migula, W., 1894.** Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe, 1: 235-238.
169. **Palleroni, N.J., 2009.** The genus *Pseudomonas*. Dans "Practical handbook of microbiology", 2ème édition, Goldman, E. et Green, L.H. (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group, Etats-Unis, p. 231-242.
170. **Nandaakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Raguchander, T., Samiyappan, R., 2001.** Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. Soil Biol. Biochem 33: 603-612.
171. **Palleroni, N.J. and Moore, E.R.B., 2004.** Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. Dans "Pseudomonas", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis, p. 3- 44.
172. **Lata, S.A.K. and Tilak, K.V.B.R., 2002.** Biofertilizers to augment soil fertility and crop production. In Soil Fertility and Crop Production Science Publishers,USA. Edited by Krishna KR, pp: 279–312.
173. **Dubuis, C., Keel, C. and Haas, D., 2007.** Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. Dans "New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research", Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M. et Cooke, B.M. (Eds). Springer, Pays-Bas, 311-328.
174. **Van Loon, L.C., 2007.** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology, 119: 243-254.
175. **Weller, D.M., Landa ,B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., de la Fuente, L., Blouin-Bankhead, S.B., Allende-Molar, R., Bonsall, R.F., Mavrodi, D.V.and Thomashow, L.S., 2007.** Role of 2,4 diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. Plant Biology, 9: 4-20.
176. **Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moënne-Loccoz, Y. and Défago, G., 2007.** Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4 diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? New Phytologist, 173: 861-872.

177. Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P.A.H.M., Briat, J.F., 2009. Role of iron in plant–microbe interactions. *Advances in Botanical Research*, 51: 491-549.
178. Rokhzadi, A., Asgharzadeh, A., Darvish, F., Nour-Mohammadi, G., Majidi, E., 2008. Influence of plant growth promoting Rhizobacteria on dry matter accumulation of Chickpea (*Cicer arietinum* L) under field conditions. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 3 (Suppl 2): 253-257.
179. Mehnaz, S., Weselowski, B., Aftab, F., Zahid, S., Lazarovits, G., Iqbal, J., 2009. Isolation, characterization, and effect of *pseudomonasfluorescens* on micropropagated sugarcane. *Canadian Journal of Microbiology*, 55 (Suppl 8): 1007-1011.
180. Johri, B.N., 2001. Technology development and demonstration of a new bacterial inoculant (GRP3) for improved legume production. Uttar Pradesh Government, Project report.
181. Kloepper, J.W. and Schroth, M.N., 1978. Plant growth-promoting hizobacteria on radishes. In *Proceedings of the 4th International Conference on lant Pathogenic Bacteria*. pp. 879-882.
182. Zhang, F., Dashti, N., Hynes, R. K. and Smith, D. L., 1996. Plant growth promoting hizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation atsuboptimal root zone temperatures. *Annals of Botany* 77: 453-459.
183. Bravo, A., Gill, S.S., Soberon, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.
184. Helgason, E., Okstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. and Kolsto, A.B., 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* 66: 2627-2630.
185. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.

186. **Emmert, E.A.B. and Handelsman, J., 1999.** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171: 1-9.
187. **Gutiérrez Mañero, F.J., Probanza, A., Ramos, B., Colón Flores, J.J., Lucas García J.A., 2003.** Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Journal of Plant Nutrition*, 26 (Suppl 5): 1101-1115.
188. **Barriuso, J. and Solano, B.R., 2008.** Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Journal of Plant nutrition*: 1-17.
189. **Mcinroy, J.A. and Kleopfer, J.W., 1995.** Survey of indigenous bacteria endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil.* 173: 337- 342.
190. **Huang, H.C., Kokko, E.G., Yanke, L.J. and Phillippe, R.C., 1993.** Bacteria suppression of basal pod rot and end rot of dry peas caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Microbiol.* 39: 227-233.
191. **Bell, C.R., Dickie, G.A., Harvey, W.L.G. and Chan, J.W.Y.F., 1995.** Endophytic bacteria in grapevine. *Can. J. Microbiol.* 41: 46-53.
192. **Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F., 2006.** Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci. Hortic.* 111(1): 38-43.
193. **García, J.A.L., Probanza, A., Ramos, B., Flores, J.J.C., Mañero, F.J.G., 2004.** Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) on the biological nitrogen fixation, nodulation, and growth of *Lupinus albus* L cv. Multolupa. *Engineering in Life Sciences*, 4 (Suppl 1): 71-77.
194. **Jaizme-Vega, M.D.C., Rodríguez-Romero, A.S., Guerra, M.S.P., 2004.** Potential use of rhizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagated bananas. *Fruits*, 59 (Suppl 2): 83-90.
195. **Kaymak, H.C., Yarali, F., Guvenc, I., Donmez, M.F., 2008.** The effect of inoculation with plant growth Rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L) Cuttings. *African Journal of Biotechnology*, 7 (Suppl 24): 4479-4483.
196. **Supanjani., Han, H.S., Jung, J.S., Lee, K.D., 2006.** Rockphosphate-potassium and rock-solubilising bacteria as alternative, sustainable fertilisers. *Agronomy for Sustainable Development*, 26 (Suppl 4): 233-240.

- 197. Kucey, R.M.N., H.H. Janzen, et M.E. Legget., 1989.** Microbial mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron.* 42:199-228.
- 198. Wani, P.A., Khan, M.S. and Zaidi, A., 2007.** Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 170: 283-287.
- 199. Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablutowicz, R.M., 1989.** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity *Trends Biotechnol.*, 7 (1989), pp. 39-4.
- 200. Hinsinger, P., 2001.** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil.* 237:173-195.
- 201. Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J. and Poole, P.S., 2002.** Role of soil microorganisms in improving nutrition of plants. *Plant and Soil.* 245: 83-93.
- 202. Millera, G., Shulaevb, V. and Mittler, R., 2008.** Reactive oxygen signaling
- Illmer, P., Schinner, F., 1995.** Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27, 257-263.
- 203. Hwangbo, H., Park, R.D., Kim, Y.W., Rim, Y.S., Park, K.H., Kim, T.H., Suh Kim, K.Y., 2003.** 2-Ketogluconic production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium*. *Curr. Microbiol.* 47, 87-92.
- 204. Hameeda, B., G. Harini, OP. Rupela, SP. Wani et G. Reddy., 2008.** Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.* 163:234-242.
- 205. Banik, S. et B.K. Dey., 1983.** Phosphate solubilizing potentiality of the microorganisms capable of utilizing aluminium phosphate as a sole phosphate source. *Zentralbl. Mikrobiol.* 138:17-23.
- 206. Vazquez, P., G. Holguin, M. E., Puente, A., Lopez-Cortes and Bashan, Y., 2000.** Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils.* 30: 460-468.
- 207. Nautiyal, CS., 1999.** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170: 260-270.
- 208. Rodriguez, H. and Fraga, R., 1999.** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17, 319-339.
- 209. Verma, S. C., Ladha, J. K. and Tripathi, A. K., 2001.** Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91: 127-141.

- 210. Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., Latif, F., 2004.**Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pak. J. Biol. Sci. 7, 187-196.
- 211. Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G. and Penrose, D.M., 1995.** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London.
- 212. Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y., 2009.** Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. In: van Loon LC (ed) Advances in botanical research, vol 51. Academic, Burlington, pp 283-320.
- 213. Dastager, S.G., Deepa, C.K. and Pandey, A., 2010.**Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J.Microbiol. Biotechnol.*,**27**: 259-265.
- 214. Cherif, H., 2014.** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. These Doctorat en Sciences. FSNV-UFAS, Setif, 162p.
- 215. Ruchi, R., Kapoor, R.R., Kumar, A., Kumar, A., Patil, S., Thapa, S. and Kaur, M., 2012.** Evaluation of plant growth promoting attributes and lytic enzyme production by fluorescent *Pseudomonas* diversity associated with Apple and Pear. International Journal of Scientific and Research Publications, Volume 2, Issue 2. ISSN 2250-3153.
- 216. Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S., 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163: 173-181.
- 217. Gravel, V., Antoun, H. and Tweddell R.J., 2007.** Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of Indole Acetic Acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.*, 39: 1968-1977.
- 218. Kumar, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C. and Negi, S., 2012.** Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent Research in Science and Technology*, 4(1): 01-05. ISSN: 2076-5061.
- 219. Xie, H, Pasternak, J.J., Glick, B.R., 1996.** Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that over produce indole acetic acid. *Curr. Microbiol.* 32:67-71.

- 220. Barazani, O. and Friedman, J.,1999.** Is IAA the major root growth factor secreted from plantgrowth-mediating bacteria. *J. Chem. Ecol.*, 25: 2397-2406.
- 221. Patten, C.L. and Glick, B.R., 2002.** Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary phase sigma factor RpoS. *Can. J. Microbiol.* 48: 635-642.
- 222. Arshad, M. and Frankenberger, W.T., 1991.** Microbial production of plant hormones. *Plant Soil.* 133:1-8.
- 223. Tanimoto, E., 2005.** Regulation of root growth by plant hormones roles for auxin and gibberellin. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24: 249-265.
- 224. Devi, K.K., Seth, N., Kothamasi, S., Kothamasi, D., 2007.** Hydrogen cyanide-producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (Rambur) by cyanide poisoning under *in Vitro* Conditions. *Curr. Microbiol.* 54, 74-78.
- 225. Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth-promoting activities. *Microbiol. Res.* 163: 173-181.
- 226. Castric, P.A., 1977.** Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. *J. Bacteriol.* 130: 826-831.
- 227. Wising, F., 1974.** Cyanide formation from oxidation of glycine by a *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology* 117, 1289-1294.
- 228. Heydari, S., Moghadam, P.R., Arab, S.M., 2008.** HydrogenCyanide Production Ability by *Pseudomonas Fluorescence* Bacteria and their Inhibition Potential on Weed. *In Proceedings "Competition for Resources in a ChangingWorld: New Drive for Rural Developmen: 7- 9.*
- 229. Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia,V., Delfago,G., Keel, C. and Haas, D., 1998.** Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.*,**180**: 3187-3196.
- 230. Mehta, S. and Nautiyal, C. S., 2001,** An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* 43, 51Ð56.
- Joseph, B., Patra, R.R. and Lawrence, R., 2007.** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.*, 2: 141-152.

- 231. Mullineaux, P.M., Karpinski, S. and Baker, N.R., 2006.** Spatial Dependence for Hydrogen Peroxide-Directed Signaling in Light-Stressed Plants Physiology ; 141(2): 346-350.and abiotic stress. Review. *Hysiologia Plantarum* 133: 481–489.
- 232. Glick, B.R., Penrose, D.M., Li, J.,1998.** A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**: 63-68.
- 233. Loper, J.E. and Schroth, M.N., 1986.** Influence of bacterial sources of indole-2-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* 76: 386-389.
- 234. Shaukat, K., Affrasayab, S.and Hasnain, S., 2006.** Growth responses of *Helianthus annuus* to plant growth promoting rhizobacteria used as a biofertilizer., *J.Aгри.Res.*,vol.1(6),pp.573-581.
- 235. Jacoud, C., Job, D., Wadoux, P., Bally, R., 1999.** Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can. J. Microbiol.* 45: 339-342.
- 236. Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Azarova,T., Makarova,N., Lugtenberg, B.J.J., 2006.** Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:250–56.
- 237. Normander, B.,Hendriksen, N.B., Nybroe, O., 1999.** Green Fluorencens Protein- Marcked *Pseudomonas fluorescens/* Localization, Vrabiltay/ Localiza and Activity in the natural Barley Rhizosphere. *Applied and Enviromental Licrobiolog* 46: 646-651.
- 238. Jong-Soo, J., Sang-Soo, L., Hyoun-Young, K., Tae-Seok, A., Hong-Gyu, S., 2003.** Plant growth Promotion in Soil by some inoculated Microorganisms the journal of Microbiology, 41 (4): 271-276.
- 239. Sang-Woo, L., IL-Pyung, A., Sang-Yeon, S., Sue-Yeon, L., Myeon-Whoon, S., Soonok, K., Sook-Young, P., Yong-Hwan, L., Seogchan, K., 2010.** *Pseudomonas sp.*LSW25R, antagonistic to plant pathogens, promoted plant growth, and reduced blossom-end rot of tomato fruits in a hydroponic system. *Eur. J Plant Pathol* 126: 1-11.

- 240. Bakker, A.W. and 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, 451–457.
- 241. Cassa'na, F., Perriga, D., Sgroya, V., Masciarellia, O., Pennab, C., Lunaa, V., 2009.** *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E 109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L) and soybean (*Glycine max* L). *European Journal of Soil Biology*, 45: 28-35.
- 242. Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan A.and Samiyappan, R., 2004.** Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Prot.*, 23: 835-843.
- 243. Wang C., Knill, E., Glick, B.R., De'fago, G., 2000.** Effect of transferring I-aminocyclopropane-I-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescen* strain CHAO and its gac A derivativ CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Can. J. Microbiol* 46: 898-907.
- 244. Lata and Saxena, A.K., 2003.** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria. In: *Training manual on Biofertilizer Technology* (eds.) A K Saxena. IARI Delhi pp. 24-25. **Haddad, N., Krimi, Z., Raio, A., 2012.** Endophytic bacteria from weeds promote growth of tomatoto plants *in vitro* and in green house. In: Schneider C, Leifert C, Feldmann F (Eds), *Endophytes for plant protection: the state of the art*, pp. 27-32.
- 245. Belimov, A.A., Safronova, V.I., Sergeyeva, T.A., et al., 2001.** Characterisation of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 642–652.
- 246. Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P.A.H.M., Briat, J.F., 2009.** Role of iron in plant–microbe interactions. *Advances in Botanical Research*, 51: 491-549.
- 247. Bertrand, H., Plassard, C., Pinoshet, X., Touraine, B., Normand, P., Cleyet-Marel, J.C., 2000.** Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobaterium (*Achromobacter* sp). *Canadian Journal of Microbiology* N°46:229-236.