

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا للعلوم الفلاحية
Ecole Nationale Supérieure Agronomique
El-Harrach, Alger



Ecole Doctorale : Biotechnologies Végétales
مدرسة الدكتوراه : تقانة حيوية نباتية
Option : Biotechnologies Végétales

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en
Biotechnologies Végétales

Biotisation des plantes (*Solanum lycopersicum* et *Arabidopsis thaliana*)
par les PGPRs et élicitation des réactions de défense inductible

Par : BOUKERMA Lamia

Jury :

Président	BOUZNAD Z.	Professeur, ENSA, El Harrach
Directeur de thèse	BENCHABANE M.	Professeur, Université de Blida 1
Co-Directeur de thèse	KHELIFI L.	Professeur, ENSA, El Harrach
Examineur	BELKAHLA H.	Professeur, Université de Blida1
Examineur	ZITOUNI A.	Professeur, ENS, Kouba

2016-2017

A ma chère mère, A mon cher père

A mon cher mari

« S'il n'y avait pas d'hiver, le printemps ne serait pas si agréable : si nous ne goûtions pas à l'adversité, la réussite ne serait pas tant appréciée »

Anne Bradstreet

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont le fruit de six années de recherches, menées au sein de quatre équipes scientifiques : le laboratoire de protection et de valorisation de ressources agro-biologiques de l'université Saad Dahleb, Blida 1 (Algérie) ; le laboratoire de biotechnologie de la rhizosphère de l'université San Pablo CEU, Madrid (Espagne) ; le laboratoire d'écologie moléculaire de l'université de Cologne (Allemagne) et le laboratoire d'évolution moléculaire d'*Arabidopsis thaliana* de l'université de Munster (Allemagne). J'ai pris énormément de plaisir dans ce travail de recherches pendant toutes ces années et cette thèse fut une expérience unique et extrêmement enrichissante, que ce soit d'un point de vue scientifique ou relationnel. Je souhaite remercier par ces quelques lignes toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse: Professeur BENCHABANE M., (université de Blida 1), qui m'a encadré pendant dix ans, depuis mon premier diplôme universitaire, de m'avoir épaulé tout au long de mes années d'étude, pour m'avoir appris à être plus autonome dans ce travail, pour m'avoir fait profiter de ses connaissances et pour son soutien précieux lors de la rédaction de cette thèse. Je suis très reconnaissante pour ses qualités rares tant au niveau humain que scientifique, sans lesquelles le développement et l'achèvement de ces recherches et de ce manuscrit, n'auraient été possibles.

C'est avec beaucoup de reconnaissance que j'adresse mes sincères remerciements à Monsieur KHELIFI L. Professeur à l'ENSA d'El Harrach, d'avoir accepté de co-encadrer cette thèse. Merci pour votre encadrement et vos conseils tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur BOUZNAD Z. (Professeur à l'ENSA d'El Harrach) pour me faire l'honneur de présider le jury. J'adresse également mes sincères remerciements à Madame BELKAHLA H. (Professeur à l'université de Blida 1) et à Monsieur ZITOUNI A. (Professeur à l'ENS, Kouba) d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je voudrais exprimer ma plus profonde gratitude à Mme DE MEAUX J., (Professeur à l'université de Cologne, Allemagne), pour m'avoir intégré dans son groupe de recherche, pour son soutien, son écoute et ses encouragements durant toute ma période de séjour en Allemagne ; d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir fourni d'excellentes conditions de travail au sein de son laboratoire, un grand merci à vous.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe de recherche d'écologie moléculaire, pour leur accueil et leur aide: Professeur SCHMITZ G., Dr TAKOU M., Dr AGUSTIN A., Dr STEIGE K., Dr DITTBERNER H. et Mme BELL K. Leurs avis et leurs conseils ont amplement contribué à améliorer ces travaux.

Je souhaite également exprimer mes plus sincères remerciements à Mme RAMOS-SOLANO B. (Professeur à l'université San Pablo CEU, Madrid) de m'avoir accueilli au sein de son groupe de recherche. Mes vifs remerciements s'adressent également à tous les membres de l'équipe de recherche de biotechnologie de la rhizosphère pour leur accueil et leur aide : Dr GARCIA-VILLARACO A., Dr ANTONIO J.L., Dr BONILLA A., Dr GUTIERREZ-MAÑERO J.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur BECKER C. (chercheur au centre génomique de l'université de Cologne) pour m'avoir permis d'effectuer une partie de ce travail au sein de son laboratoire de génomique.

Je tiens à remercier Monsieur BONKOWSKI M. (Professeur à l'université de Cologne) pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et pour ses encouragements. Je souhaite également adresser mes remerciements au Dr SKLORZ K. pour ses conseils et son aide précieuse.

Je voudrais également remercier Mme FADIL D. ingénieur du laboratoire de mycologie, Dr AMMAD F. Maître de conférences pour leurs encouragements et leur soutien.

Mes plus sincères remerciements vont à mes parents, les deux personnes les plus chères dans ma vie, source inépuisable de tendresse, de patience, de sacrifice, d'inspiration, de force et de courage. Sans eux, sans leur amour, leur confiance, leur immense affection, leur soutien, je ne serais jamais arrivée là. Je leur dois beaucoup.

Je remercie Yamin, mon cher mari, pour m'avoir prodigué son soutien, pour ses encouragements et ses conseils si précieux.

Enfin, je voudrais adresser mes sincères remerciements et ma plus grande reconnaissance au Directeur de l'ENSA pour m'avoir octroyé une bourse au cours de mes années d'étude du doctorat.

Biotisation des plantes (*Solanum lycopersicum* et *Arabidopsis thaliana*) par les PGPRs et élicitation des réactions de défense inductible

RESUME

Les rhizobactéries phytobénéfiques constituent une source microbienne largement étudiée pour sa valorisation et son exploitation dans des pratiques agroécologiques. Ces agents biologiques peuvent réduire les maladies des cultures par l'induction des réponses défensives chez la plante hôte, connues par la résistance systémique induite (ISR). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux aspects de bioprotection des plantes vis-à-vis de certains agents biotiques et abiotiques. Un essai préliminaire a été réalisé afin d'étudier le potentiel de *Pseudomonas fluorescens* PF15 et *Pseudomonas putida* PP27 pour protéger les plants de tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire. L'expérimentation *in situ* a été réalisée en deux systèmes : split root pour l'induction de la résistance systémique et non split root pour le biocontrôle. Les effets bénéfiques des rhizobactéries ont été démontrés par le ralentissement de l'évolution et du développement de la maladie. Des taux de bioprotection considérables sont notés, notamment en système split root. Ces taux se révèlent particulièrement importants en réduction de la sévérité (37,17 % à 71,88 %) ainsi que des niveaux d'infection (7,41 % à 35,83 %).

Une deuxième étude a été effectuée dans le but de comprendre l'effet de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 et ses dérivés effecteurs sur la protection de la tomate contre *Xanthomonas campestris* et d'analyser l'interrelation possible entre la croissance, la protection, la photosynthèse et le métabolome. N21.4 et ses dérivés bioeffecteurs ont montré une suppression significative de la maladie (40 %-60 %) et ont stimulé la croissance (17 %-40 %). La stimulation des réactions de défense chez la tomate a été associée à une augmentation transitoire de l'activité des enzymes antioxydantes. La souche N21.4 a amélioré l'activité photosynthétique. Le transcriptome des protéines PR1, PR2 et PR3 (PRs, pathogenesis related) n'a pas révélé une différence significative.

Les rhizobactéries phytobénéfiques (*Rhizobium léguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti* *Pseudomonas fluorescens* PF.64 et *Pseudomonas fluorescens* BB.10) ont induit une tolérance et des changements sur le phénotype et l'architecture racinaire d'*Arabidopsis thaliana* (Col-0) vis-à-vis du stress salin (120 mM). Les plantes bactérisées et stressées par le chlorure de sodium ont pu survivre et ont présenté une symptomatologie atténuée par rapport aux plants traités uniquement avec NaCl, avec une mortalité très élevée (100 %). Ces bactéries bénéfiques n'ont pas stimulé la croissance dans la situation sans stress, mais leurs effets ont été plus apparents dans l'induction de la tolérance vis-à-vis du stress salin.

Mots clés : *Pseudomonas* spp. fluorescents, *Rhizobium* spp., Bioprotection, Induction de la résistance systémique, Phytostimulation.

ملخص

بعض البكتيريا النافعة المتلائمة في تعابيشها في المنطقة الملاصقة لجذور النبات تساهم في الوقاية من الأمراض النباتية بتطبيقات محافظة للبيئة، و ذلك بتحفيز القدرات الدفاعية الطبيعية لدى النبات و/أو المكافحة الحيوية المباشرة ضد الطفيليات. الغرض من الدراسة التجريبية هو إظهار مفعول تنشيط القدرات الدفاعية الطبيعية الجهازية والمكافحة البيولوجية لدى نبات الطماطم ضد مرض الذبول الفرتسيلي ، وذلك باستخدام سلالتين من البكتيريا النافعة (بسيودوموناس فلورزنس و بسيودوموناس بوتيدا. النتائج المخبرية الأولية أظهرت أثر ايجابي في توقيف النمو الفطري وذلك باختلاف السلالات البكتيرية و الأوساط المغذية، مع تثبيط كحد أقصى 47.13%. التجربة الميدانية أجريت في نظامين : جذور مقسومة للتنشيط المقاومة الطبيعية و جذور غير مقسومة من اجل المكافحة البيولوجية. وقد أظهرت النتائج آثار مفيدة لتطبيق البكتيريا النافعة وذلك بتباطؤ ظهور وتطور المرض. لقد سجلت نسب حماية حيوية ملموسة و خاصة في نظام جذور مقسومة. هذه النسب هي ذات أهمية خاصة في الحد من شدة خطورة المرض (37.17 % إلى 71.88 %) بالمقارنة مع مستويات ظهوره (7.41 % الى 35.83%). بالإضافة إلى هذه الآثار الايجابية في المكافحة الحيوية وتحفيز المقاومة الطبيعية، تطبيق البكتيريا النافعة حقق زيادة في الكتلة الحيوية وتحسين في الجوانب الفسيولوجية والبيوكيميائية.

لقد أجريت الدراسة الثانية لفهم تأثير N21.4 بسيودوموناس فلورزنس لحماية الطماطم ضد زانثوموناس كامبستريس وفهم العلاقة بين النمو والحماية بتحفيز القدرات الدفاعية الطبيعية والتركيب الضوئي. أظهرت النتائج قمع المرض بنسبة 40 % - 60% وتحفيز النمو 17 % - 40%. وارتبط مفعول تنشيط القدرات الدفاعية الطبيعية في نبات الطماطم مع زيادة عابرة في نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة بسيودوموناس فلورزنس N21.4 حسنت التركيب الضوئي ولم تثر علي نشاط البروتينات PR1 , PR2 , PR3 .

البكتيريا النافعة بسيودوموناس فلورزنس E64 , ريزوبيوم ليغومينوساروم، سينور هيزوبيوم ميليلوتي بسيودوموناس فلورزنس BB10 أظهرت تغير في النمط الظاهري و البنية الجذرية لنبات أرابيدوبسيس ثاليانا ضد الإجهاد الملحي (120 ملليمول). أبدت النباتات المعالجة بالبكتيريا النافعة الأعراض المرضية بين اوراق ارجوانية إلى صفراء والذبول في حين النباتات المعالجة فقط بكلوريد الصوديوم، أظهرت نسبة الوفيات 100%. البكتيريا المفيدة لم تحفز النمو في الوضع بدون إجهاد الملحي ولكن كان التأثير أقوى ضد الإجهاد الملحي , مع الحث على البقاء على قيد الحياة بنسبة تصل إلى 100%.

الكلمات المفتاحية : بسيودوموناس فلورزنس , ريزوبيوم , تحفيز الدفاعات الطبيعية، المكافحة البيولوجية و تحسين نمو النبات.

ABSTRACT

Beneficial rhizobacteria form a microbial source widely studied for its valorization and its exploitation in agroecological practices. These biological agents can reduce crop diseases by inducing defensive responses in the host plant, known by induced systemic resistance (ISR). In our study, we were interested in the bioprotection of plants against biotic and abiotic stress. A preliminary experiment was carried out to investigate the potential of *Pseudomonas fluorescens* PF15 and *Pseudomonas putida* PP27 to protect tomato plants against vascular Fusarium wilt. *In situ* experiment were carried out in two systems: split root for the systemic induced resistance and no split root for biocontrol. The beneficial effects of rhizobacteria have been demonstrated with a slowing disease evolution. A significant rates of bioprotection are noted, especially in the split root system. These rates are particularly important in reducing the Mckinney indice (severity) (37.17% to 71.88%) and the levels of infection (7.41% to 35.83%).

A second study was carried out in order to understand the effect of *Pseudomonas fluorescens* N21.4 and its effector to protect tomato plants against *Xanthomonas campestris* and to understand the interrelation between growth, protection, photosynthesis, metabolome and transcriptome. N21.4 and its bioeffector showed a significant disease suppression (40% -60%) and stimulated growth (17% -40%). ISR in tomato plants has been associated with a transient increase in the activity of antioxidant enzymes. *P. fluorescens* N21.4 improved photosynthetic activity. The transcriptome of the proteins PRs (pathogenesis related) PR1, PR2 and PR3 did not reveal a significant difference.

Application of rhizobacteria (*Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas fluorescens* PF.64 and *Pseudomonas fluorescens* BB.10) induced a change in phenotype and root architecture of *Arabidopsis thaliana* (Col-0) under salinity stress 120 mM. Plants treated with rhizobacteria and sodium chloride showed symptoms between purple, yellowing and wilting, whereas plants treated with NaCl alone could not survive. These beneficial bacteria did not stimulate growth under no stress situation, but their effect was stronger against salt stress with induction of tolerance (100%).

Keywords : *Pseudomonas* spp. fluorescents, *Rhizobium* spp., Bioprotection, Systemic Induced Resistance, Phytostimulation.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

RESUME

ملخص

ABSTRACT

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION..... 13

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Mécanismes de défense chez les plantes	16
1.1. Défenses passives.....	16
1.2. Défenses actives.....	17
1.2.1. Renforcement de la paroi.....	17
1.2.2. Espèces réactives d'oxygène	17
1.2.3. Phytoalexines	18
1.2.4. Protéines PRs (Pathogenesis-Related).....	18
2. Types de Résistances des plantes	19
2.1. Résistance non hôte (Reconnaissance non-spécifique).....	19
2.2. Résistance hôte (Reconnaissance spécifique)	24
2.3. Résistance systémique induite	28
2.3.1. Déterminants bactériens.....	29
2.3.1.1. Lipopolysaccharides	29
2.3.1.2. Flagelles.....	29
2.3.1.3. Antibiotiques.....	30
2.3.1.4. Substances volatiles.....	30
2.3.1.5. Sidérophores.....	30
2.3.2. Voies de signalisation et systémisation de la résistance.....	31
2.3.2.1. Flux ioniques.....	32
2.3.2.2. Espèces réactives d'oxygène.....	32
2.3.2.3. Phosphorylations et déphosphorylation.....	32
2.3.2.4. Signalisation hormonale.....	33
2.3.2.4.1. Voie dépendante de l'acide salicylique	34
2.3.2.4.2. Voie indépendante de l'acide salicylique	34
2.3.2.5. NPR1 (Non-Expressor of Pathogenesis-Related Genes1).....	35
2.3.3. Priming (Mise en alerte).....	35
3. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs)	39
3.1. Groupe <i>Pseudomonas</i> fluorescents	39
3.1.1. Interaction PGPRs-pathogènes.....	42
3.1.1.1. Compétition trophique et spatiale	42
3.1.1.2. Métabolites antimicrobiens	43
3.1.2. Interaction PGPRs-plantes	43
3.1.2.1. Phytohormones	44
3.1.2.2. Vitamines	44
3.1.2.3. Assimilations phosphatée et azotée.....	44
3.1.2.4. Stimulation des réactions de défense	45
3.2. Régulation du métabolisme secondaire.....	45
3.2.1. Métabolites antimicrobiens et enzymes extracellulaires.....	47
3.2.2. Sidérophores	48
3.2. Groupe de <i>Rhizobium</i>	51
4. Stress biotique et abiotique	52
4.1. Fusariose vasculaire	52
4.2. Gale bactérienne	55
4.3. Stress salin	56

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

EXPERIMENTATION 1 : INDUCTION DE LA RESISTANCE SYSTEMIQUE CHEZ LA TOMATE VIS-A-VIS DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE	58
1. Microorganismes	58
2. Antagonisme <i>in vitro</i>	58
3. Essais d'induction de la résistance systémique	59
3.1. Conditions d'expérimentation	59
3.2. Dispositif expérimental	60
3.2.1. Système split root	60
3.2.2. Système non split root	61
3.3. Inoculum	61
3.4. Paramètres étudiés	64
3.4.1. Evolution de la maladie	64
3.4.1.1. Taux d'infection	64
3.4.1.2. Indice de McKinney (Sévérité)	64
3.4.1.3. Gravité de la maladie	65
3.4.2. Chlorophylle totale	65
3.4.3. Biomasse	66
4. Analyse statistique	66
EXPERIMENTATION 2 : INDUCTION DE LA RESISTANCE SYSTEMIQUE CHEZ LA TOMATE VIS-A-VIS DE LA GALE BACTERIENNE	68
1. Souches bactériennes	68
2. Bioeffcteurs bactériens	68
3. Plan d'expérimentation	69
3.1. Action de <i>Pseudomonas fluorescens</i> N21.4 sur l'induction de la résistance systémique	69
3.2. Action des bioeffcteurs bactériens sur l'induction de la résistance systémique	69
4. Inoculum	70
5. Paramètres étudiés	71
5.1. Symptomatologie	71
5.2. Chlorophylle totale	71
5.3. Mesures de fluorescence du photosystème I (PSII)	71
5.4. Dosages des activités enzymatiques	71
5.4.1. Ascorbate peroxydase (APX)	72
5.4.2. Gaïacol peroxydase (GPX)	73
5.4.3. Gutathion réductase (GR)	73
5.4.4. Superoxyde dismutase (SOD)	73
5.4.5. Polyphénol oxydase (PPO)	74
5.4.6. β -1,3-glucanase	74
5.4.7. Chitinase	74
5.5. Transcriptome	75
6. Analyse statistique	76
EXPERIMENTATION 3 : INDUCTION DE LA TOLERANCE CHEZ <i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0) PAR LES <i>Pseudomonas</i> FLUORESCENTS ET <i>Rhizobium</i> spp.	77
1. Souches bactériennes	77
2. Plan d'expérimentation	77
3. Inoculum	78
4. Paramètres étudiés	79
4.1. Symptomatologie	79
4.2. Evaluation de la croissance	79
4.3. Evaluation de l'architecture racinaire	79
5. Analyse statistique	79
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION	80
EXPERIMENTATION 1 : INDUCTION DE LA RESISTANCE SYSTEMIQUE CHEZ LA TOMATE VIS-A-VIS DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE	80
1. Antagonisme <i>in vitro</i>	80
2. Symptomatologie	81
3. Evolution de la maladie	82
3.1. Taux d'infection	82
3.2. Indice de Mckinney	82
3.3. Gravité	84

4. Chlorophylle totale	85
5. Proline	85
6. Biomasse	86
7. Discussion	87
EXPERIMENTATION 2 : INDUCTION DE LA RESISTANCE SYSTEMIQUE CHEZ LA TOMATE VIS-A-VIS DE LA GALE BACTERIENNE	89
1. Action de <i>Pseudomonas fluorescens</i> N21.4 sur l'induction de la résistance.....	89
1.1. Symptomatologie	89
1.2. Indice de la maladie.....	89
1.3. Biomasse	90
1.4. Activité photosynthétique.....	91
1.4.1. Mesure de la fluorescence du photosystème II (PSII).....	91
1.4.2. Indice de chlorophylle	92
1.5. Activités enzymatiques	92
1.5.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	92
1.5.2. Ascorbate peroxydase (APX).....	93
1.5.3. Glutathion réductase (GR).....	93
1.5.4. Gaiacol peroxydase (GPX).....	93
1.5.5. Polyphenol oxidase (PPO).....	95
1.5.6. Protéines PRs.....	95
1.6. Transcriptome	96
2. Action des bioeffecteurs bactériens sur l'induction de la résistance systémique.....	96
2.1. Indice de la maladie.....	96
2.2. Biomasse.....	97
2.3. Activité photosynthétique.....	98
3. Discussion.....	100
EXPERIMENTATION 3 : Induction de la tolérance chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0) par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents et <i>Rhizobium</i> spp. vis-à-vis du stress salin	106
1. Symptomatologie	106
2. Indice de la maladie	107
3. Biomasse.....	107
4. Diamètre de la rosette	109
5. Architecture racinaire	111
6. Discussion	111
DISCUSSION GENERALE.....	115
CONCLUSION	120
ANNEXES.....	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125
PUBLICATION	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les récepteurs PRRs (pattern recognition receptor) extracellulaire et intracellulaire chez les plantes et les animaux.....	20
Figure 2 : Modèle en Zig-zag illustrant le système immunitaire des plantes	22
Figure 3 : Eliciteurs des plantes.....	22
Figure 4 : Perception des PAMPs chez les plantes par des récepteurs.....	24
Figure 5 : Modèle de mise en évidence de la résistance des plantes face aux bactéries.....	27
Figure 6 : Voies de transduction du signal de la SAR et de l'ISR	36
Figure 7 : Phénomène de potentialisation chez les plantes supérieures.....	36
Figure 8 : Les différentes étapes du priming.....	37
Figure 9 : Colonisation des racines par <i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS365.....	40
Figure 10 : Interactions entre les PGPRs, la plante, le pathogène et le sol	40
Figure 11 : Voie de transduction du signal du système GacS/GacA chez <i>P. fluorescens</i> CHA0.....	48
Figure 12 : Structures chimiques de la pyoverdine de <i>Pseudomonas putida</i> (PP) et de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (PF).....	50
Figure 13: Processus de la nodulation.....	52
Figure 14 : Symptômes causés par FOL.....	54
Figure 15: Symptômes de la gale bactérienne sur tomate	55
Figure 16: Essai d'antagonisme <i>in vitro</i> entre <i>Pseudomonas</i> spp. et <i>Fusarium</i> (FOL).....	59
Figure 17: Dispositif expérimental.....	62
Figure 18 : Système de split root.....	63
Figure 19 : Symptomatologie typique de la fusariose vasculaire de la tomate.....	67
Figure 20 : Système expérimental.....	70
Figure 21: Dispositif de mesure de la fluorescence chlorophyllienne	72
Figure 22 : Dispositif expérimental.....	77
Figure 23 : Echelle symptomatologique de stress salin chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
Figure 24: Inhibition de la croissance mycelienne (%) par les <i>Pseudomonas fluorescens</i> PF15, <i>Pseudomonas putida</i> PP27 et <i>Fusarium lycopersici</i> f. sp. <i>oxysporum</i>	80
Figure 25: Antagonisme <i>in vitro</i> entre <i>Pseudomonas fluorescens</i> PF15, <i>Pseudomonas fluorescens</i> PP27 et <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (FOL).....	80
Figure 26: Symptomatologie de la fusariose vasculaire.....	81
Figure 27: Bioprotection des plants de tomates induite par <i>Pseudomonas fluorescens</i> contre la fusariose vasculaire.....	82
Figure 28: Evolution de la fusariose vasculaire chez la tomate	83
Figure 29: A) Taux finaux de l'indice de la maladie et l'indice de Mckinney. B) Gravité de la fusariose vasculaire.....	84
Figure 30: Indice de chlorophylle totale.....	85
Figure 31: Teneur en proline chez les plants traités avec <i>Pseudomonas fluorescens</i> PF15, <i>Pseudomonas putida</i> PP27, et leur combinaison et inoculés avec FOL.....	86
Figure 32 : Poids frais et sec de la partie aérienne (g) des plants de tomate traités avec <i>Pseudomonas fluorescens</i> PF15, <i>Pseudomonas putida</i> PP27, ou leur combinaison et inoculés par <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	86
Figure 33 : Indice de la gale bactérienne des plants de tomates traités avec <i>Pseudomonas fluorescens</i> N21.4 et infectés avec le pathogène.....	89
Figure 34 : Effet de <i>Pseudomonas fluorescens</i> N21.4 sur la croissance de la tomate (poids sec des racines et de la partie aérienne).....	90
Figure 35 : Effet de <i>Pseudomonas fluorescens</i> N21.4 sur la hauteur des plants de tomate.....	90
Figure 36: Activité photosynthétique des plants de tomate.....	91
Figure 37: A : Indice de chlorophylle (rapport entre les plants de tomates traités avec <i>Pseudomonas fluorescens</i> N21.4 et infectés avec <i>Xanthomonas campestris</i> , et le contrôle sain).....	92
Figure 38: Expression relative de l'activité enzymatique antioxydant.....	94
Figure 39: Activités enzymatiques des protéines PRs (Pathogenesis related proteins) des plants de tomate traités avec <i>Pseudomonas fluorescens</i> N21.4 et inoculés avec <i>Xanthomonas campestris</i>	95

Figure 40 : Expression des gènes PRs (Pathogenesis related proteins).....	96
Figure 41: Indice de la gale bactérienne des plants de tomate traités avec <i>Pseudomonas fluorescens</i> N21.4 vivant, N21.4 traités aux UV, bioeffecteurs dérivés de N21.4.....	97
Figure 42 : Poids sec de la partie aérienne et racinaires des plants de tomate traités avec <i>Pseudomonas fluorescens</i> N21.4 vivant, N21.4 traité aux UV, bioeffecteurs dérivés de N21.4.....	98
Figure 43 : Hauteur des plants de tomates (du collet à la 1 ^{ère} feuille ou à la dernière feuille) traités avec <i>Pseudomonas fluorescens</i> N21.4 vivant, N21.4 traité aux UV, bioeffecteurs dérivés de N21.4...	98
Figure 44: Activité photosynthétique des plants de tomate traités avec <i>Pseudomonas fluorescens</i> N21.4 et inoculés avec le pathogène : <i>Xanthomonas campestris</i>	99
Figure 45 : A : Symptômes du stress salin sur chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	106
Figure 46: Pourcentage de plantes survivantes (tolérantes) d' <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0.....	107
Figure 47 : Tolérance des plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0.....	108
Figure 48 : Surface foliaire (cm ² /g) des plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0.....	109
Figure 49 : Surface foliaire des plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0.....	110
Figure 50 : Evolution du diamètre de rosette des plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	111
Figure 51 : Architecture racinaire des plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en interaction avec <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents et <i>Rhizobium</i> spp.....	112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Famille de protéines PRs (pathogenesis-related proteins) (Van Loon et al., 2006).....	19
Tableau 2 : Origine et nature des éliciteurs	26
Tableau 3 : Mécanismes de défense stimulés par <i>Pseudomonas</i> fluorescents chez les plantes.....	45
Tableau 4: Echelle d'évaluation des symptômes typiques de la fusariose vasculaire de la tomate.....	65
Tableau 5 : Gènes PRs et contrôle (Song et al., 2010).....	75

LISTE DES ABREVIATIONS

A. thaliana: *Arabidopsis thaliana*
ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADN_c : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AHL: N-acyl homoserines lactones
AIA : Acide indole 3-acétique
AJ : Acide jasmonique
APX : Ascorbate peroxydase
ARN: Acide ribonucléique
ARN_r : Acide ribonucléique ribosomique
AS : Acide salicylique
BABA : Acide β-aminobutyrique
DAPG : 2,4-diacetylphloroglucinol
ECF δ : Extra cytoplasmic sigma factors
ET: Ethylène
ETI: Effector-triggered immunity
ETS : Effector-triggered susceptibility
F0 : Fluorescence minimale
Fm : Fluorescence maximale
FOL: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*
Fv : Fluorescence variable
Fv/Fm : Rendement quantique maximale du PSII
GPX : Gaïacol peroxydase
GR : Glutathion réductase
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HCN : Acide cyanhydrique
INA: Acide 2,6-dichloroisonicotinique
ISR : Induced Systemic Resistance
MAPKs : Mitogen-Activated Protéines kinase
MF: Matière fraîche
NPQ : Coefficient de dissipation non-photochimique
NPR1: Non-Expressor of Pathogenesis-Related Genes 1
P. fluorescens : *Pseudomonas fluorescens*
P/MAMP: Pathogen or Microbe-Associated Molecular Patterns
PAL: Phénylalanine ammonia-lyase
PDA: Potato Dextrose Agar
PGPRs: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PHL: 4-diacetylphloroglucinol
PO: Peroxidase
PPO : Polyphénol oxydase
PRs : Pathogenesis-Related
PRR: Pattern-recognition receptors
PTI: PAMP-triggered immunity
QS: Quorum sensing
R. léguminosarum: *Rhizobium léguminosarum*
RH : Réaction d'hypersensibilité
ROS : Reactive oxygen species
RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction
SAR : Systemic Acquired Resistance
SOD : Superoxyde dismutase
ΦPSII : Efficacité photosynthétique du photosystème II

INTRODUCTION

Dans leur environnement, les plantes sont fréquemment soumises à des agressions causées par des organismes pathogènes et/ou par des pressions environnementale et écologique pouvant nuire à leur croissance. Ces menaces biotiques et abiotiques causent d'importantes pertes de récolte en quantité et en qualité qui peuvent aller jusqu'à 50 % (Hammami et *al.*, 2015). Face à une telle situation, l'utilisation des intrants chimiques a toujours constitué la principale stratégie dans la gestion des productions agricoles. L'application abusive et répétée de ces matières actives, après tant d'années, a provoqué des problèmes écologiques, tout en favorisant le développement de formes résistantes chez les agents pathogènes; sans omettre les problèmes liés à la santé humaine par l'accumulation des molécules chimiques dans les produits alimentaires (Nakkeeran et *al.*, 2005; El Guilli et *al.*, 2009 ; Zakir et *al.*, 2016). Outre leurs coûts relativement élevés, les produits chimiques ne sont pas très spécifiques dans la plupart des cas, ils peuvent avoir des effets négatifs sur les composantes biotiques et même abiotiques. Globalement, à l'échelle mondiale malgré les bonnes volontés appelant et même exigeant la diminution des intrants chimiques en agriculture, le volume de ces produits ne cesse d'augmenter dans la balance commerciale (Muthamilarasan et Prasad, 2013 ; Piertese et *al.*, 2014 ; Zakir et *al.*, 2016).

Les enjeux d'avenir de l'agriculture s'efforcent à répondre aux objectifs de la production qualitative et quantitative, dans le respect des exigences du développement durable. L'intensification des pratiques agricoles est de plus en plus remise en cause, que ce soit pour des raisons socio-économiques, sanitaires ou environnementales. L'agrochimie ne permet plus de résoudre tous les problèmes phytosanitaires. La protection de la fertilité et de la durabilité des sols cultivés, est un enjeu majeur au niveau mondial. En effet, les terres cultivées s'appauvrissent et se fragilisent donc, le défi à relever est complexe.

Au cours de leur évolution, les plantes ont développé des moyens efficaces et adaptés pour faire face à ces stress abiotiques et/ou biotiques. Les plantes possèdent une capacité d'adaptation et un réseau immunitaire inné complexe pour se défendre contre les pathogènes et limiter leurs accès aux éléments nutritifs et l'envahissement de leurs structures internes. Certains microorganismes, ou leurs molécules actives, stimulent l'induction des réactions de défense des plantes et induisent leur tolérance, ce qui constitue une stratégie prometteuse dans la gestion des maladies infectieuses et physiologiques des cultures (Jakab et *al.*, 2001; Göhre et *al.*, 2014).

Il est à souligner que les microorganismes phytobénéfiques, par leurs actions directes ou via leurs molécules actives, peuvent protéger et stimuler les capacités défensives des plantes. Deux principaux mécanismes ont été identifiés. Les mécanismes directs sont : la production des molécules stimulatrices de la croissance des plantes et l'amélioration de l'assimilation des éléments nutritifs. Les effets indirects consistent à lutter contre les agents pathogènes en interagissant directement avec les plantes, en induisant les mécanismes de résistance du végétal, ce qui réduit l'intensité de la maladie.

Dans le contexte d'une production durable des agroécosystèmes, la stratégie de l'exploitation biotechnologique des populations microbiennes naturelles, autochtones ou introduites, agissant dans le microbiome des racines sont utilisées pour stimuler les capacités défensives naturelles des plantes et d'interférer avec les mécanismes employés par les bioagresseurs. Des microorganismes sélectionnés comme les PGPRs (Plants Growth Promoting Rhizobacteria) spécifiquement, les *Pseudomonas* fluorescents, les *Rhizobium* et autres champignons antagonistes peuvent sensibiliser la plante entière pour renforcer sa défense naturelle contre une large gamme d'agents pathogènes, par l'induction de sa résistance systémique (Induced Systemic Resistance, ISR) (van Loon et *al.*, 1998; Pieterse et *al.*, 2000, 2001, 2014). La compréhension des manifestations physiologiques, des changements métaboliques et des mécanismes moléculaires accompagnant et/ou déclenchant les systèmes de défense chez les plantes, pour contourner les agressions des agents phytopathogènes a ouvert de nouvelles voies dans la gestion des stratégies de contrôle pour une agriculture durable et plus respectueuse de l'environnement, même si de nombreux aspects restent encore peu élucidés.

L'objectif de nos travaux est d'étudier les réactions de réponse de deux plantes (arabette et tomate) après leur bactérisation par des PGPRs (*Pseudomonas* spp. fluorescents et *Rhizobium* spp.) au stress biotique et abiotique.

Initialement, un essai préliminaire a été réalisé au niveau du Laboratoire de Protection et de Valorisation de Ressources Agro-Biologiques, Faculté SNV. Université Saad Dahleb, Blida 1. L'objectif de cet essai est d'exploiter les potentialités de deux souches locales de PGPRs (*Pseudomonas fluorescens* PF15 et *Pseudomonas putida* PP27), sur l'induction de la résistance systémique et la stimulation de la croissance chez les plants de tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*).

Afin de comprendre plus profondément l'interaction PGPRs-Plante dans l'aspect de l'induction de la résistance systémique, un essai a été accompli au niveau du laboratoire de biotechnologie de la rhizosphère de l'Université San Pablo CEU, Madrid, Espagne. Nous avons étudié l'effet de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 et ses dérivés bioeffecteurs sur l'élicitation des réponses de défense de la tomate afin d'examiner la corrélation entre la physiologique, le métabolome et le transcriptome.

Nous nous sommes également intéressés à l'étude de l'effet des PGPRs vis-à-vis du stress abiotique. Pour cela, une expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire de l'évolution moléculaire d'*Arabidopsis thaliana* de l'université de Cologne (Allemagne). L'objectif est de tester l'effet des rhizobactéries (*Rhizobium léguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas fluorescens* PF.64, *Pseudomonas fluorescens* BB.10) sur *Arabidopsis thaliana* (Col-0) vis-à-vis du stress salin.

1. Mécanismes de défense chez les plantes

Tout au long de leur co-évolution, les plantes et les microorganismes pathogènes ont développé des relations complexes résultant d'un échange constant d'informations moléculaires. Les agents pathogènes ont élaboré toute une gamme de stratégies offensives pour parasiter les plantes et en contrepartie, les plantes ont déployé un arsenal défensif similaire, à bien des égards aux défenses immunitaires animales (Klarzynski et Fritig, 2001). Certains mécanismes de défense sont constitutifs alors que d'autres sont induits. A cause de l'adaptation des agents pathogènes aux structures passives de défense, les plantes ont développé une diversité de molécules bioactives, nouvelles et différentes pour se protéger des organismes nuisibles (Arnason et Bernard, 2010).

1.1. Défenses passives

Pour accéder aux nutriments ou à la machinerie cellulaire de l'hôte végétal, les agents pathogènes doivent d'abord rompre les barrières naturelles des plantes qui constituent des défenses structurelles pré-invasives. Ces barrières peuvent être physiques (la cuticule, la paroi cellulaire, l'ouverture stomatique ou les lenticelles) ou chimique (y compris les composés inhibiteurs ou des composés stimulants nécessaires au développement des agents pathogènes). La cuticule et l'épaisseur de la paroi cellulaire peuvent influencer la résistance à certains agents pathogènes (van Kan, 2006 ; Mendgen et Deising, 1996).

Certains types de résistance « plantes adultes » pourraient être associés à une capacité réduite d'agents pathogènes de pénétrer par des parois cellulaires plus épaisses et plus dures. Certains pathogènes comme *Puccinia graminis* n'infectent que les jeunes feuilles de *Barbarea vulgaris*, avec des cuticules minces et les tubes germinatifs émergeant des basidiospores ne pénètrent pas par les cuticules des feuilles matures. L'âge de la plante au moment de l'infection influence grandement l'importance de l'invasion et des dégâts causés (Corbaz, 1998 ; 1990).

Les exsudats sur les surfaces des plantes ou des composés dans les cellules végétales peuvent stimuler ou inhiber le développement des agents pathogènes. Les plantes qui ne sécrètent pas certains stimulateurs de la germination des fructifications et des formes pathogènes peuvent être résistants (Howell et al., 1976).

1.2. Défenses actives

1.2.1. Renforcement de la paroi

Les modifications de la paroi cellulaire végétale est un important mécanisme de défense qui intervient dans la réponse de défense des plantes et constitue un obstacle efficace contre les agents pathogènes (Hancock et *al.*, 2002 ; Heil et Bostock, 2002 ; Christian et Somerville, 2009).

Le renforcement de la paroi cellulaire implique l'accumulation des composés phénoliques, des ROS et des dépôts de callose au niveau des sites de pénétration, rendant la paroi cellulaire moins vulnérable à la dégradation. Le callose est un polymère β -(1,3)-glucane de haut poids moléculaire qui est habituellement associé avec des composés phénoliques, des polysaccharides, des protéines antimicrobiennes et avec des appositions de paroi cellulaire, appelées papilles, qui sont proposées comme des barrières efficaces qui sont induites aux sites d'attaque des pathogènes (Ton et *al.*, 2004). Les dépôts formés sont riches en papilles, ce qui épaisse la paroi cellulaire des plantes, qui sont composés essentiellement de callose (β -1,3 glucane), impliqués dans plusieurs processus fondamentaux du développement des plantes. Les papilles ne peuvent pas arrêter complètement les pathogènes, mais peuvent ralentir l'invasion de l'agent pathogène (Christian et Somerville, 2009).

1.2.2. Espèces réactives d'oxygène

La stimulation du métabolisme oxydatif dans les cellules végétales est une forme de défense induite à la suite des attaques par les agents pathogènes. La production des espèces réactives d'oxygène (ROS : reactive oxygen species) est l'une des réponses les plus précoces des cellules végétales après la reconnaissance des pathogènes et est impliquée dans le renforcement de la paroi cellulaire via la réticulation des glycoprotéines, la signalisation de défense et l'induction de la réponse hypersensible (Levine et *al.*, 1994 ; Torres et *al.*, 2006 ; Liu et *al.*, 2010). Les ROS présentent une toxicité directe vis-à-vis des pathogènes que sur les cellules végétales. L'inhibition du pathogène par ces espèces est possible, notamment lorsque la concentration endogène des ROS est avoisinante à la dose létale de l'agent pathogène (Lepoivre, 2003).

1.2.3. Phytoalexines

Les phytoalexines sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire (Macheix et *al.*, 2005), présentant une activité antimicrobienne nette et sont synthétisées à la suite d'une attaque par un agent pathogène (Heil et Bostock, 2002 ; Mert-Türk, 2002 ; Macheix et *al.*, 2005 ; Flors et Nonell, 2006). Les propriétés antimicrobiennes des phytoalexines suggèrent qu'elles sont importantes dans la défense des plantes. Le rôle de ces composés dans la défense a été révélé à travers plusieurs approches expérimentales : le niveau des phytoalexines par rapport à la cessation de la croissance des agents pathogènes, la quantification des phytoalexines au niveau du site de l'infection et la relation de la virulence du pathogène à la tolérance des phytoalexines (Mert-Türk, 2002).

Parmi les phytoalexines phénoliques on trouve : les coumarines, les ptérocarpanes et les stilbenes. La nature des phytoalexines produites par la plante est généralement caractéristique de l'espèce végétale indépendamment de l'agent pathogène inducteur (Macheix et *al.*, 2005). Ces métabolites représentent un moyen très économique pour se défendre, du fait que le carbone et les ressources énergétiques ne sont renvoyés vers la synthèse des phytoalexines, que lors d'une attaque par des agents pathogènes (Flors et Nonell, 2006).

1.2.4. Protéines PRs (Pathogenesis-Related)

Plusieurs protéines sont impliquées dans la stratégie de défense des plantes. Les protéines PRs constituent un groupe induit par différents stimuli (Tableau 1). Ces protéines occupent un rôle important dans la résistance des plantes et leur adaptation aux stress (Edreva et *al.*, 2005). Elles s'accumulent dans les tissus des plantes à la suite d'une attaque par les pathogènes (Lepoivre, 2003 ; Gomez-Ariza et *al.*, 2007).

Les protéines PRs ont été signalées initialement chez les feuilles de tabac infectées par le virus de la mosaïque. Le groupe de ces protéines comprend des enzymes hydrolytiques : les protéines PR-2 (la glucanase) et PR-3 (la chitinase) (Ding et *al.*, 2001 ; Elvira et *al.*, 2008). Ainsi que d'autres types comme : PR-5 (osmotin-like protein) et PR-16 (germin-like protein) (Elvira et *al.*, 2008).

Tableau 1: Famille des protéines PRs (pathogenesis-related proteins) (van Loon et al., 2006).

Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Cbia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Cbid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatococin-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	Tomato <i>P₆₉</i>	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Cbib</i>
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Tbi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown	<i>Ypr17</i>

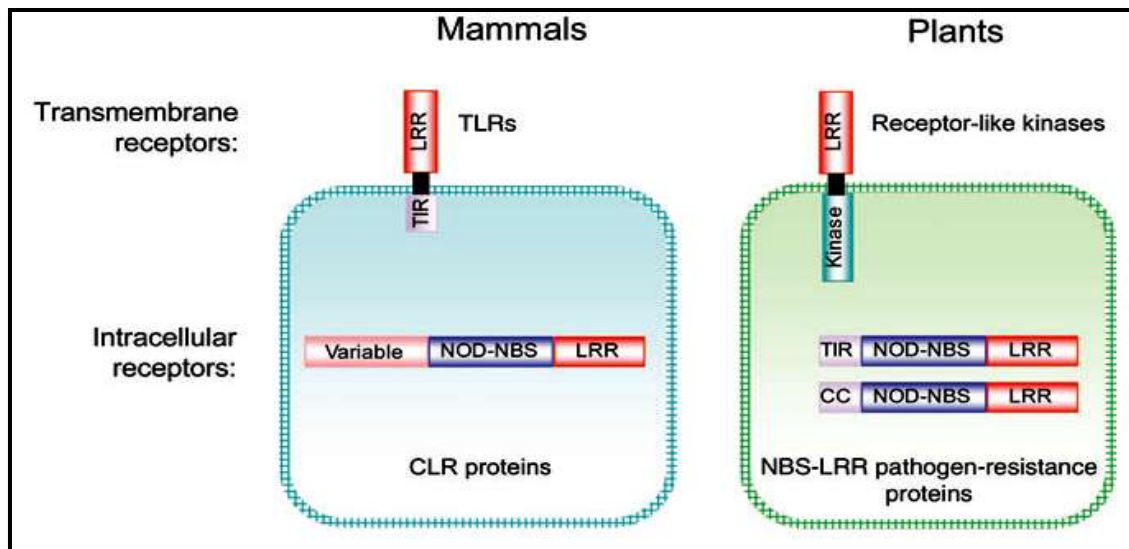
Further details can be found at <http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PR-families.htm>.

2. Types de Résistances des plantes

2.1. Résistance non hôte (Reconnaissance non-spécifique)

Plusieurs déterminants génétiques (éliciteurs ou effecteurs) chez les pathogènes ou chez les plantes peuvent influencer la nature de leur interaction (Prell et Day, 2001). Il a été montré que les plantes répondent similairement qu'au animaux et possèdent une résistance basale, une composante du système immunitaire inné, qui leur permet de se défendre contre les organismes pathogènes (Szatmari et al., 2006 ; Wiesel et al., 2014).

Bien que l'immunité adaptative soit spécifique chez les vertébrés, la réponse immunitaire innée semble avoir des origines très anciennes. Les caractéristiques communes de l'immunité innée chez les mammifères et les plantes sont présentées comme des similarités au niveau des récepteurs (Microbe Associated Molecules), le processus de signalisation (mitogen-associated protein kinase) et la production de peptides antimicrobiens (Fig. 1) (Ausubel et al., 2005).



Les récepteurs TLRs (animal) et les récepteurs kinases (plante) sont similaires dans la structure globale comme le sont tous les récepteurs transmembranaires au niveau de la partie C-terminal LRRs (Leucine-Rich Repeats). Cependant, les domaines cytoplasmiques ne sont pas conservés. Chez les plantes et les animaux, les récepteurs extracellulaires reconnaissent des déterminants microbiens hautement conservés (microbe-associated molecular) comme les flagellines bactériens (Ausubel et *al.*, 2005).

Figure 1 : Les récepteurs PRRs (pattern recognition receptor) extracellulaire et intracellulaire chez les plantes et les animaux.

La résistance totale d'une espèce végétale vis-à-vis de toutes les souches d'une espèce pathogène est désignée par la résistance non hôte (Holub et Cooper, 2004 ; Muthamilarasan et Prasad, 2013; Wiesel et *al.*, 2014). Cette résistance décrit l'immunité entière d'une plante vis-à-vis des espèces pathogènes non adaptées (Lipka et *al.*, 2005). La résistance non hôte constitue la forme la plus durable, qui est exprimée chez les plantes vis-à-vis de la majorité des micro-organismes potentiellement pathogènes (Mysore et Ryu, 2003 ; Nürnberger et *al.*, 2004 ; Nürnberger et Lipka, 2005). Dans ce cas, les agents pathogènes ne réussissent jamais à établir l'envahissement de la plante et l'expression de la maladie (Prell et Day, 2001; Holub et Cooper, 2004). La résistance non-hôte pourrait être due, entre autre à l'inefficacité d'effecteurs du pathogène (Jones et Dangl, 2006 ; Zellerhoff et *al.*, 2010).

La résistance non-spécifique de l'hôte est basée sur la reconnaissance d'éliciteurs généraux communs pour de nombreux agents pathogènes (Keen, 1975 ; Ingle et *al.*, 2006). Cette reconnaissance consiste en la perception des molécules microbiennes conservées dénommées Pathogen ou Microbe-Associated Molecular Patterns (PAMPs/MAMPs). Bien que les immunologistes utilisent couramment le terme PAMP mais le terme MAMP est considéré comme plus précis, car ils ne sont pas réservés seulement aux agents pathogènes (Ausubel, 2005). Les MAMPs sont constitutivement présents chez les microorganismes par ce

qu'ils sont considérés comme principaux composants structuraux des cellules microbiennes et de la motilité bactérienne (Egusa et *al.*, 2009).

Les MAMPs comprennent, chez les bactéries : la flagelline, les lipopolysaccharides (Ingle et *al.*, 2006 ; Mishina et Zeier, 2007) et le facteur d'élongation Tu (EF-Tu) (Ingle et *al.*, 2006). Chez les champignons : La chitine, β -glucane et l'ergostérol (Ingle et *al.*, 2006). Ces éliciteurs sont reconnus par des récepteurs spécifiques : Pattern-Recognition Receptors (PRR). Le manque de perception des PAMPs chez les plantes conduit à leur sensibilité aux parasites, ce qui démontre l'importance de la reconnaissance des PAMPs dans l'induction de la résistance contre les agents pathogènes (Schwessinger et Zipfel, 2008 ; Zipfel, 2008). Cette reconnaissance conduit à des événements de signalisation déclenchant les capacités défensives innées (Chisholm et *al.*, 2006; Ingle et *al.*, 2006; Schwessinger et Zipfel, 2008 ; Zipfel, 2008). L'efficacité de cette immunité réside dans la systémisation et la circulation de la résistance (Van Wees et *al.*, 2008).

Le modèle en Zig-zag illustre le système immunitaire des plantes selon Jones et Dangl, (2006). En phase (1), la plante détecte les éliciteurs M/PAMPs par les récepteurs PRR, ce qui déclenche la PTI (PAMP triggered Immunity), la résistance basale. En phase (2), les agents pathogènes délivrent des effecteurs qui interfèrent avec la PTI, il en résulte une sensibilité : ETS (Effector triggered sensitivity) et le développement de la maladie. En phase (3), un effecteur est reconnu par une protéine de résistance, activant alors une résistance spécifique : ETI (Effector triggered Immunity). En phase (4), des races de l'agent pathogène ayant modifiées leurs effecteurs et/ou acquis de nouveaux effecteurs, permettant d'annuler l'ETI, ce qui mène au développement de la maladie (ETS). En phase (5), de nouvelles protéines de résistance pourront reconnaître les nouveaux effecteurs, entraînant alors à nouveau l'induction de l'ETI (Fig. 2).

Le terme éliciteur a été utilisé pour décrire toute molécule capable d'induire la production des phytoalexines (Keen, 1975), puis il a été étendu à l'ensemble des molécules qui induisent les réactions de défense chez les plantes (Montesano et *al.*, 2003). Les éliciteurs peuvent avoir une origine microbienne (éliciteurs exogènes), des constituants de surface cellulaire ou des molécules sécrétées, ou bien peuvent provenir de la dégradation de la paroi cellulaire végétale sous l'action des enzymes hydrolytiques de l'agent pathogène (éliciteurs endogènes) (Fig. 3) (Montesano et *al.*, 2003).

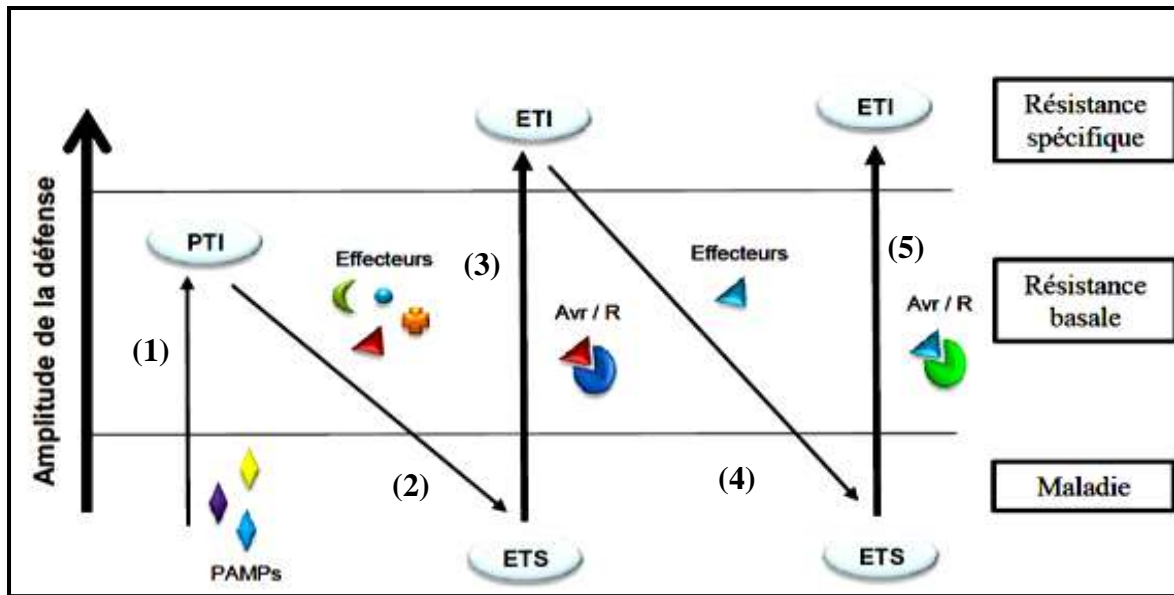
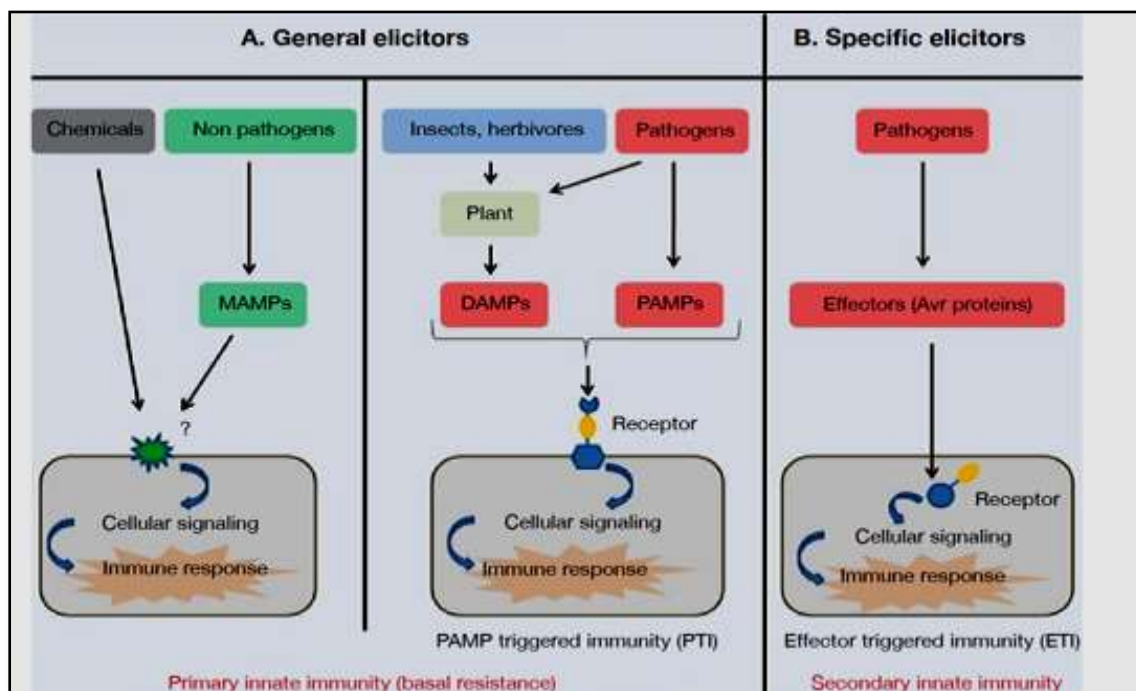


Figure 2 : Modèle en Zig-zag illustrant le système immunitaire des plantes (Jones et Dangl, 2006).



A) Les éliciteurs généraux (non spécifiques) sont impliqués dans l'immunité innée (primaire). Ils comprennent les Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs) issus de micro-organismes non pathogènes, Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) issus des surfaces des plantes suite à l'action de l'invasisseur et Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) issus des micro-organismes pathogènes. **B)** Les éliciteurs spécifiques (ou effecteurs) sont issus des pathogènes spécifiques et agissent uniquement chez les cultivars de plantes possédant le gène de résistance correspondant. Les effecteurs conduisent typiquement à l'immunité innée secondaire après une perception dépendante de récepteur intracellulaire (Henry et *al.*, 2012).

Figure 3 : Eliciteurs des plantes.

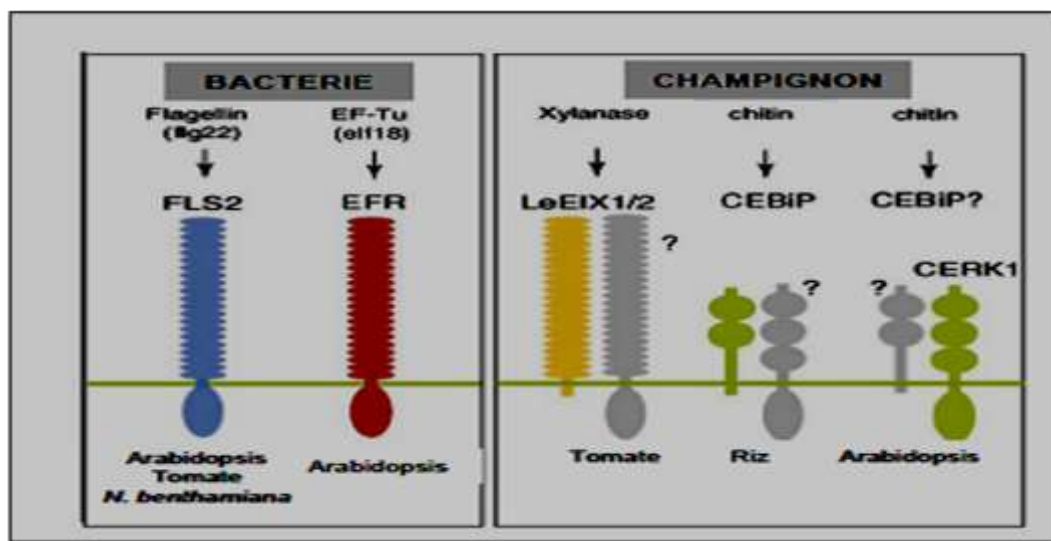
La notion d'éliciteur a ensuite évolué vers celle de PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) (Medzhitov et Janeway, 1997). Le terme PAMP a été introduit pour décrire des motifs présents dans des molécules d'origine microbienne, capables de déclencher les réactions de défense de la plante. De telles molécules sont souvent indispensables à la pathogénicité et à la survie de l'agent pathogène (McGuinness et *al.*, 2003). Les PAMPs, actuellement connus, sont de nature polysaccharidique et sont représentés respectivement par les oligomères de β -glucanes communs aux parois végétales et fongiques, les oligomères de chitine ou de chitosan présents dans les parois des champignons et des insectes et enfin, les oligogalacturonates des parois végétales (Shibuya et Minami, 2001). Ces éliciteurs appartiennent à plusieurs familles chimiques : protéines, glycoprotéines, glycanes et lipides (Tableau 2) (Ebel et Cosio, 1994).

Plusieurs PAMPs de nature protéiques ont été identifiés d'où le plus connu d'entre eux est un peptide de 22 acides aminés (flg22) contenu dans la flagelline, protéine majeure constituant les flagelles des bactéries (Zipfel et *al.*, 2008). Cette protéine est reconnue chez les plantes par un récepteur like-kinase (RLK) appelé FLS2 (flagellin-sensing locus2) (Gomez-Gomez et Boller, 2002). FLS2 est une protéine transmembranaire avec un domaine protéine kinase intracytoplasmique et un domaine LRR (Leucine Rich Repeat) extracytoplasmique (Fig. 4) (Gomez-Gomez et Boller, 2002).

Indirectement, les plantes peuvent également détecter la présence d'agents pathogènes par la perception de composés endogènes qui sont libérés à partir de leurs barrières structurelles ou d'autres macromolécules par des enzymes lytiques produites par l'envahisseur ou par l'hôte lui-même. Ces molécules, appelées DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) apparaissent généralement dans l'apoplaste et peuvent donc avoir le même effet que les PAMPs et jouent le rôle de signal afin d'induire l'immunité innée. Par exemple, les oligogalacturonides sont libérés par des enzymes microbiennes reconnues par le récepteur de WAK1 (D'Ovidio et *al.*, 2004). L'émission de ces signaux endogènes permet aux cellules blessées de communiquer et favorisent la systémisation du signal. De même, le peptide 23-AtPep1 est libéré par des précurseurs de protéines en réponse à la blessure et déclenche une réponse immunitaire innée chez *Arabidopsis* via la reconnaissance par le récepteur PEPR1 (Yamaguchi et *al.*, 2006).

2.2. Résistance hôte (Reconnaissance spécifique)

Durant la coévolution entre les plantes et les microbes, les agents pathogènes ont acquis la capacité de surmonter la résistance non-hôte par l'injection des protéines effectrices dans les cellules végétales, ce qui annule la PTI (PAMP-triggered immunity) et favorise la croissance des pathogènes et le développement de la maladie (Chisholm et al., 2006 ; Göhre et Robatzek, 2008).



La flagelline bactérienne (flg22) et EF-Tu sont reconnus par les récepteurs LRR-RLK FLS2 et EFR respectivement. La xylanase est reconnue par les RLP LeEIX1 et LeEIX2. Le récepteur de la chitine chez le riz est une protéine transmembranaire CeBiP contenant 2 domaines. Chez *Arabidopsis*, le LRR-RLK CERK1 reconnaît la chitine PRRs (D'après Zipfel, 2008).

Figure 4 : Perception des PAMPs chez les plantes par des récepteurs.

Les effecteurs ciblent les composants spécifiques de la régulation du système immunitaire basal (Ingle et al., 2006). Les protéines effectrices sont injectées dans l'apoplaste ou directement dans le cytoplasme des cellules de la plante hôte, menant à une réaction dite : Effector-Triggered Susceptibility (ETS) (Chisholm et al., 2006 ; Göhre et Robatzek, 2008). Lorsque les parasites sont capables de franchir les barrières de la reconnaissance non spécifique (Prell et Day, 2001), et en réponse à la sécrétion des protéines effectrices, certains cultivars ont développé des protéines de résistance (R) (Chisholm et al., 2006 ; Ingle et al., 2006). Ces protéines reconnaissent des effecteurs particuliers, conduisant à un autre type d'immunité : effector-triggered immunity (ETI) (Figs. 2, 5) (Chisholm et al., 2006). Il s'agit d'une reconnaissance spécifique entre les produits du gène de résistance (R) dominant chez la plante hôte et les produits du gène d'avirulence (Avr) dominant chez le pathogène (Lauge et

al., 1998 ; Mahé et *al.*, 2009), d'où le concept « gène pour gène » de Flor . Il s'agit du deuxième niveau de reconnaissance chez les plantes, lorsque les parasites sont capables de franchir les barrières de la reconnaissance non-spécifique. Elle est liée à la détection spécifique de certaines races, appartenant à une espèce pathogène, par certaines variétés, appartenant à une espèce de plante hôte. Selon Flor la résistance spécifique de race et de cultivar ne dépend en général que d'un seul gène dans chaque partenaire (Flor, 1955 et 1971).

La reconnaissance Avr-R conduit à une réaction d'hypersensibilité (RH) au niveau du site d'infection, ce qui isole le pathogène des autres parties de la plante hôte (Durand-Tardif et Pelletier, 2003 ; Lauge et *al.*, 1998 ; Mahé et *al.*, 2009). La RH est une forme de mort cellulaire programmée génétiquement, mise en place de façon très rapide ; cette réaction limite la zone infectée par l'agent pathogène. Deux rôles sont attribués à cette réponse de défense. D'une part, la mort des cellules végétales entourant l'agent pathogène perturbera considérablement le développement de ce dernier. En effet, celui-ci se retrouve dans un milieu dépourvu d'éléments nutritifs, au pH et à une hygrométrie défavorables, et contenant des composés toxiques libérés suite à la mort des cellules. Cependant, ces conditions sont favorables à l'invasion par certains agents pathogènes nécrotrophes comme *Botrytis*. D'autre part, la RH joue un rôle de signal d'alarme, en informant les autres parties de la plante de l'attaque. Ce signal généré lors de la RH se propage à l'ensemble de la plante, permettant la mise en place de la défense systémique (Govrin et Levine, 2002).

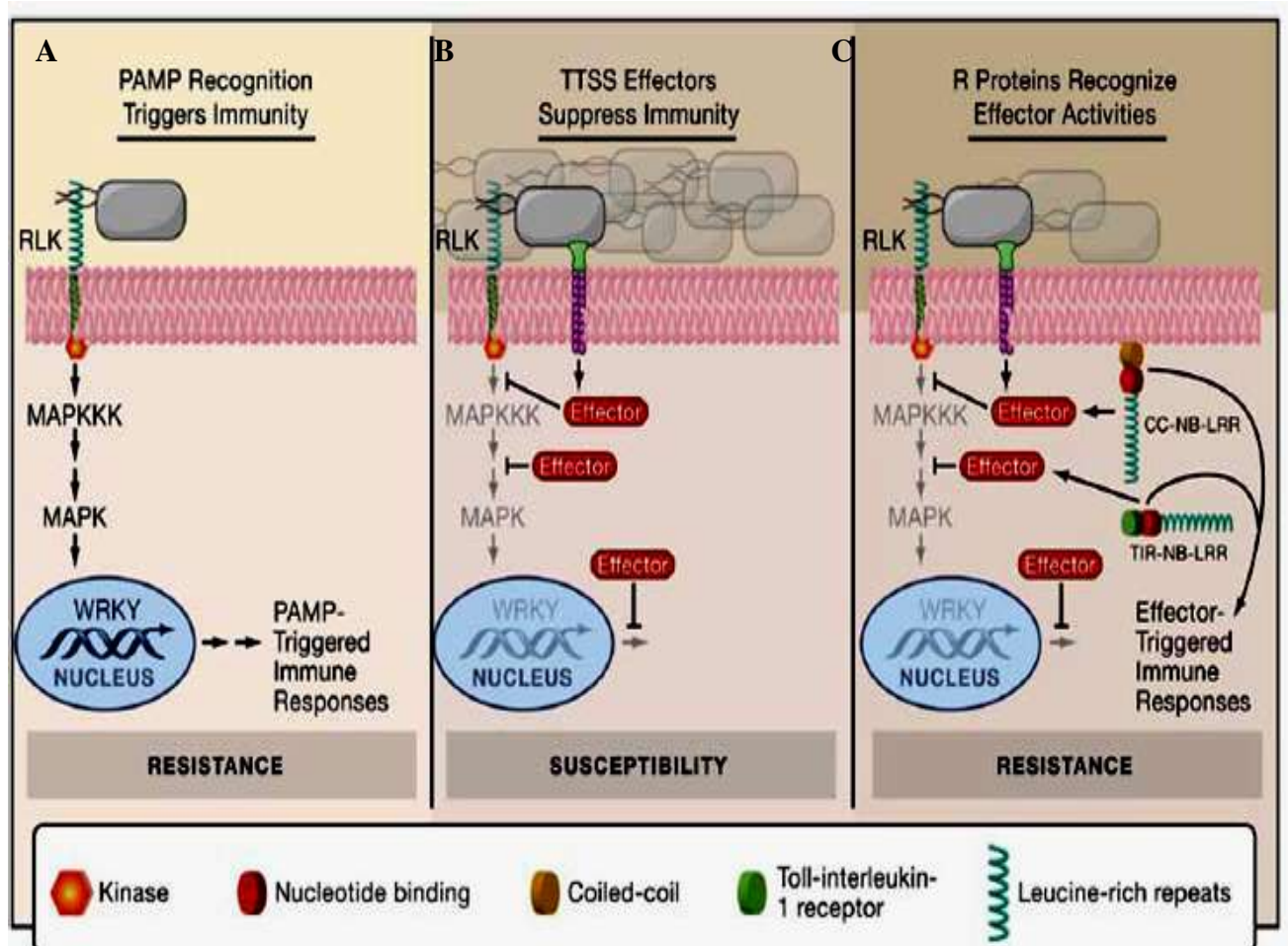
La RH donne lieu à une cascade de signaux, activant une résistance générale et non spécifique chez la plante hôte dite systémique, c'est la résistance systémique acquise (Systemic Acquired Resistance, SAR) (Durrant et Dong, 2004). Cette résistance permet à la plante de stimuler ses propres mécanismes de défense et est généralement activée à la suite d'une infection primaire par un agent pathogène nécrotrophe (Lepoivre, 2003).

Le concept de la SAR, en raison de son importance a été largement étudié afin de développer la résistance des plantes cultivées aux maladies fongiques, bactériennes et virales (Percival, 2001 ; Pieterse, 2014). La résistance hôte peut activer des mécanismes de défense hautement spécifiques vis-à-vis de l'agent pathogène. Il s'agit du deuxième niveau de reconnaissance chez les plantes. Elle est liée à la détection spécifique de races pathogènes par des variétés des plantes hôtes, c'est la résistance spécifique race/cultivar (Prell et Day, 2001).

Tableau 2 : Origine et nature des éliciteurs (Ebel et Cosio, 1994).

Origine	Eliciteur (composants)	Efficace contre	Effets sur plantes
Plantes	Oligogalacturonides	<i>Botrytis cinerea, Blumeria graminis</i>	Plusieurs
	Milsana	<i>Botrytis cinerea, Leveillula taurica</i>	Concombre, tomate
	Eliciteur peptide 1	<i>Cochliobolus heterostrophus, Colletotrichum graminicola</i>	Maïs
	Carrageenans	<i>Scierotina scierotiorum</i>	<i>A thaliana</i> , tabac
	Fucans	TMV	Tabac
	Uvans	Plusieurs	Plusieurs
	Laminrine	<i>Erwinia carotovora, Plasmopara viticola, Botrytis cinerea, Fusarium solani</i>	Tabac
Bacteries	Harpine	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Riz
	Lipopeptides	<i>Botrytis cinerea</i>	Tomate
	Dilethyisulfide	<i>Cochliobolus heterostrophus, Botrytis cinerea</i>	Maïs, tabac
	Pseudobactine	<i>Botrytis cinerea, Erwinia, carotovora</i>	plusieurs
Oomycetes	Cryptogéine	<i>Phytophthora parasitica, Sclerotinia sclerotiorum</i>	Tabac
	Acide Eicosapentaénoïque	<i>Phytophthora infestans</i>	Pomme de terre
	Pep-13	<i>Phytophthora</i> spp.	Pomme de terre
	INF1	<i>Phytophthora infestans</i>	Tabac
Champignons	B –glucane	Plusieurs	Plusieurs
	Chitosane	Plusieurs	Plusieurs
	Chitine	Plusieurs	Plusieurs
	Ergosterol	<i>Botrytis cinerea</i>	Tabac
	Xylanases , peptaibole, cerato-platanine	<i>Pseudomonas syringae, Botrytis cinerea, Colletotrichum graminicola</i>	<i>A thaliana</i> , maïs

Les gènes d'avirulence codent pour des protéines qui possèdent une activité élicitrice spécifique aux cultivars de plantes qui possèdent les récepteurs race-spécifique correspondants (Montesano et *al.*, 2003). Les protéines d'avirulence peuvent être considérées comme des effecteurs en raison de leur rôle dans le pouvoir pathogène des microorganismes (Gohre et Robatzek, 2008). De nombreux gènes d'avirulence ont été isolés chez les champignons, les bactéries, les virus et les oomycètes. Dans le cas des bactéries, ils sont actifs directement dans le cytoplasme des cellules végétales grâce au système de sécrétion de type III (Espinosa et Alfano, 2004). Dans le cas des champignons, elles sont majoritairement sécrétées de façon extracellulaire (Nimchuk et *al.*, 2000).



A. La reconnaissance des PAMPs par les récepteurs végétaux (partie extra-cellulaire) (RLK, receptor-like kinase) déclenche la résistance basale ou PTI (PAMP-Triggered Immunity). Celle-ci implique l'activation de la cascade MAP kinases (Mitogen activated proteins) et une reprogrammation transcriptionnelle.

B. Les bactéries phytopathogènes utilisent le système de sécrétion de type III pour libérer leurs effecteurs dans la cellule hôte ; menant à une situation de sensibilité.

C. Les protéines de résistance perçoivent les effecteurs dans la cellule et activent la résistance spécifique ou ETI (Effector-Triggered Immunity) (Chisholm et *al.*, 2006).

Figure 5 : Modèle de mise en évidence de la résistance des plantes face aux bactéries.

2.3. Résistance systémique induite

La résistance induite par les PGPRs peut être considérée comme une "vaccination" systémique qui réduit la sensibilité des plantes aux pathogènes (Kloepper et al., 2004; Ongena et Thonart, 2006 ; Bakker et al., 2007; Rudrappa et al., 2010). Elle a été vérifiée par l'inoculation du pathogène et des PGPRs spatialement séparés. Par exemple, les bactéries au niveau des racines et le pathogène sur les feuilles, ou par l'utilisation des systèmes racinaires en split, afin d'éviter toute interaction physique entre les deux agents (Bakker et al., 2007. Benchabane et al., 2000 ; Boukerma, 2012). L'ISR a été mise en évidence chez l'œillet (*Dianthus caryophyllus*), après la colonisation racinaire avec *Pseudomonas fluorescens* WCS417, les plants d'œillet ont développé une résistance contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Cette résistance systémique a été illustrée contre les champignons, les bactéries et les virus chez plusieurs plantes (van Loon et al., 1998).

La résistance systémique induite est phénotypiquement similaire à la résistance systémique acquise (van Loon et al., 1998 ; van Wees et al., 1999 ; Jourdan et al., 2008), tout comme dans le cas de la SAR, les réactions de défense de l'ISR permettent de mieux se défendre vis-à-vis d'une agression ultérieure. L'activation simultanée de la SAR et de l'ISR offre une capacité défensive renforcée en comparaison à chaque type de résistance unique (van Wees et al., 2000). Ces deux types de résistances induites sont efficaces contre un large spectre d'agents pathogènes (Ton et al., 2001, 2002 ; Yan et al., 2002). L'expression phénotypique de l'ISR peut être divisée en quatre étapes principales (Jourdan et al., 2008).

- La perception par la plante des molécules bactériennes responsables de l'élicitation de l'ISR ;
- La transmission du signal nécessaire à la systémisation du phénomène chez la plante ;
- La mise en alerte (priming) de la plante au niveau systémique, qui dans la plupart des cas n'est pas accompagnée de grandes modifications de l'activité transcriptionnelle avant l'attaque du pathogène ;
- Lors de l'agression par l'agent pathogène, l'expression du ou des mécanisme (s) de défense, permettant de limiter voire d'inhiber la pénétration du pathogène dans les tissus de l'hôte végétal.

2.3.1. Déterminants bactériens

L'induction de la résistance systémique par les PGPRs est basée sur la reconnaissance spécifique entre des éliciteurs rhizobactériens et la plante (Pieterse et *al.*, 2001 ; van Loon et *al.*, 2008). Ces rhizobactéries possèdent une diversité de molécules élicitrices de l'ISR ; si un déterminant ne parvient pas à provoquer la résistance systémique, ou n'est pas produit selon certaines conditions, d'autres caractères peuvent être efficaces. Dans de tels cas, ces divers déterminants peuvent être différemment régulés (Bakker et *al.*, 2007). Les molécules élicitrices de la résistance peuvent être soit des composants de la surface cellulaire bactérienne, soit des métabolites excrétés par les PGPRs (van der Ent et *al.*, 2009a). Globalement, les déterminants bactériens sont classés en des composants de la surface cellulaire et des métabolites excrétés.

2.3.1.1. Lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif sont des molécules clés, jouant de multiples rôles dans les interactions plantes-microbes. La perception des LPS par les cellules végétales déclenche les réactions de défense ou la mise en alerte des plantes (Molinaro et *al.*, 2009). Chez *A. thaliana*, les LPS des *Pseudomonas* spp. fluorescents semblent être impliqués dans l'induction de la résistance systémique vis-à-vis de *Pseudomonas. syringae* pv. *tomato* (Bakker et *al.*, 2003 ; Meziane et *al.*, 2005). Le rôle de ces déterminants bactériens a été mis en évidence chez les plantes d'œillet traitées avec des cellules soit viables, soit tuées par la chaleur ou encore avec des LPS isolés de *P. fluorescens* WCS417, après l'inoculation avec *Fusarium* spp. Une accumulation importante des phytoalexines a été détectée par rapport aux plantes témoins (Reitz et *al.*, 2000).

2.3.1.2. Flagelles

Les flagelles sont des structures rigides, constitués par la flagilline, responsables de la mobilité bactérienne (Baudry et Brézellec, 2006). Les flagelles de *P. putida* WCS358 sont impliqués dans la stimulation des capacités défensives végétale. Leur rôle a été étudié chez l'arabette, le haricot, la tomate en appliquant des flagelles isolés et en utilisant des mutants immobiles (Meziane et *al.*, 2005). La reconnaissance de la flagelline chez les plantes se réalise via le récepteur : flagelline-sensitive 2. Cette reconnaissance est spécifique, par

exemple *Arabidopsis* WS-0 est insensible à la flagelline des *Pseudomonas* (Gómez-Gómez et al., 1999).

2.3.1.3. Antibiotiques

En plus de leur rôle antimicrobien, les antibiotiques favorisent le déclenchement de la résistance systémique (Maurhofer et al., 1992 ; Fernando et al., 2005). Chez *Arabidopsis*, l'ISR vis-à-vis de *P. syringae* pv. *tomato* dépend du DAPG produit par *P. fluorescens* Q2-87 (Weller et al., 2004). L'importance de cet antibiotique dans la stimulation des réactions de défense a été mise en évidence par des mutants qui ne peuvent pas synthétiser le DAPG et ont montré leur incapacité à provoquer l'ISR (Iavicoli et al., 2003 ; Weller et al., 2004).

L'ISR peut être déclenchée en réponse à la perception de 2,4-diacetylphloroglucinol (PHL) (Iavicoli et al., 2003) et de l'acide cyanhydrique (HCN) (Jacques et al., 1993). Ongena et ses collaborateurs ont montré que les lipopeptides, les surfactines et les fengycines peuvent être impliqués dans l'élicitation de l'ISR (Ongena et al., 2007).

2.3.1.4. Substances volatiles

L'exposition des plantules d'*Arabidopsis* à un mélange de composés organiques volatiles de *Bacillus* spp. a réduit significativement la gravité de la maladie causée par *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* par rapport aux plants témoins. L'exposition à ces composés pendant moins de quatre heures a été suffisante pour activer l'ISR (Ryu et al., 2004).

2.3.1.5. Sidérophores

Chez de nombreux *Pseudomonas*, en plus de leur rôle dans la chélation du fer (Meyer et Abdallah, 1978; Alka et Murali, 2008), les sidérophores sont impliqués dans l'induction de la résistance systémique. L'action de ces métabolites dans l'ISR a été signalée chez *P. putida* WCS358, avec une bioprotection significative d'*Eucalyptus urophylla* vis-à-vis du flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) (Ran et al., 2005).

2.3.2. Voies de signalisation et systémisation de la résistance

Les éliciteurs des PGPRs ressemblent aux PAMPs d'origine bactérienne (van Loon et Bakker, 2006). De fortes homologues existent entre le mécanisme de perception des M/PAMPs, dérivés des pathogènes qui déclenchent la résistance basale (M/PAMP-triggered immunity) et le mécanisme de perception des éliciteurs rhizobactériens. Ceci suggère que les PGPRs sont également reconnus par un système immunitaire similaire (van der Ent et *al.*, 2009a).

La reconnaissance entre la plante et un micro-organisme ou l'un de ses composants enclenche la production d'une cascade de signaux et de messagers chimiques, qui à leur tour régulent les modifications de l'expression des gènes de défense (Klarzynski et Fritig, 2001). Ces modifications conduisent à l'expression d'une résistance systémique après avoir perçu un éliciteur au niveau local (Heil et Walters, 2009). La première réponse de cette reconnaissance est un ensemble de flux d'ions à travers la membrane plasmique et la production d'espèces réactives d'oxygène, suivie par l'activation séquentielle des gènes et l'accumulation de produits de défense (Jabs et *al.*, 1997).

Selon l'étude Bordiec, (2010), *Burkholderia phytofirmans* PsJN est capable de coloniser le système racinaire de la vigne. Tout d'abord, le contact des cellules de la vigne avec cette bactérie induit une alcalinisation du milieu, la libération des espèces réactives oxygénées et azotées, une expression des gènes de défense et l'accumulation de composés phénoliques. Les résultats obtenus démontrent que cette bactérie est perçue par les cellules de la vigne, engendrant une stimulation des réactions de défense. Par ailleurs, l'interaction entre la souche PsJN et la vigne confère à la plante une protection vis-à-vis de certains stress.

La reconnaissance de la flagelline flg22- FLS2 induit plusieurs réponses cellulaires comme l'alcalinisation du milieu extracellulaire, la production d'éthylène chez la tomate et le riz (Felix et *al.*, 1999), l'activation d'une cascade de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Asai et *al.*, 2002), et finalement l'induction rapide de la transcription de 1100 gènes chez *A. thaliana* (Zipfel et *al.*, 2004). FLS2 fait partie de la famille des PRR (Pattern Recognizing Receptor) des plantes qui comprend actuellement quatre autres récepteurs connus. EFR, un autre récepteur LRR-RLK (Leucine Rich Repeat – Receptor Like Kinase) reconnaît le PAMP bactérien (EF-Tu) (Zipfel et *al.*, 2006). Ces PRRs sont localisés au niveau de la membrane plasmique et sont susceptibles d'activer des cascades de signalisation impliquant des flux de Ca^{2+} et des MAPK qui induisent à leur tour des réactions de défense (Jones et Dangl, 2006).

2.3.2.1. Flux ioniques

La perception d'un éliciteur par les cellules végétales entraîne une dépolarisation membranaire rapide et transitoire, c'est un ensemble de flux d'ions à travers la membrane plasmique : influx de H^+ et de Ca^{2+} (Kadota et al., 2004). Cet influx a été également observé chez le tabac après avoir perçu d'éliciteurs de *P. putida* WCS358 et de *P. fluorescens* WCS417 (van Loon et al., 2008). De même, il a été signalé un efflux de Cl^- (Kikuyama et al., 1997 ; Kadota et al., 2004) et de K^+ (Bolwell et al., 1997 ; 2002).

2.3.2.2. Espèces réactives d'oxygène

Les plantes génèrent des espèces réactives d'oxygène (Reactive oxygen species, ROS) qui sont considérées comme des régulateurs clés de la croissance et du développement (Shetty et al., 2009). Ces espèces sont aussi produites au cours de l'interaction hôte-pathogène et participent dans les voies de signalisation des réactions de défense (Hancock et al., 2002 ; Shetty et al., 2009). Les espèces réactives les plus importantes sont : l'oxygène singulet (1O_2), le radical hydroxyperoxyl (HO_2), l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^\cdot) (Shetty et al., 2009). La production des ROS a été observée dans une suspension cellulaire de tabac à la suite de la reconnaissance d'éliciteurs de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Van Loon et al., 2008).

Les ROS sont synthétisées avec un niveau contrôlé qui mène à une réponse définie comme l'activation des protéines kinases et la régulation de l'expression des gènes. Ces espèces jouent un rôle clé dans l'orchestration de la résistance localisée (HR) (Hancock et al., 2002).

2.3.2.3. Phosphorylation et déphosphorylation

Le processus de phosphorylation et de déphosphorylation est un mécanisme commun de la transduction du signal chez les plantes qui relie la perception des signaux extracellulaires avec leurs réponses définitives. Les Mitogen-Activated Protéines kinase (MAPKs) constituent l'un des principaux systèmes de phosphorylation, que les plantes utilisent pour résister aux stress biotiques et abiotiques. Ce système est composé de plusieurs classes de kinase, ayant chacune un rôle différent dans la transduction du signal (Cvetkovska et al., 2005).

En cas d'un stimulus, Les MAPKs sont activés par les ROS qui sont impliquées dans l'activation de l'expression des gènes de défense. Une faible fonction des MAPK conduit à une régulation négative de la résistance aux agents pathogènes (Zhang et Klessig, 2001 ; Zhang et *al.*, 2007).

2.3.2.4. Signalisation hormonale

Les mécanismes de défense des plantes sont contrôlés par un réseau complexe des voies de signalisation, impliquant plusieurs régulateurs (Bruce et Pickett, 2007). Trois molécules signales clés sont responsables dans l'induction de la résistance chez les plantes : l'acide salicylique (AS), l'acide jasmonique (AJ) et l'éthylène (ET) (Pieterse et van Loon, 1999 ; Ton et *al.*, 2001, 2002 ; Kunkel et Brooks, 2002 ; Pieterse et van Loon, 2007 ; Jalloul et *al.*, 2009). Ces molécules sont impliquées dans deux principales voies de signalisation de défense contre les pathogènes : une voie AS-dépendante et une voie AS-indépendante, qui nécessite l'AJ et l'ET (Fig. 6). Ces voies fonctionnent de manière dépendante et sont influencées l'une par l'autre dans un réseau complexe d'interactions (Kunkel et Brooks, 2002).

L'interconnexion et la coordination entre ces voies de signalisation sont des éléments clés pour une expression optimisée de la résistance des plantes (Jalloul et *al.*, 2009). Les deux voies de signalisation, que ce soit dépendante ou indépendante de l'acide salicylique, confèrent une grande régulation potentielle pour l'activation de multiples mécanismes de résistance (Pieterse et van Loon, 1999). Les mécanismes de ces voies ne sont pas assez clairs et il reste encore beaucoup à comprendre et à illustrer.

Concernant la potentialisation des gènes, van Wees et ses collaborateurs (1999) ont testé l'expression des gènes connus liés à la défense chez *Arabidopsis* : les gènes de réponse à l'AS (*PR-1*, *PR-2*, et *PR-5*), le gène induit par l'ET (*Hel*), les gènes de réponse à l'ET et l'AJ (*ChiB* et *Pdf1.2*) et les gènes induits par l'AJ (*Atvsp*, *LOX1*, *Lox2*, *PAL1*, et *PIN2*). L'infection par le pathogène virulent *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 induit l'expression de la plupart des gènes testés. Le déclenchement de la SAR par la même souche avirulente du pathogène induit l'expression des gènes inductibles par l'AS. L'ISR ne potentialise qu'un seul gène induit par l'acide jasmonique. Les autres gènes sensibles à l'AJ n'ont pas été potentialisés, ce qui suggère que l'ISR n'active que certains gènes spécifiques.

Chez *Arabidopsis* l'expression de l'ISR par *Pseudomonas fluorescens* WCS417r exige l'existence d'un locus désigné *ISR1* (Pieterse et *al.*, 2001). L'analyse des feuilles

d'*Arabidopsis* après la colonisation des racines avec *P. fluorescens* WCS417r, montre une amélioration de la capacité à convertir le précurseur de l'éthylène (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) en l'éthylène. Cette amélioration mène à une expression potentialisée des gènes sensibles à l'éthylène (*Pdf1.2* et *Hel*) (Hase et al., 2003).

2.3.2.4.1. Voie dépendante de l'acide salicylique

L'acide salicylique est un régulateur clé de la SAR, l'induction de cette résistance nécessite l'accumulation de l'AS (Ton et al., 2001, 2002 ; Yan et al., 2002). L'importance de cette accumulation a été démontrée par l'utilisation des plantes transgéniques NahG, qui expriment le gène salicylate hydroxylase *nahG* bactérien, rendant les plantes incapables d'accumuler l'AS. Dans ce cas, les plantes NahG ne peuvent pas déclencher la SAR (Gaffney et al., 1993 ; Ryals et al., 1996). L'application exogène de l'AS, ou d'un de ses analogues : BTH (benzothiadiazole) ou INA (2,6- acide dichloroisonicotinique) conduit à l'induction de la SAR. De même, l'utilisation des mutants qui ne peuvent pas synthétiser l'AS : *sid1* et *sid2* à confirmer l'indispensabilité de l'AS pour la stimulation de la SAR (Wildermuth et al., 2001). Cette résistance n'est pas efficace contre tous les pathogènes, par exemple, elle n'est pas significative contre *Botrytis cinerea* ou *Alternaria alternata* (Ryals et al., 1996).

2.3.2.4.2. Voie indépendante de l'acide salicylique

La recherche sur les voies de signalisation de défense qui sont activées par les PGPRs a révélé que l'AJ et l' ET sont des acteurs primordiaux qui pilotent l'ISR. Le rôle de ces molécules a été démontré chez *Arabidopsis thaliana* avec *P. fluorescens* (Pozo et al., 2008 ; Ton et al., 2001, 2002 ; Yan et al., 2002 ; Van der Ent et al., 2009b) et chez le riz (Vleesschauwer et al., 2008). Certaines rhizobactéries peuvent activer la voie de l'AS-dépendante en produisant de l'AS sur la surface racinaire (Pieterse et al., 2001), ce qui augmente l'efficacité de l'ISR (Lepoivre, 2003 ; Bakker et al., 2007). L'analyse du niveau local et systémique de l'acide jasmonique et de l'éthylène a démontré que l'ISR n'est pas associée à un changement de la teneur de ces molécules signales, ce qui indique que l'ISR n'induit pas la synthèse de ces phytohormones (Pieterse et al., 2000). Plusieurs études suggèrent que le rôle de l'AJ et l'ET dans l'ISR est basé sur une sensibilité accrue à ces hormones, plutôt que sur une augmentation de leur production (Pieterse et al., 2001 ; Verhagen et al., 2004 ; Tuzun et Bent, 2006). Il a été montré que *Pseudomonas fluorescens* WCS417r est incapable d'élucider l'ISR chez les mutants d'*Arabidopsis* de réponse à l'AJ :

jar1 (*jasmonic acid resistant1*), *eds8* (*enhanced disease susceptibility*) et *coi1* (*coronatine insensitive1*) (Pieterse et al., 1998 ; Ton et al., 2002 ; Pozo et al., 2008) et des mutants de réponse à l'ET : *etr1* (*ethylene response 1*) et *ein2* (*ethylene insensitive 2*) (Pieterse et al., 1998). L'ISR est stimulée chez les plantes NahG, montrant que ce phénomène est indépendant de l'AS (Pieterse et al., 2001).

2.3.2.5. NPR1 (Non-Expressor of Pathogenesis-Related Genes1)

Les NPR1 sont des cofacteurs responsables de la reprogrammation transcriptionnelle du génome végétal induite par les phytopathogènes (Shearer et al., 2009). Les NPR1 activent la transcription des protéines de défense PRs (Pathogenesis-Related) (Cao et al., 1994). La surexpression de ces protéines renforce la résistance des plantes aux maladies (Friedrich et al., 2001). Il a été constaté que l'ISR exige les NPR1, qui sont impliqués dans la perception de plus d'un signal (Pieterse et al., 2001). De même pour la SAR mais leur rôle n'est pas identique (van Wees et al., 2000), ce qui suggère que les NPR1 sont nécessaires dans la régulation et la connexion entre les voies des défenses induites (Fig. 6) (Dong, 2004 ; Pieterse et van Loon, 2007 ; Pieterse et al., 2009). L'action des NPR1 est liée à une régulation dans le noyau pour l'expression de la SAR (Dong, 2004), par contre, le rôle de ces protéines dans la voie de signalisation dépendante de l'AJ et l'ET est attribué à une fonction cytosolique (Stein et al., 2008). Toutefois, le mécanisme moléculaire exacte par lequel les NPR1 exercent leur rôle dans la voie AJ/ET reste à élucider (Van der Ent et al., 2009b).

2.3.3. Priming (Mise en alerte)

Une caractéristique commune de la résistance systémique élicitée par les rhizobactéries est le priming : la potentialisation des réponses de défense (Fig. 7) (Conrath et al., 2002 ; Goellner et Conrath, 2008 ; Pavlo et al., 2010 ; Tonelli et al., 2011). Priming est un état physiologique qui permet aux plantes d'exprimer plus rapidement et efficacement leurs propres réactions de défense et d'économiser leur énergie (Beckers et Conrath, 2007 ; Ton et al., 2009 ; Van der Ent et al., 2009b ; Pavlo et al., 2010). Cet aspect a été associé à différentes formes de résistances aux situations de stress rencontrées (Figs. 7, 8) (Bruce et Pickett, 2007 ; Ton et al., 2009). La mise en alerte peut se déclencher à la suite d'une attaque par un pathogène nécrotrophe ou encore par un traitement avec des composants naturels ou synthétiques. Bien que ce phénomène soit connu depuis des années, il n'a été valorisé et

étudié que tardivement par rapport aux autres mécanismes (Beckers et Conrath, 2007 ; van der Ent et *al.*, 2009b ; Pavlo et *al.*, 2010).

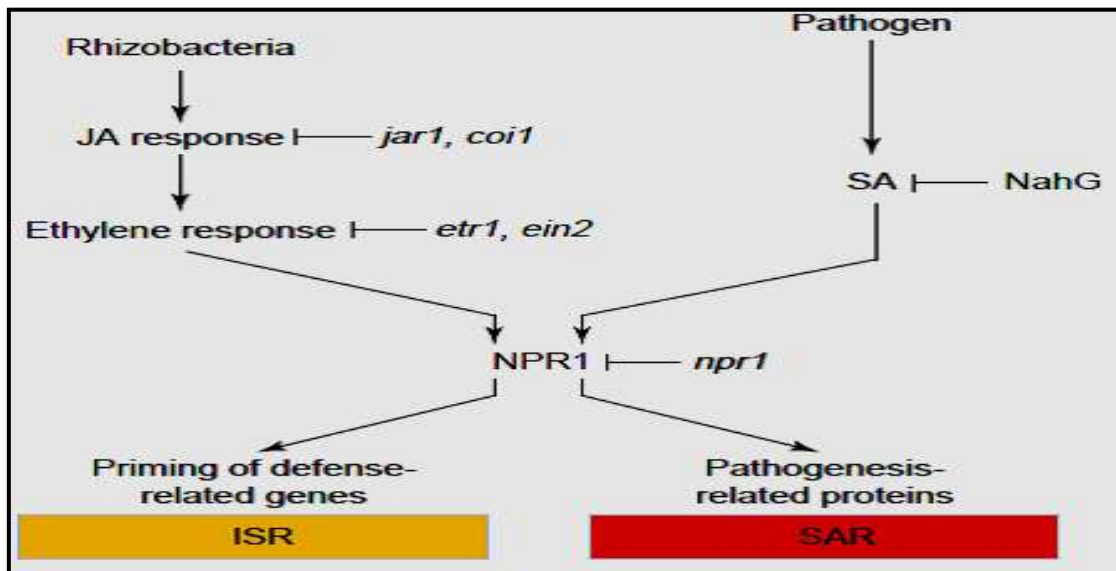
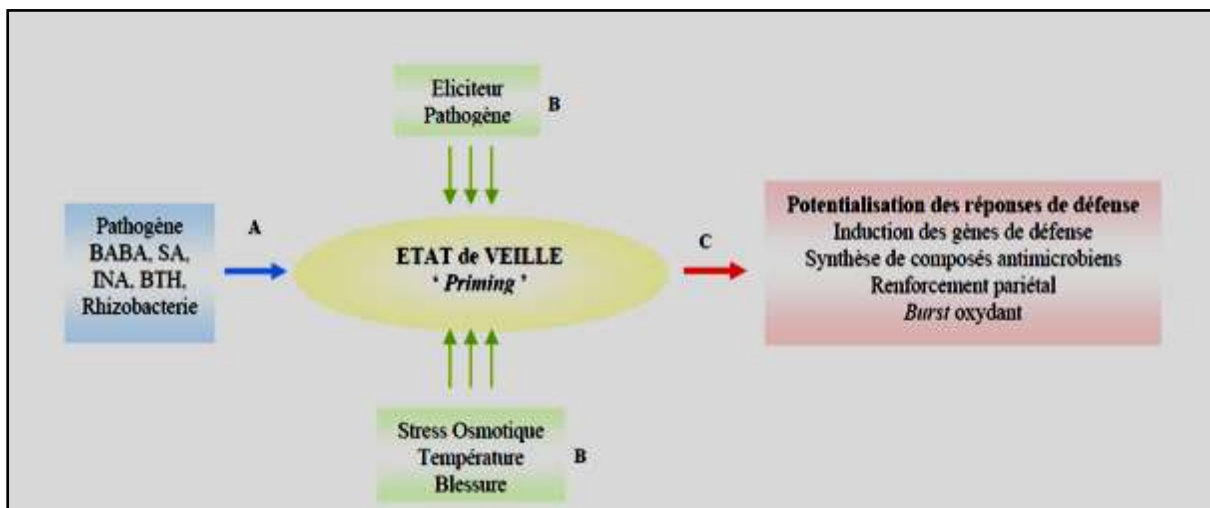
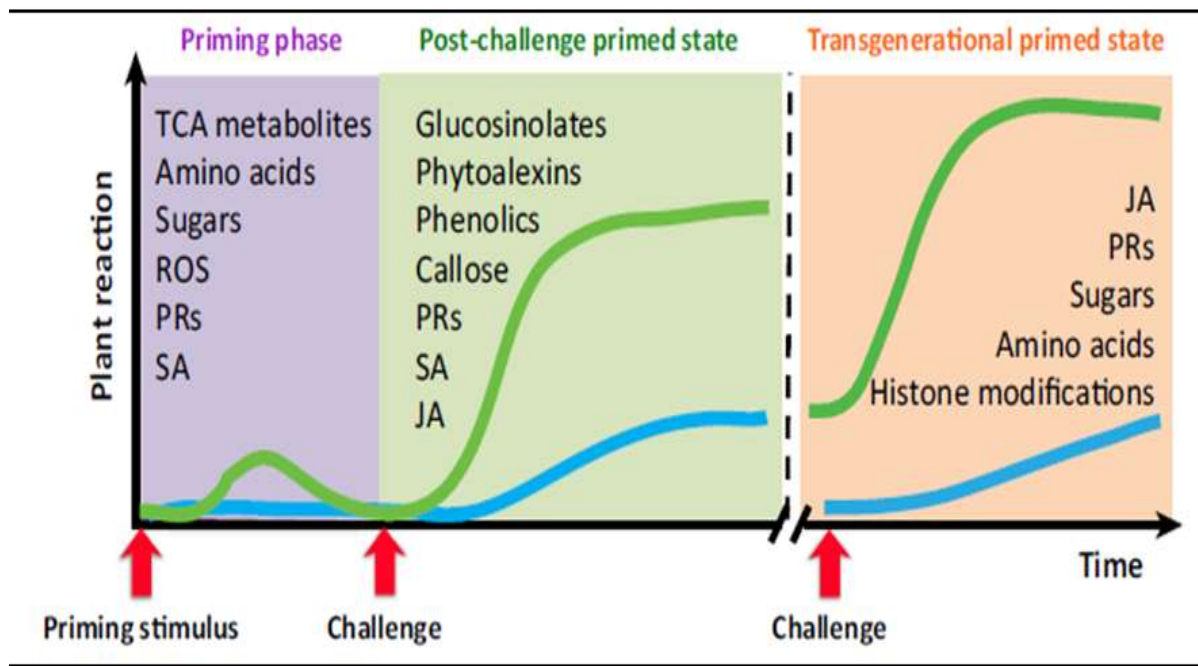


Figure 6 : Voies de transduction du signal de la SAR et de l'ISR.



A : Mise en état d'alerte (Priming), **B** : Exposition secondaire à un stress biotique ou abiotique, **C** : Potentialisation des réponses de défense. Chez les plantes, le traitement avec l'acide salicylique, le BABA (acide β -aminobutyrique), l'INA (acide 2,6-dichloroisocotinique) ou le BTH (acibenzolar-S-méthyl) prépare les cellules à réagir plus rapidement et plus efficacement aux agressions ultérieures (Conrath et *al.*, 2002).

Figure 7 : Phénomène de potentialisation chez les plantes.



La ligne verte représente le niveau et la vitesse des réactions des plantes qui ont été sensibilisées et la ligne bleue représente le niveau des réactions des plantes qui ne sont pas sensibilisées. TCA : acide tricarboxylique, ROS : Reactive oxygen species, JA: acide Jasmonique, AS : Acide salicylique, PRs : Proteins Pathogenesis-Related.

Figure 8 : Les différentes étapes du priming.

Priming est déclenché par un stimulus, au cours de ce phénomène, les niveaux de divers métabolites, des enzymes, des hormones et d'autres molécules primaires et secondaires sont légèrement modifiées, mettant la plante dans un état de veille (Fig. 8). Dans un état de stress (challenge), la plante rentre dans un état post-challenge au cours de laquelle les réactions appropriées pour lutter contre un stress donné sont rapidement induites. L'état transgénérationnelle potentialisé se trouve chez les plantes produites à partir de graines issues des plantes parentales qui ont subi un priming et sont donc en mesure de réagir plus rapidement en cas d'un stress (Balmer et *al.*, 2015).

Les réactions de défense de l'ISR sont exprimées uniquement sous l'effet d'une attaque par des agents pathogènes, renforçant le niveau de résistance aux envahisseurs rencontrés (Van der Ent et *al.*, 2009b). Le priming peut expliquer l'absence des changements de l'expression des gènes de défense en absence du pathogène chez les plantes bactériées (Pieterse et *al.*, 2001). Cette caractéristique chez les plantes indique une certaine capacité de mémoire (Bruce et *al.*, 2007).

Ton et ses collaborateurs suggèrent que les facteurs de transcription jouent un rôle important dans la régulation et le fonctionnement du priming. L'induction de la mise en alerte

des plantes peut déclencher une accumulation accrue de ces facteurs. On peut supposer que ces facteurs de transcription restent inactifs jusqu'à ce que la plante sera exposée à un agent pathogène, parce que les mécanismes de défense ne sont pas directement exprimés lors de l'induction de ce phénomène (Ton et *al.*, 2009). L'exposition à un agent inducteur peut activer un ou un ensemble de gènes, des modifications au niveau des métabolites de signalisation ou des facteurs de transcription, ou encore des changements épigénétiques pourraient jouer un rôle dans la mise en alerte, en permettant des changements à long terme dans l'expression des gènes (Bruce et *al.*, 2007).

La stimulation des réactions de défense entraîne une vaste reprogrammation de la transcription chez la plante. Les changements dans l'expression des gènes contribuent à la résistance aux pathogènes ; des réponses spécifiques de la défense doivent être activées immédiatement après l'infection (Bent et Mackey, 2007; Jones et Dangl, 2006). Quelques études ont montré que des mécanismes, comme la méthylation de l'ADN et le remodelage de la chromatine sont impliqués dans la régulation épigénétique et peuvent avoir des effets durables sur l'expression des gènes de l'immunité végétale (Alvarez et *al.*, 2010). La méthylation de l'ADN est l'un des principaux mécanismes de fonctionnement de régulation épigénétique des processus allant de la réponse aux signaux environnementaux à la coordination du développement chez les plantes (Feinberg, 2007).

Le caractère ou le fonctionnement d'une cellule est défini par ses protéines, qui sont le résultat de l'expression des gènes spécifiques. Les déterminants primordiaux de profils d'expression des gènes sont les facteurs de transcription en se liant à l'ADN, qui choisissent l'activation ou la répression de la transcription des gènes par la reconnaissance de la séquence de l'ADN dans leurs promoteurs. L'interaction de ces facteurs avec leurs séquences apparentées déclenche une chaîne d'événements, impliquant souvent des changements dans la structure de la chromatine, qui mène à l'assemblage d'un complexe de transcription actif (Cosma et *al.*, 1999).

Dans la dernière décennie, des études suggèrent que les conditions de stress environnementaux peuvent causer des adaptations efficaces dans les descendants de la plante. L'adaptation au stress acquis peut passer à la prochaine génération, l'état de stress doit être mémorisé dans une forme qui est propagée à travers les divisions mitotique et méiotiques, même lorsque le stress n'est plus présent (Piertese et *al.*, 2014).

3. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs)

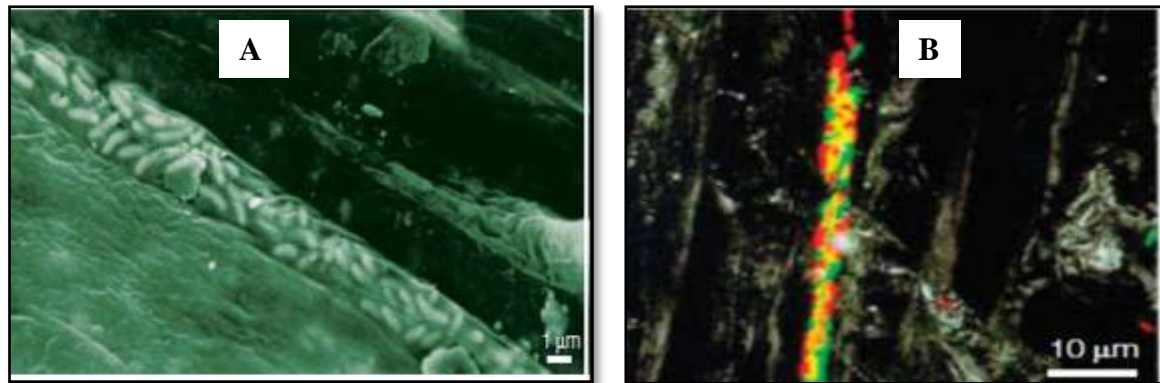
La lutte biologique contre les maladies des plantes fait souvent appel aux communautés bactériennes du sol, particulièrement celles adaptées aux rhizosphères (rhizobactéries) (Leinhos, 1994 ; Zahir et *al.*, 2004 ; Ryu et *al.*, 2007 ; Suty, 2010 ; Piertese et *al.*, 2014). Ces rhizobactéries sont regroupées sous le nom Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) (Kloepper et Schroth, 1978 ; Kloepper et *al.*, 1980), pour désigner les rhizobactéries phytostimulatrices de la croissance des plantes.

Les PGPRs sont caractérisées par une capacité d'adaptation physiologique et métabolique polyvalente (Sturz et Christie, 2003), formant un groupe hétérogène de bactéries bénéfiques au niveau de la rhizosphère (Soltani, 2010). Ces rhizobactéries varient selon leur degré de proximité à la racine et l'intimité de l'association. En général, elles peuvent être séparées en PGPRs extracellulaires, existant dans la rhizosphère ou dans l'espace intercellulaire du cortex racinaire (bactéries non symbiotiques) et des PGPRs intracellulaires, qui pénètrent dans les cellules racinaires, généralement sont spécialisées dans la nodulation (bactéries symbiotiques) (Gray et Smith, 2004). Les genres reconnus comme PGPRs sont surtout : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* (Fernando et *al.*, 2005), *Serratia* (Liu et *al.*, 1995), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter* et *Klebsiella* (Caballero-Mellado et *al.*, 2004). L'installation des PGPRs dans la rhizosphère est influencée par les substances libérées par les racines des plantes (Figs. 9,10) (Prescott et *al.*, 2003 ; Sturz et Christie, 2003). Ces rhizobactéries non seulement augmentent en nombre lorsque ces éléments nutritifs deviennent disponibles mais leur assemblage et leur fonction changent aussi (Prescott et *al.*, 2003). Selon Somers et *al.*, (2004), les PGPRs peuvent être classées selon leurs actions phytoenifiques comme biofertilisants, phytostimulateurs, biopesticides. Ces rhizobactéries forment d'importants rhizoremediateurs, en dégradant les composés xénobiotiques dans les sols contaminés (Jacobsen, 1997).

3.1. Groupe de *Pseudomonas* fluorescents

Les *Pseudomonas* sont parmi les bactéries les plus rencontrées dans la rhizosphère (Misko et Germida, 2002), sont des bacilles à Gram négatif de 0,5-1,3 μm de diamètre (Eyquem et *al.*, 2000). Le genre *Pseudomonas* a été décrit en 1894 (Migula, 1894), englobe des bactéries ubiquitaires possédant une grande diversité, incluant des espèces saprophytes et parasites (Lefrère et Rouger, 2000 ; Choudhary et *al.*, 2009). Ces bactéries se caractérisent par un métabolisme aérobie strict, certaines souches ont une respiration anaérobie avec le nitrate

comme accepteur terminal d'électrons et/ou l'arginine. Les pseudomonads sont mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (Eyquem et *al.*, 2000 ; Haas et Défago, 2005), sont rarement immobiles et sont non sporulés. La plupart des *Pseudomonas* se cultivent à 30 °C et se caractérisent par une croissance lente à 4 °C (Eyquem et *al.*, 2000).



A : Micrographie électronique à balayage d'une microcolonie de *Pseudomonas fluorescens* WCS365 sur la racine de la tomate (Chin-A-Woeng et *al.*, 1997 ; 2000). **B** : Analyse microscopie confocale à balayage de la colonisation des racines de tomate par *P. fluorescens* WCS365, qui exprime des protéines autofluorescentes. Deux dérivées de WCS365 exprimant soit la protéine fluorescente bleu-vert (cellules rouges) ou la protéine fluorescente jaune (cellules vertes) ; le chevauchement des couleurs rouge et vert est indiqué en jaune (Bloemberg, 2000).

Figure 9 : Colonisation des racines par *Pseudomonas fluorescens* WCS365.

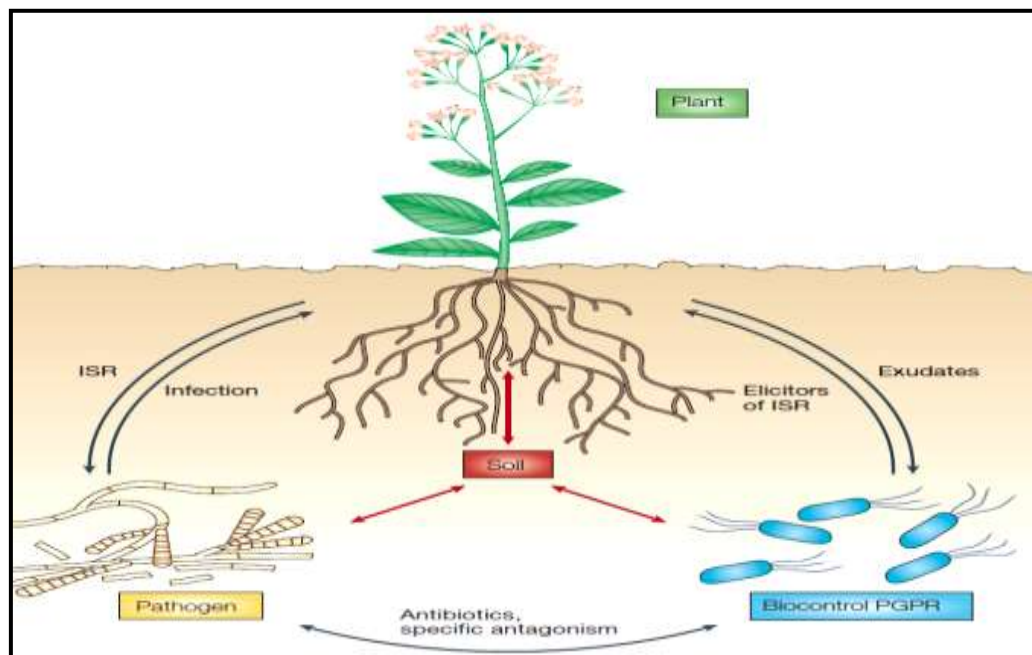


Figure 10 : Interactions entre les PGPRs, la plante, le pathogène et le sol (Haas et Défago, 2005).

Différents critères ont été utilisés pour l'élaboration d'un système de classification des espèces de *Pseudomonas*. Ces bactéries ont été caractérisées phénotypiquement, en se basant sur plusieurs caractéristiques : la morphologie, la pigmentation, les caractères biochimiques et physiologiques et les exigences nutritionnelles (Jonhson et Palleroni, 1989 ; Palleroni, 1993). Pour élucider la réelle classification de ces pseudomonads, il est important de les caractériser génotypiquement (De Ley et De Vos, 1984). En 1973 Palleroni distingue cinq groupes par hybridation ARN/ADN. Les études taxonomiques se sont ensuite succédées en utilisant l'hybridation ADN/ADN et le séquençage de l'ARNr 16S afin d'aboutir à de profonds remaniements créant de nouvelles espèces et de nouveaux genres (Eyquem et *al.*, 2000). Ces bactéries appartiennent à la sous-classe gamma *Proteobacteria*, à la famille des *Pseudomonaceae* et au genre *Pseudomonas*. Le genre *Pseudomonas stricto sensu* correspond au groupe I d'homologie d'ARNr de Palleroni qui englobe toutes les espèces fluorescentes (Palleroni, 1983, 1993).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été étudiés depuis des décennies pour leurs effets bénéfiques sur la stimulation de la croissance et la suppression efficace de quelques maladies telluriques des plantes (Bakker et *al.*, 2007). Ces rhizobactéries possèdent de nombreuses caractéristiques qui permettent leur utilisation dans la protection des cultures agricoles (Weller, 2007).

Les pseudomonas montrent de multiples propriétés : l'utilisation efficace des exsudats racinaires, la colonisation et la multiplication dans la rhizosphère, la spermosphère et à l'intérieur des cellules végétales (Weller et *al.*, 2002). La diversité métabolique des *Pseudomonas* spp. fluorescents confère à ces bactéries une plasticité importante pour s'adapter à de différents environnements (Latour et Lemanceau, 1997 ; Misko et Germida, 2002), favorisant leur utilisation comme biofertilisants, phytostimulateurs et agents de lutte biologique (Misko et Germida, 2002). Ces rhizobactéries fluorescentes sont devenues un modèle important pour les études écologiques de la rhizosphère et l'analyse du métabolisme secondaire bactérien (Couillerot et *al.*, 2009 ; 2011).

Traditionnellement, les mécanismes d'action des PGPRs sont regroupés en mécanismes directs et indirects (Iqbal et *al.*, 2008 ; Khakipour et *al.*, 2008 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009). Bien que la différence entre les deux n'est pas toujours évidente. En général, les mécanismes indirects se produisent en dehors de la plante, tandis que les mécanismes directs interagissent avec la plante et affectent directement son métabolisme (Iqbal et *al.*, 2008).

Les mécanismes directs sont : la production des molécules stimulatrices (substances volatiles et phytohormones), l'amélioration de l'assimilation des éléments nutritifs (libération du phosphate et d'oligo-éléments à partir de source insoluble, la fixation non-symbiotique de l'azote et la stimulation de la formation des symbioses) et l'induction des mécanismes de résistance aux maladies.

Les effets indirects consistent à lutter contre les agents pathogènes en interagissant directement avec ces derniers, ce qui réduit l'intensité de la maladie (Fig. 10) (Jacobsen, 1997). Durant la colonisation du système racinaire des plantes, les *Pseudomonas* fluorescents peuvent agir sur les phytopathogènes par leurs actions antagonistes en produisant des substances antimicrobiennes (Haas et Défago, 2005) et des enzymes lytiques des parois des champignons (Diby et *al.*, 2005a ; Siddiqui, 2003 ; Siddiqui et *al.*, 2005).

3.1.1. Interaction PGPRs-pathogènes

L'utilisation des antagonistes microbiens contre les parasites des plantes dans les productions agricoles a été proposée comme une solution alternative aux produits chimiques (Fernando et *al.*, 2005). L'antagonisme a été mis en évidence par Kloepper et *al.*, (1980), qui ont montré que *P. fluorescens* et *P. putida* exercent un effet inhibiteur vis-à-vis des champignons et des bactéries telluriques. Ces rhizobactéries ont présenté une forte colonisation des racines de plusieurs plantes et une augmentation significative de leur rendement (Kloepper et *al.*, 1980).

Plusieurs souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été signalées par leur effet antagoniste (Lepoivre, 2003 ; Kwak et *al.*, 2011). L'antagonisme peut résulter d'un ou de plusieurs mécanismes en fonction de l'antagoniste impliqué (Whipps, 2001), en faisant intervenir divers métabolites, qui peuvent affecter les pathogènes par des actions d'antibiose et/ou de parasitisme et/ou de compétition trophique.

3.1.1.1. Compétition trophique et spatiale

La colonisation des systèmes racinaires par *Pseudomonas* spp. fluorescents implique un chimiotactisme envers les exsudats racinaires, une adsorption sur les racines et enfin une compétition pour les substances nutritives (Jacques et *al.*, 1993). Les pseudomonas se caractérisent par une capacité élevée à extraire le fer du sol pour leurs besoins nutritionnels (Latour et Lemanceau, 1997 ; Whipps, 2001). Dans des conditions de carence en fer, ces

bactéries synthétisent des sidérophores (pyoverdine et pyochiline), qui chélatent le fer ; ces molécules sont aussi nécessaires à la croissance. Cette chélation réduit la disponibilité des ions ferriques pour les agents pathogènes, ce qui inhibe aussi leur croissance (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Persello-Cartieaux et *al.*, 2003; Suty, 2010). La réduction de la maladie peut être le résultat d'une colonisation importante des racines ou des sites de l'infection par ces rhizoactéries bénéfiques, ce qui réduit l'espace nécessaire à la croissance du pathogène (Jacques et *al.*, 1993 ; Suty, 2010). Ces caractéristiques expliquent leur aptitude à s'installer en nombre et durablement sur et à proximité des racines (Latour et Lemanceau, 1997).

3.1.1.2. Métabolites antimicrobiens

Les pseudomonas phyto-bénifiques excrètent des molécules qui inhibent la croissance des phytopathogènes : les antibiotiques (Jacques et *al.*, 1993). Ces métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne, la physiologie cellulaire et/ou la sporulation des agents phytopathogènes (Lepoivre, 2003). Plusieurs antibiotiques sont synthétisés par les *Pseudomonas*, tels que l'acide phénazine-1-carboxylique, 2,4-diacetylphoroglucinol (DAPG), oomycine, pyoluteorine, pyrrolnitrine, kanosamine, zwittermycine-A et pantocine ...etc (Fernando et *al.*, 2005).

Les *Pseudomonas* fluorescents produisent d'autres métabolites, de nature volatile qui peuvent interférer avec la croissance des phytopathogènes, il s'agit de l'acide cyanhydrique (HCN) (Jacques et *al.*, 1993), un métabolite essentiel dans le biocontrôle par les pseudomonas (Weller, 2007 ; De Coste et *al.*, 2010).

3.1.2. Interaction PGPRs-plantes

Les *Pseudomonas* peuvent renforcer la résistance des plantes, en induisant leurs capacités défensives naturelles, ce qui confère à l'hôte une meilleure tolérance vis-à-vis des attaques ultérieures par les agents pathogènes (Bakker et *al.*, 2007). Les *Pseudomonas* fluorescents sont capables de synthétiser différents métabolites secondaires, qui peuvent influencer positivement la croissance des plantes et sont impliqués également dans les relations de reconnaissance entre ces bactéries et les plantes (Sturz et Christie, 2003 ; Zahir et *al.*, 2004).

3.1.2.1. Phytohormones

Les *Pseudomonas* fluorescents peuvent stimuler la croissance des plantes en produisant de l'acide indole 3-acétique (AIA) (Patten et Glick, 2002), qui constitue une hormone primordiale pour le développement des plantes et l'une des principales raisons de l'augmentation du rendement (Khakipour et al., 2008). De même, la production des cytokinines par les *Pseudomonas* a été signalée par plusieurs auteurs (Arkhipova et al., 2005; Karadeniz et al., 2006; Aslantas et al., 2007).

Les *Pseudomonas* produisent de l'ACC désaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) qui hydrolyse le précurseur de synthèse de l'éthylène (Rifat et al., 2010). A cet effet, la quantité de l'éthylène produite par la plante est réduite, ce qui favorise l'élongation des racines (Penrose et al., 2001 ; Rifat et al., 2010).

3.1.2.2. Vitamines

La stimulation de la croissance des plants de *Trifolium* est due à la sécrétion de vitamines B par *Pseudomonas* sp. 267 (Derylo et Skorupska, 1993). La synthèse de vitamines par les *Pseudomonas* spp. fluorescents est affectée par la nature de la source de carbone, le pH et la température (Marek-Kozaczuk et Skorupska, 2001).

3.1.2.3. Assimilations phosphatée et azotée

Pseudomonas fluorescents peuvent solubiliser le phosphore (Rosas et al., 2006 ; Park et al., 2009). La solubilisation du phosphore par ces rhizobactéries peut être due à l'excrétion de protons (en assimilant l'ammonium) et la production d'acides organiques (Park et al., 2009). Il a été constaté une absorption significative du phosphore et de l'azote par les plants du poivron noir bactérisés par les *Pseudomonas fluorescens* (Diby et al., 2005b). Ces effets stimulent la croissance (Jacques et al., 1993 ; Sturz et Christie, 2003 ; Zahir et al., 2004) et augmente le rendement des cultures (Rodríguez et Fraga, 1999).

3.1.2.4. Stimulation des réactions de défense

L'induction de la résistance systémique (ISR) chez les plantes a été remarquée par l'augmentation transitoire de la teneur en certaines enzymes. Parmi ces enzymes : la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), la peroxidase (PO) et la polyphénol oxydase (PPO) (Umamaheswari et *al.*, 2009 ; Liang et *al.*, 2011). La PAL est l'une des enzymes jouant un rôle important au cours du développement de la défense (Song et Wang, 2008), enzyme clé de la voie phénylpropanoïdes conduisant à l'accumulation des phytoalexines (Rosa et *al.*, 2005). L'augmentation ou la diminution de l'activité de la PAL est bien corrélée avec le degré de résistance de la tomate ainsi que la teneur totale en phénol (Umesha, 2006).

Les PO sont de nature glycoprotéine, se trouvent dans les vacuoles (Passardi et *al.*, 2005). Ces enzymes sont surexprimées afin de limiter la propagation de l'infection en créant des obstacles structurels (Passardi et *al.*, 2005) : la formation de la lignine, la subérine et la réticulation des composants de la paroi cellulaire et elles sont impliquées dans la synthèse des phytoalexines (Almagro et *al.*, 2009). Ces enzymes peuvent générer un environnement hautement toxique en produisant massivement les ROS et les espèces réactives azotées (Passardi et *al.*, 2005). Les PPO sont impliquées dans la résistance aux maladies par l'hydroxylation des monophénols en quinones qui sont souvent plus toxiques pour les micro-organismes (Tableau 3) (Gandia-Herrero et *al.*, 2005).

Les rhizobactéries bénéfiques peuvent induire ou renforcer différentes réactions de défense chez les plantes, le type de ces mécanismes est dépendant de la souche bactérienne et le génotype inoculé ; de leur interaction (Tableau 3).

3.2. Régulation du métabolisme secondaire

Les effets bénéfiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents sur la plante et l'environnement sont associés à la production des métabolites secondaires (antibiotiques, sidérophores, phytohormones) dont la synthèse est influencée par le métabolisme basal (Latour et Lemanceau, 1997). Les facteurs environnementaux : la température, le pH et l'humidité affectent la production des substances antimicrobiennes (Shanahan et *al.*, 1992a ; Georgakopoulos et *al.*, 1994) et des sidérophores (Ravel et Cornelis, 2003 ; Varma et Chincholkar, 2007). Le rôle de ces substances dans la lutte biologique reste à élucider dans les conditions naturelles de l'environnement, selon les aspects fonctionnels des communautés rhizobactériennes (Fernando et *al.*, 2005).

Dans leurs actions phytostimulatrice et de biocontrôle, les *Pseudomonas* fluorescents forment des microcolonies qui constituent un biofilm sur les sites préférés des exsudats racinaires (Choudhary et Johria, 2009). Ces microcolonies communiquent les unes avec les autres selon le processus biologique : quorum sensing (QS) et agissent de manière coordonnée (Choudhary et Johria, 2009 ; Babalola, 2010). Le QS est un mécanisme de communication entre les cellules, il est utilisé par de nombreuses bactéries afin de réguler leur densité de population et l'expression des gènes (Miller et Bassler, 2001; Miller et al., 2008 ; Keller et Surette, 2006).

Tableau 3 : Mécanismes de défense stimulés par *Pseudomonas* fluorescents chez les plantes.

<i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescents	Hôtes/pathogènes	Mécanismes de défense	Références
<i>P. fluorescens</i> CHA0 <i>P. aeruginosa</i> 7NSK2	Vigne (<i>Vitis vinifera</i>) / <i>Botrytis cinerea</i>	ROS et phytoalexines	Verhagen et al., (2010)
<i>P. fluorescens</i> WCS417r	<i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Hyaloperonospora arabidopsis</i>	Callose	Van der Ent et al., (2009a)
<i>P. fluorescens</i> PF10	Banane (<i>Musa sp</i>) / <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>cubense</i>	PAL, PO, chitinase, β 1-3 glucanase et composés phénoliques	Thangavelu et al., (2003)
<i>P. corrugata</i> 13 <i>P. aureofaciens</i> 63-28	Concombre (<i>Cucumis sativus</i>) / <i>Pythium aphanidermatum</i>	PAL, PO et PPO	Chen et al., 2000)
<i>P. putida</i> BTP1	Concombre (<i>Cucumis sativus</i>) / <i>Pythium aphanidermatum</i>	Composés phénoliques, phytoalexine et d'autres	Ongena et al., (2000)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Thé (<i>Camellia sinensis</i>) / <i>Exobasidium vexans</i>	PO, PPO, PO, chitinase et composés phénoliques	Saravanakumar et al., (2007)
<i>P. fluorescens</i> Pf1	Vigne (<i>Vitis vinifera</i>) / <i>Uncinula necator</i>	PO, PPO et chitinase	Sendhilve et al., (2007)

Chez les bactéries à Gram négatif, le QS implique la production des N-acyl homosérines lactones (AHL) (Steindler et al., 2008). Les AHL sont des molécules autoinductrices qui s'accumulent dans le milieu extracellulaire, lorsque le nombre de ces molécules atteint un

seuil de concentration critique (le quorum), la réponse se déclenche en menant à l'expression des gènes (Sharma et al., 2003 ; 2007). La régulation par le QS joue un rôle primordial dans la physiologie et le développement des bactéries (Miller et Bassler, 2001). Ce phénomène contrôle plusieurs phénotypes dans l'interaction plantes-bactéries-pathogènes (Von Bodman et al., 2003) ; il contrôle également les phénotypes liés aux PGPRs : la production des composés antimicrobiens, l'induction de résistance systémique chez les plantes (Liu et al., 2008 ; Girard et al., 2006) et la production des sidérophores (Cornelis, 2008).

3.2.1. Métabolites antimicrobiens et enzymes extracellulaires

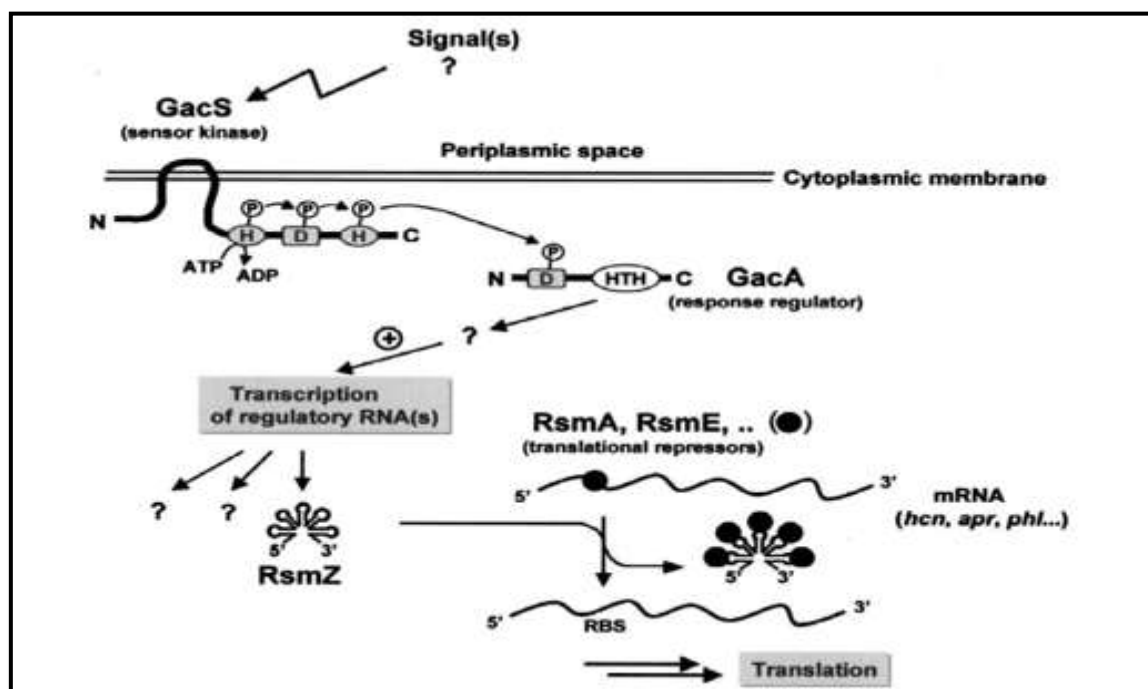
Le contrôle de l'expression des gènes est un mécanisme essentiel pour la modulation de la production des métabolites secondaires (Schnider et al., 1995). Des activateurs et des répresseurs spécifiques sont nécessaires pour la régulation de la transcription des gènes des métabolites de biocontrôle (Delany et al., 2000). Chez *P. fluorescens*, l'expression de 2,4-diacetylphloroglucinol (PHL) et la pyoluteorine est contrôlée positivement par les régulateurs de transcription PhIF et PltR respectivement (Brodhagen et al., 2004; Maurhofer et al., 2004). Les gènes responsables de la synthèse des antibiotiques sont très conservés chez les *Pseudomonas* (Fernando et al., 2005).

Chez plusieurs souches de *Pseudomonas*, l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires et des enzymes extracellulaires est positivement régulée par la protéine kinase GacS et un régulateur de réponse GacA (Fig. 11) (Heeb et Haas, 2001). GacS est une protéine transmembranaire typique qui répond aux stimuli environnementaux par une autophosphorylation des acides aminés, qui se transfère de GacS à l'acide aminé de GacA (Corbell et Lopper 1995 ; Aarons et al., 2000 ; Heeb et Haas, 2001). Le régulateur GacA contient un motif de liaison à l'ADN, qui peut activer ou réprimer les gènes directement par la liaison au promoteur du gène cible (Aarons et al., 2000). Le système GacS/GacA est impliqué dans la régulation post transcriptionnelle des métabolites extracellulaires de lutte biologique (Haas et al., 2002), au niveau de l'initiation de la traduction (Blumer et al., 1999). L'implication du système GacS/GacA dans la transduction du signal a été vérifiée par l'utilisation des mutants *gacS/gacA*, chez *P. fluorescens* Pf-5 (Hassan et al., 2010) et chez *P. fluorescens* F113 (Delany, 1999). Ces mutants expriment faiblement ou même ne peuvent pas synthétiser le PHL, l'HCN et les exoproteases ; leurs actions en biocontrôle sont fortement diminuées dans plusieurs pathosystèmes (Haas et al., 2002).

3.2.2. Sidérophores

Les sidérophores sont des métabolites essentiels pour la régulation du fer (Fallahzadeh-Mamaghani et al., 2009). Ces molécules sont des transporteurs des ions ferriques à l'intérieur des cellules microbiennes. Les Pyoverdines sont des sidérophores complexes, produites par les *Pseudomonas* fluorescents (Ravel et Cornelis, 2003 ; Cornelis et al., 2008) ; elles sont composées par un chromophore dihydroxyquinoline fluorescent associé à un peptide de longueur et de composition variables (Figs. 11, 12) (Ravel et Cornelis, 2003).

Les pyoverdines des *Pseudomonas* fluorescents ont une forte affinité pour le Fe^{3+} , elles chélatent et transportent ces ions ferriques à travers la membrane bactérienne externe via un transporteur (Meyer et Hornsperger, 1978). Par la suite, Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} dans le cytoplasme (Simeoni et al., 1987).



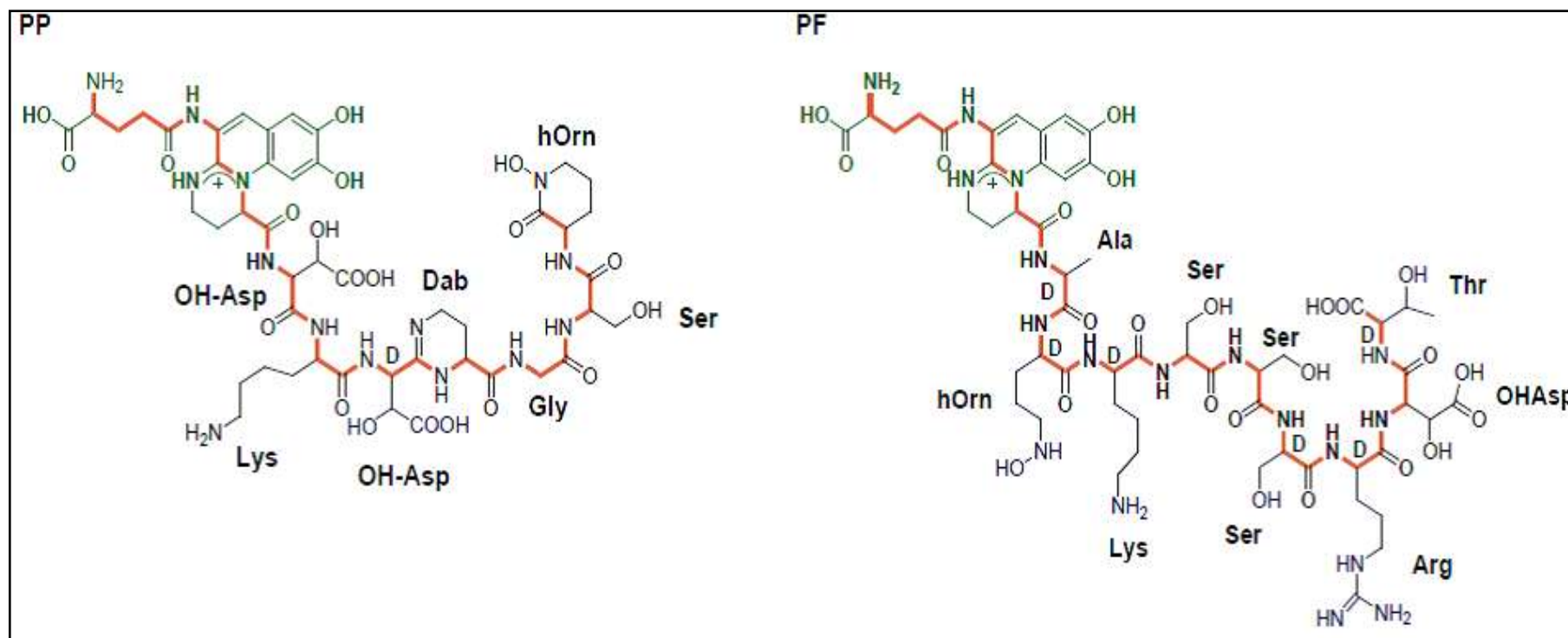
Activation de la kinase sensor GacS par des signaux inconnus qui déclenchent la phosphorylation (H [His] → D [Asp] → H [His] dans GacS → D [Asp] dans GacA, ce qui active GacA). La phosphorylation de GacA contrôle positivement la transcription d'ARN régulateurs comme RsmZ qui va séquestrer avec les répresseurs de la traduction comme RsmA, ce qui rend le RBS (ribosome binding site) accessible à la traduction de *hcn*, *apr* et *phl* et donc la biosynthèse de HCN, protéase alcaline et PHL respectivement.

Figure 11 : Voie de transduction du signal du système GacS/GacA chez *P. fluorescens* CHA0 (Haas et al., 2002).

Divers mécanismes sont utilisés par les bactéries pour émettre la signalisation des conditions extracytoplasmiques de l'environnement vers le cytoplasme. Ces mécanismes activent les facteurs sigma extracytoplasmiques (extra cytoplasmic sigma factors, ECF δ), qui mobilisent l'ARN polymérase à des gènes spécifiques afin d'exprimer des protéines appropriées en réponse à l'environnement (Brooks et Buchanan, 2008). Ces facteurs sigma sont de petites protéines de régulation, une composante essentielle de l'ARN polymérase, qui détermine la sélectivité des polymérases pour les promoteurs (Heimann, 2003). La régulation de la production de la pyoverdine et la chélation du fer dépend de deux facteurs extracytoplasmiques sigma : PvdS et FpvI (Ravel et Cornelis, 2003). L'expression des gènes *pvdS* et *fpvI* est contrôlée par le répresseur transcriptionnel Fur (Vasil et Ochsner, 1999 ; Redly et Poole, 2003), c'est une protéine régulatrice de la chélation des ions ferriques, son action est dépendante de Fe²⁺ (Delany et al., 2001).

La capacité des *Pseudomonas* spp. à produire les sédirophores est dépendante de la teneur en fer et le type de source de carbone dans le milieu (Djibaoui et Bensoltane, 2005). Dans des conditions d'excès de fer, *P. aeruginosa* réprime la transcription des gènes de facteurs sigma extracytoplasmiques (Ravel et Cornelis, 2003; Visca et al., 2007). Dans ces conditions le répresseur Fur se lie à une région très conservée (Fur box), se situe en amont des gènes de régulation du fer, ce qui bloque la transcription. Par contre, en cas d'une carence en fer, le répresseur Fur est détaché et les gènes sont transcrits (De Lorenzo et al., 1988; Prince et al., 1993 ; Hunt et al., 1994).

Selon certaines études, la régulation de la synthèse des sidérophores n'implique pas le système GacS/GacA. Chez *P. fluorescens* Pf-5, la production des siderophores et d'autres aspects d'homéostasie du fer sont significativement élevés chez les mutants *gacA* que dans le type sauvage (Hassan et al., 2010). Egalement, chez *P. fluorescens* PfG32R, les mutants *gacS* ou *gacA* peuvent synthétiser des sidérophores (Alit-Susanta et al., 2006).



Le chromophore dihydroxyquinoline est représenté dans sa forme d'acide carboxylique en lignes vertes. Les acides aminés sont en violet et les lignes rouges montrent le squelette peptidique.

Figure 12 : Structures chimiques de la pyoverdine de *Pseudomonas putida* (PP) et de *Pseudomonas fluorescens* (PF) (Ravel et Cornelis, 2003).

3.2. Groupe de *Rhizobium*

Les microorganismes du sol, spécifiquement les *Rhizobium* sont capables de coloniser la rhizosphère, d'infecter les légumineuses et peuvent fixer biologiquement l'azote par le processus de la symbiose (Coutinho et al., 2008; Deshwal et al., 2013). Les rhizobia appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae* ; sont des bactéries à Gram négatif, strictement aérobies, bâtonnets de 0,6 à 0,9 µm de largeur et de 1,2 à 3 µm de longueur et non sporulants (Jordan, 1984). Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou des flagelles péritriches (Werner, 1992). Leur croissance est optimale à une température de 28 °C et un pH entre 6 et 7 (Burton, 1985).

Les *Rhizobium* peuvent vivre sur des résidus végétaux (saprophytes) ou entièrement chez les plantes (endophytes) ou comme des rhizobactéries. Ces bactéries sont classées sur la base de leur capacité à noduler un groupe spécifique de plantes hôtes. Les sept espèces identifiées selon les plantes hôtes sont: (1) *Sinorhizobium meliloti*/luzerne cultivée, (2) *Rhizobium trifolii*/trèfle, (3) *Rhizobium leguminosarum*/pois, (4) *Rhizobium phaseoli*/haricot, (5) *Rhizobium lupini*/lupin, (6) *Bradyrhizobium japonicum*/soja (7) *Rhizobium* sp/cornille, (Fred et al., 2007).

L'établissement de la symbiose débute par l'infection bactérienne et qui se termine par la formation d'un nodule qui forme un organe spécialisé, encore appelé nodosité, à l'intérieur duquel la bactérie se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique. La fixation biologique de l'azote par les *Rhizobium* permet la conversion de l'azote élémentaire en forme d'ammoniac (NH₄⁺) et nitrate (NO₃⁻) disponible pour plantes (Chen et al., 1988).

Le fonctionnement de la symbiose est sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires (Rosenberg, 1997). En effet, les rhizobia et les racines du futur hôte établissent une interaction sous forme de message chimique entre les deux partenaires. La symbiose implique la formation d'un complexe de dialogue moléculaire, nécessitant des facteurs Nod synthétisés par la bactérie et des flavonoïdes libérés par les racines des légumineuses, afin que les deux partenaires symbiotiques puissent se reconnaître et initier la nodulation (Fig. 13) (Oldroyd, 2013). Les rhizobia infectent typiquement les hôtes par le biais des poils racinaires ; les étapes d'une symbiose effective exige : (1) la multiplication des rhizobia, la colonisation de la rhizosphère et la fixation aux cellules épidermiques et aux poils absorbants, (2) la courbure caractéristique des poils absorbants, l'invasion par les bactéries et la formation d'un cordon d'infection, (3) l'initiation du nodule et son développement dans le cortex de la racine

et (5) le déversement des bactéries du cordon d'infection et la différenciation des cellules spécialisées dans la fixation de l'azote (Hopkins, 2003).

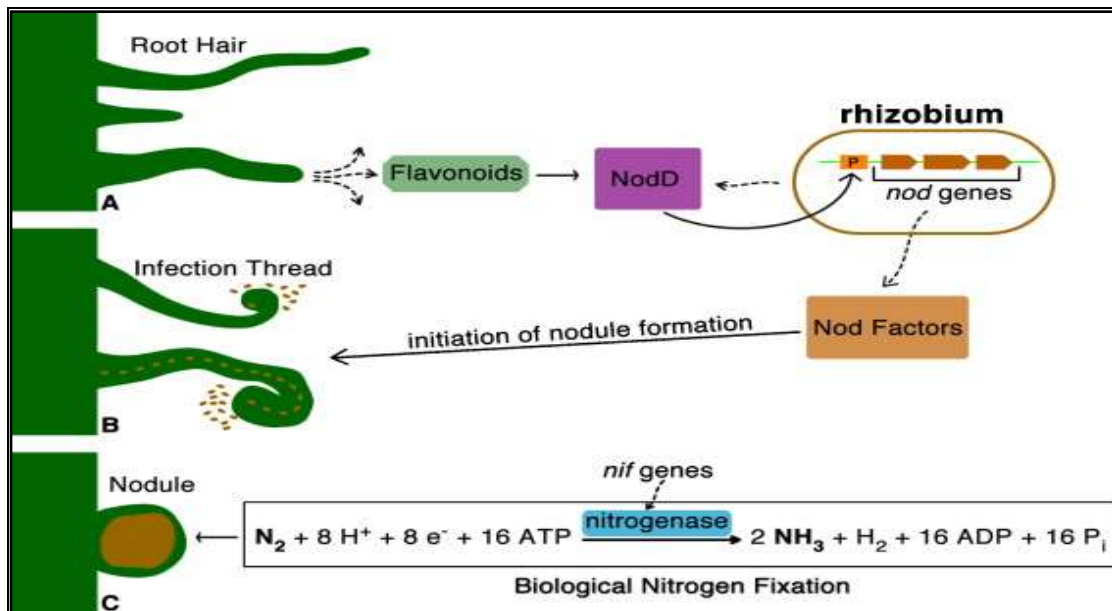


Figure 13: Processus de la nodulation (Laranjoa et al., 2014).

4. Stress biotique et abiotique

Dans la nature, les plantes sont simultanément exposées aux stress biotique et abiotique qui limitent les rendements des cultures. Les plantes sous stress présentent des réponses physiologique, métabolique et moléculaire adaptées. Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à analyser deux maladies infectieuses (la fusariose vasculaire et la gale bactérienne) et une maladie physiologique. Les interactions compatibles entre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et la tomate (*Solanum lycopersicum*) représente des modèles actuels pour analyser l'interaction compatible (Büttner et Bonas, 2010 ; Xin et He, 2013).

4.1. Fusariose Vasculaire

Les fusariums sont des champignons telluriques qui se trouvent dans la plupart des sols, notamment cultivés et font partie de la microflore rhizosphérique. La plupart sont saprophytes, alors que certains sont bien connus par leur effet néfaste (Fravel et al., 2003). Les souches pathogènes de *Fusarium oxysporum* sont responsables de la pourriture des

racines et le flétrissement de plusieurs espèces végétales (Inoue et *al.*, 2002 ; Fravel et *al.*, 2003 ; Berrocal-Lobo et Molina, 2007), y compris les cultures herbacées, ligneuses et ornementales (Aboul-Soud et *al.*, 2003).

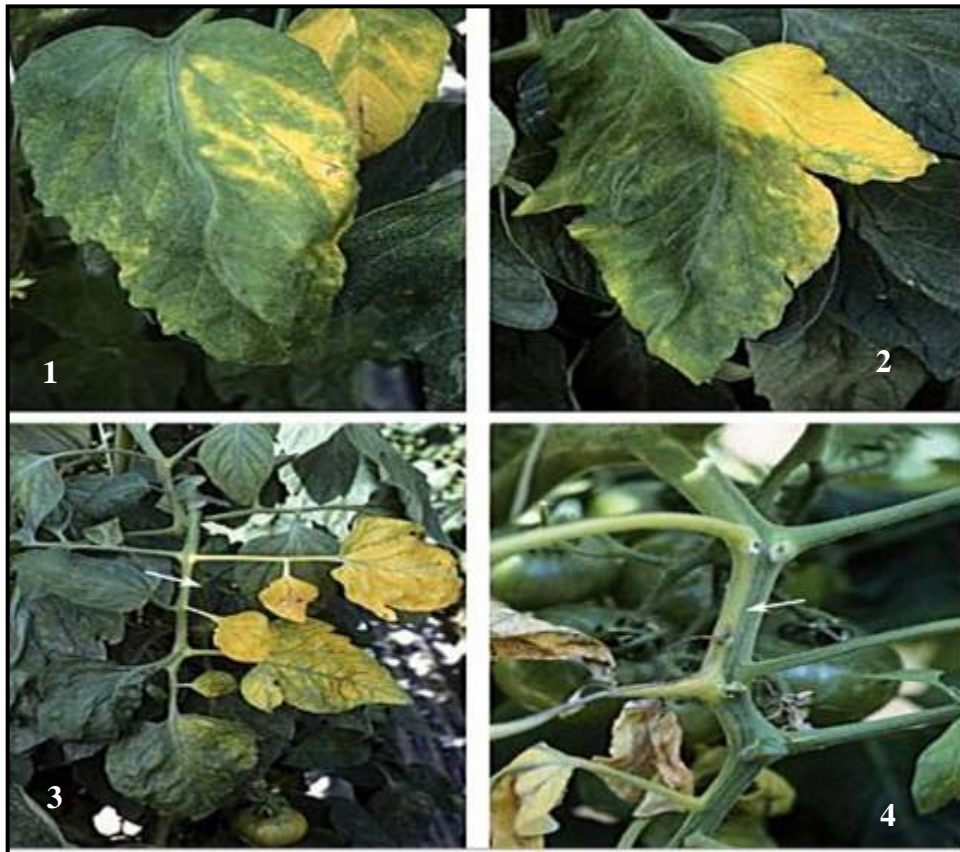
Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (Sacc) Snyder & Hans (FOL) est l'agent responsable du flétrissement vasculaire des cultures de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) à travers le monde (Snyder et Hansen, 1940). FOL a été caractérisé pour la première fois en 1895 en Angleterre par Masee. Les souches pathogènes de ce champignon causent d'importantes pertes économiques (Aboul-Soud et *al.*, 2003 ; Ohara et *al.*, 2004). Au moins 32 pays avaient signalé la maladie, qui est particulièrement grave dans les pays à climat chaud. Cette maladie a souvent détruit des cultures entières des tomates cultivées (Etebarian, 1992 ; 2002).

Le flétrissement fusarien de la tomate est causé par trois races de FOL, connues et nommées dans l'ordre de leur découverte (race 1, race 2, et race 3), qui se distinguent par leur pathogénicité différentielle aux cultivars de tomate (Elias et Schneider, 1991 ; Mes et *al.*, 1999). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* colonise les tissus vasculaires de la tomate en pénétrant directement par les racines (Inoue et *al.*, 2002). Les chlamydospores de ce champignon se conservent très longtemps et souvent très profondément dans le sol ; leur germination peut être déclenchée par les exsudats racinaires de la tomate (Kamilova et *al.*, 2008). Potentiellement, les nutriments utiles dans ces exsudats racinaires peuvent contenir des acides organiques : dont le principal est l'acide succinique, l'acide citrique, malique et lactique. Dans ces rhizodépositions, on retrouve également en faible concentration : le glucose, le xylose, le fructose ainsi que les acides aminés (Lugtenberg et *al.*, 2001). Les composants phénoliques font partie des exsudats racinaires, qui semblent être impliqués dans l'inhibition que dans la stimulation de la croissance mycélienne (Steinkellner et *al.*, 2008).

Après la germination des spores de FOL, les tubes germinatifs se développent pour envahir le système racinaire ; à l'intérieur de la racine ce champignon se développe à travers le xylème, conduisant au flétrissement ensuite à la mort de la plante (Cranshaw et *al.*, 1998). Chez la tomate les blessures favorisent et régularisent l'infection. Les températures de l'agressivité peuvent être différentes selon les couples hôte-parasite : 30 °C pour *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et 18-20 °C pour *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Messiaen et *al.*, 1991).

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* provoque divers symptômes (Messiaen et *al.*, 1991 ; Blancard et *al.*, 2009). Il affecte les jeunes plantes où il occasionne un ralentissement de

croissance, le flétrissement et le jaunissement des feuilles basses et les tissus vasculaires seront fortement brunis. Bien que souvent les plantules finissent par se dessécher et mourir. Sur les plantes adultes se sont les vieilles feuilles qui expriment les premiers symptômes et quelques folioles présentent des chloroses sectorielles. Par la suite, le jaunissement gagne l'ensemble du limbe et s'étend à d'autres folioles situées sur le même côté des feuilles. Les pétioles et la tige présentent également un jaunissement longitudinal qui s'amplifie progressivement et donne naissance à une lésion nécrotique affectant un seul côté de la tige sur plusieurs centimètres. Une coupe réalisée sur la tige permet de dégager les vaisseaux et de constater qu'ils ont une teinte brune très marquée, la moelle ne semble pas affectée (Fig. 14) (Blancard et *al.*, 2009).



1 : Chloroses sectorielles ; le jaunissement semble se diffuser à partir de nervures dont certaines brunissent légèrement. **2 :** La chlorose unilatérale est typique d'une maladie vasculaire. **3 :** Jaunissement de plusieurs folioles situées sur un même côté de la feuille. **4 :** Le jaunissement gagne progressivement plusieurs pétioles situés sur un côté du rachis foliaire (Blancard, 2009).

Figure 14 : Symptômes causés par FOL.

4.2. Gale bactérienne

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (Doidge), est l'agent causal de la gale bactérienne de la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ; est l'une des maladies les plus graves de cette plante (Scott et coll, 1989; Uys et al., 1996). La capacité de cet agent pathogène de causer la maladie dépend d'un système de sécrétion de type 3 (T3SS). Cet appareil de sécrétion injecte une série de protéines effectrices de type 3 (T3E) directement dans le cytosol de la cellule hôte, où elles agissent en tant que facteur de virulence modulant les processus cellulaires et supprimant les réponses de défense de l'hôte (Feng et Zhou, 2012).

Les bactéries de *X.campestris* pénètrent à travers les stomates sur les surfaces des feuilles et à travers les plaies sur les feuilles et les fruits. L'humidité relativement élevée favorise l'infection et le développement de la maladie. Le développement des symptômes est retardé ou éliminé lorsque l'humidité est faible pendant plusieurs jours après l'infection (AL-Saleh et al., 2011).

L'agent pathogène bactérien peut produire des lésions sur toutes les parties aériennes de la plante (feuilles, tiges, fleurs et fruits) (Fig. 15). Les symptômes initiaux apparaissent sur les feuilles : sont de petites lésions sombres, circulaires irrégulières, qui peuvent être entourées d'un halo jaune. Les lésions ont tendance à se concentrer sur les bords des feuilles et la pointe et peuvent augmenter de taille à un diamètre de 3-5 mm. Les feuilles infectées peuvent présenter une apparence brûlée. Lorsque les taches sont nombreuses, le feuillage devient jaune et finit par fletrir, conduisant à la défoliation de la partie inférieure de la plante (AL-Saleh et al., 2011 ; Kyeon et al., 2016).



A. Spots sur les feuilles de tomate. B. Plants de tomate montrant une défoliation et des spots sur le fruit.

Figure 15: Symptômes de la gale bactérienne sur tomate.

4.3. Stress salin

La salinité est l'un des facteurs les plus graves qui limitent la productivité des cultures agricoles dans les régions arides et semi-arides en influençant leur croissance et leur rendement (Munns et Tester, 2008). La salinité influence la croissance des plantes en affectant l'absorption de l'eau, ce qui cause une toxicité ionique. En diminuant le potentiel osmotique et le potentiel hydrique du sol, l'accès des plantes à l'eau est réduit (Bernstein, 1975).

Afin de maintenir l'absorption de l'eau à partir d'un sol salin, les plantes doivent s'adapter osmotiquement. Cela se fait soit en compartimentant les sels dans le tissu végétal, soit en synthétisant des solutés organiques. Les plantes tolérantes à la salinité possèdent une grande capacité à stocker des concentrations élevées de sel dans le tissu végétal sans affecter les processus cellulaires et sont connues sous le nom d'halophytes. Les plantes qui synthétisent des solutés organiques sont connues sous le nom de glycophytes, et elles essaient d'empêcher l'absorption excessive des sels, car leur capacité à tolérer des concentrations élevées est faible. Dans la plupart des cas, les glycophytes ont tendance d'être sensibles à la salinité (Bernstein, 1975, Marschner, 1995, Orcutt et Nilsen 2000).

La salinité élevée est toxique, entraînant une inhibition de nombreux processus physiologique et biochimique. Elle peut causer un stress hydrique, une toxicité ionique, des troubles nutritionnels, un stress oxydatif, une altération des processus métaboliques, une désorganisation de la membrane et une réduction de la division cellulaire. Ces effets réduisent la croissance, le développement et la survie des plantes. Les plantes sensibles ou tolérantes à la salinité diffèrent dans la vitesse à laquelle le sel atteint des niveaux toxiques dans les feuilles. Les délais sont des jours, des semaines ou des mois, selon l'espèce et le niveau de salinité (Munns, 1993, 2002).

La plupart des plantes utilisent une combinaison de stratégies pour tolérer les conditions salines (Chhipa et Lal, 1995). Même avec un ajustement osmotique complet, une réduction de la croissance peut se produire en raison des exigences métaboliques de maintenir l'ajustement osmotique (Bernstein, 1975 ; Marschner, 1995). Une gamme de symptômes a été décrite, des chloroses sur les pointes des feuilles les plus âgées peuvent se développer et des nécroses, suivie par la mort de la plante (Eaton, 1966 ; Krishnamurthy et *al.*, 1987 ; Grundon, 1987, Marschner, 1995 ; Orcutt et Nilsen 2000 ; Xu et *al.*, 2000).

Les mécanismes de contrôle génétique de la tolérance au stress salin chez les plantes n'ont pas encore été complètement compris en raison de leur complexité. Il existe en fait

plusieurs gènes contrôlant la tolérance à la salinité dont leur effet dépend fortement de leurs conditions environnementales (Allen et Stine, 1994 ; Munns, 2002). La tolérance à la salinité peut être évaluée comme étant le pourcentage de production de biomasse dans les conditions salines par rapport aux conditions de contrôle sur une période de temps prolongée ou en terme de survie (Munns, 2002). Différents mécanismes d'adaptation peuvent être impliqués dans l'acclimatation à la salinité. La tolérance à de salinité peut augmenter ou diminuer selon les espèces végétales et / ou les facteurs environnementaux (Howat, 2000, Marschner, 1986).

EXPERIMENTATION 1 : INDUCTION DE LA RESISTANCE SYSTEMIQUE CHEZ LA TOMATE VIS-A-VIS DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE

Les essais de cette expérimentation ont été réalisés au niveau du Laboratoire de Protection et de Valorisation de Ressources Agro-Biologiques (Faculté SNV, Université Saad Dahleb, Blida1), durant les années 2012-2013. Il s'agit de mettre en évidence, à travers des essais préliminaires et de confirmation des processus de l'induction de la résistance systémique, qui ont été entamés dans des travaux précédents (Benchabene et *al.*, 2000 ; Boukerma, 2012).

1. Microorganismes

Deux souches locales de PGPRs ont été utilisées, *Pseudomonas fluorescens* PF15 et *Pseudomonas putida* PP27. PF15 et PP27 sont issues du Laboratoire de Protection et de Valorisation de Ressources Agro-Biologiques de l'Université de Blida 1. Ces souches ont fait l'objet de différents travaux antérieurs, ayant permis leur sélection sur la base de leurs potentialités d'antagonisme et de phytostimulation (Benchabane, 2000 ; Boukerma, 2012).

La souche fongique utilisée pour la stimulation des réponses de défense chez la tomate est *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), issue de la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (MUCL), Belgique. Cette forme est responsable du flétrissement vasculaire de la tomate (Duyvesteijn et *al.*, 2005 ; Michielse et *al.*, 2009).

2. Antagonisme *in vitro*

Un essai préliminaire d'antagonisme *in vitro* a été réalisé afin de vérifier et d'évaluer des actions antagonistes chez les deux souches rhizobactériennes. L'activité antagoniste vis-à-vis de FOL a été étudiée sur trois milieux nutritifs :

- Milieu PDA : favorable au développement de FOL ;
- Milieu King B : favorable au développement des *Pseudomonas* fluorescents ;
- Milieu mixte équilibré, composé de parts égales des deux premiers milieux (King B + PDA).

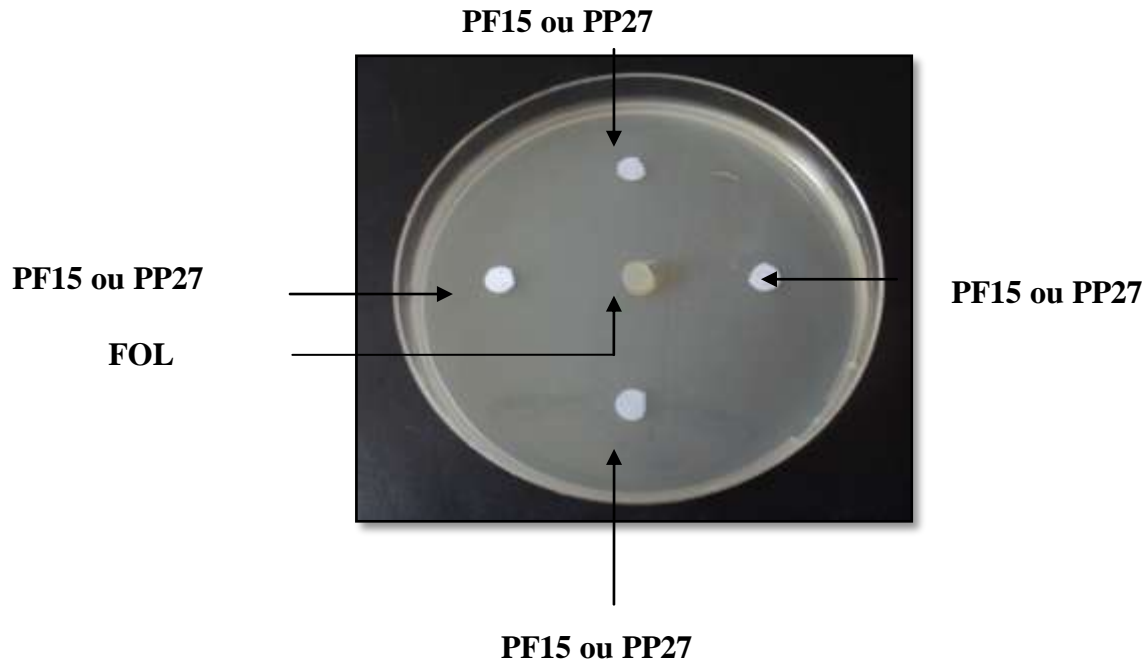


Figure 16: Essai d'antagonisme *in vitro* entre *Pseudomonas* spp. et *Fusarium* (FOL).

L'essai d'antagonisme *in vitro* consiste à mettre au centre d'une boîte de Pétri un disque gélosé de FOL (5 mm de diamètre), issue d'une culture de 7 jours sur milieu PDA (Annexe 1). Quatre disques de papier filtre (5 mm de diamètre) stérile imbibés de crème bactérienne d'une culture de 24 h sur milieu King B (Annexe 1) ont été déposés sur la périphérie à une distance approximativement de 2,8 cm du centre de la boîte de Petri (Fig. 16). Le but de cet essai est de vérifier la capacité des *Pseudomonas* spp. fluorescents à réduire la croissance mycélienne. Après 7 jours d'incubation à 25 °C, les mensurations des diamètres de croissance de FOL ont été effectuées afin d'évaluer les effets de l'activité inhibitrice des PGPRs testés.

3. Essai d'induction de la résistance systémique

3.1. Conditions d'expérimentation

L'étude a été effectuée avec la variété Marmande de tomate, plante hôte de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Le choix de cette variété s'est basé sur sa sensibilité à ce pathogène. Une désinfection de la semence a été réalisée, selon Messiaen et *al.*, (1991), en trempant les graines de tomate dans l'hypochlorite de sodium à 1% pendant 10 min.

Le sol utilisé dans notre expérimentation a été prélevé au niveau de la station expérimentale du département de biotechnologie de l'université de Blida1. Il a été séché et tamisé afin d'éliminer les éléments grossiers et d'assurer une granulométrie homogène. Pour inhiber la

microflore native, le sol a été désinfecté à l'étuve (1 h à 120 °C) selon la méthode adoptée par Gauissou et al. (1998).

L'expérimentation a été réalisée sous serre en polycarbonate, aérée par des fenêtres latérales et chauffée par des radiateurs. Le semis a été réalisé dans des pots marron en plastique de 11,5 cm de hauteur et de 12 cm de diamètre, d'une contenance de 600 g. Les pots ont été désinfectés par l'hypochlorite de sodium (1 %) et leur fond a été recouvert d'une couche de gravier de 1 cm d'épaisseur, pour assurer un bon drainage, et remplis par le substrat désinfecté (2/3 sol + 1/3 tourbe). Le semis a été réalisé avec trois graines par pot.

3.2. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental adopté est en trois blocs aléatoires complets (blocs 1, 2 et 3). Chaque bloc est composé des quatorze traitements étudiés où chaque traitement est représenté par dix plants par bloc, soit 30 plants par traitement. Ce dispositif a été réalisé en deux systèmes : split root et non split root (classique). La distribution des traitements au sein des trois blocs a été effectuée aléatoirement (Fig. 17).

3.2.1. Système split root

Le type split root, est une méthode où le système racinaire est sectionné en deux ou plusieurs parties qui sont exposées à différentes conditions. Cette technique a été utilisée afin de caractériser la réaction d'une plante aux conditions hétérogènes (Sobeih et al., 2004). Le split root permet également de mettre en évidence l'effet d'un traitement localisé sur une partie de la racine et de déterminer les modifications physiologiques et moléculaires induites sur l'autre partie du système racinaire (Pervent et Nacry, 2008).

Dans cette expérimentation, afin de mettre en évidence l'induction de la résistance par les *Pseudomonas* spp. fluorescents, nous avons utilisé le système split root, décrit par plusieurs études (Liu et al., 1995 ; Fuchs et al., 1997 ; Ongena et al., 2000 ; Dutta et al., 2008). Le split root implique l'incision du système racinaire de la plante en deux parties, positionnées respectivement sur deux compartiments, ce qui assure la séparation spatiale et physique entre le pathogène et l'antagoniste, alors que leurs actions s'exercent sur le même plant (Fig. 18) (van Peer, 1991 ; van Loon et al., 1998 ; Pervent et Nacry, 2008).

Au stade 40 jours après le semis, les plants sont dépotés soigneusement, tout en se débarrassant du sol y adhérent. A l'aide d'un scalpel stérile la partie basale de la racine pivotante

est éliminée et une incision est pratiquée à ce niveau, pour obtenir deux touffes racinaires séparées et de taille approximativement similaire. L'endroit de l'incision a été recouvert par un parafilm. Chaque partie est ainsi replantée dans un pot individuel, formant deux lots (A) et (B). Les souches bactériennes ont été appliquées dans le lot (A) selon les traitements, alors que FOL a été inoculé dans le lot (B) (Fig. 18).

Traitements étudiés sont (Fig. 17) :

- **T-** : Témoin négatif (contrôle sain), plants traités avec MgSO_4 stérile dans les lots (A) et (B)
- **T+** : Témoin positif (contrôle malade), plants infectés avec FOL dans les lots (A) et (B)
- **T₁, T₂ et T₃** : Plants bactérisés respectivement avec les souches PF15, PP27 et leur combinaison dans le lot (A) et infectés avec FOL dans le lot (B)
- **T₄ et T₅** : Plants bactérisés respectivement avec les souches PF15 et PP27 dans les lots (A) et (B)
- **T-*** : Témoin négatif (sain); plants traités avec l'eau distillée stérile
- **T+*** : Témoin positif (malade); plants infectés avec FOL
- **T₁*, T₂*, T₃*** : Plants bactérisés respectivement avec les souches PF15, PP27 et leur combinaison et infectés avec FOL
- **T₄* et T₅*** : Plants bactérisés respectivement avec les souches PF15 et PP27

3.2.2. Système non split root

Dans le but de comparer les activités des microorganismes appliqués, nous avons réalisé un système non split (classique) (Fig. 17). Dans ce système, FOL et les souches bactériennes ont été inoculés conjointement. Théoriquement, les actions de biocontrôle et d'ISR peuvent s'exprimer sans distinction.

3.3. Inoculum

PF15 et PP27 ont été cultivées pendant 24 h à 28 °C sur le milieu King B (Annexe1). Les cellules bactériennes ont été mises en suspension dans le MgSO_4 (10 mM) stérile. Pour déterminer la concentration de l'inoculum bactérien, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm (Vijayan et al., 2006). La suspension obtenue a été ajustée à une concentration de 10^8 ufc mL^{-1} et un volume de 20 mL a été appliqué aux plants de tomate au niveau racinaire. Un second inoculum bactérien a été effectué trois jours avant l'application de l'agent pathogène.

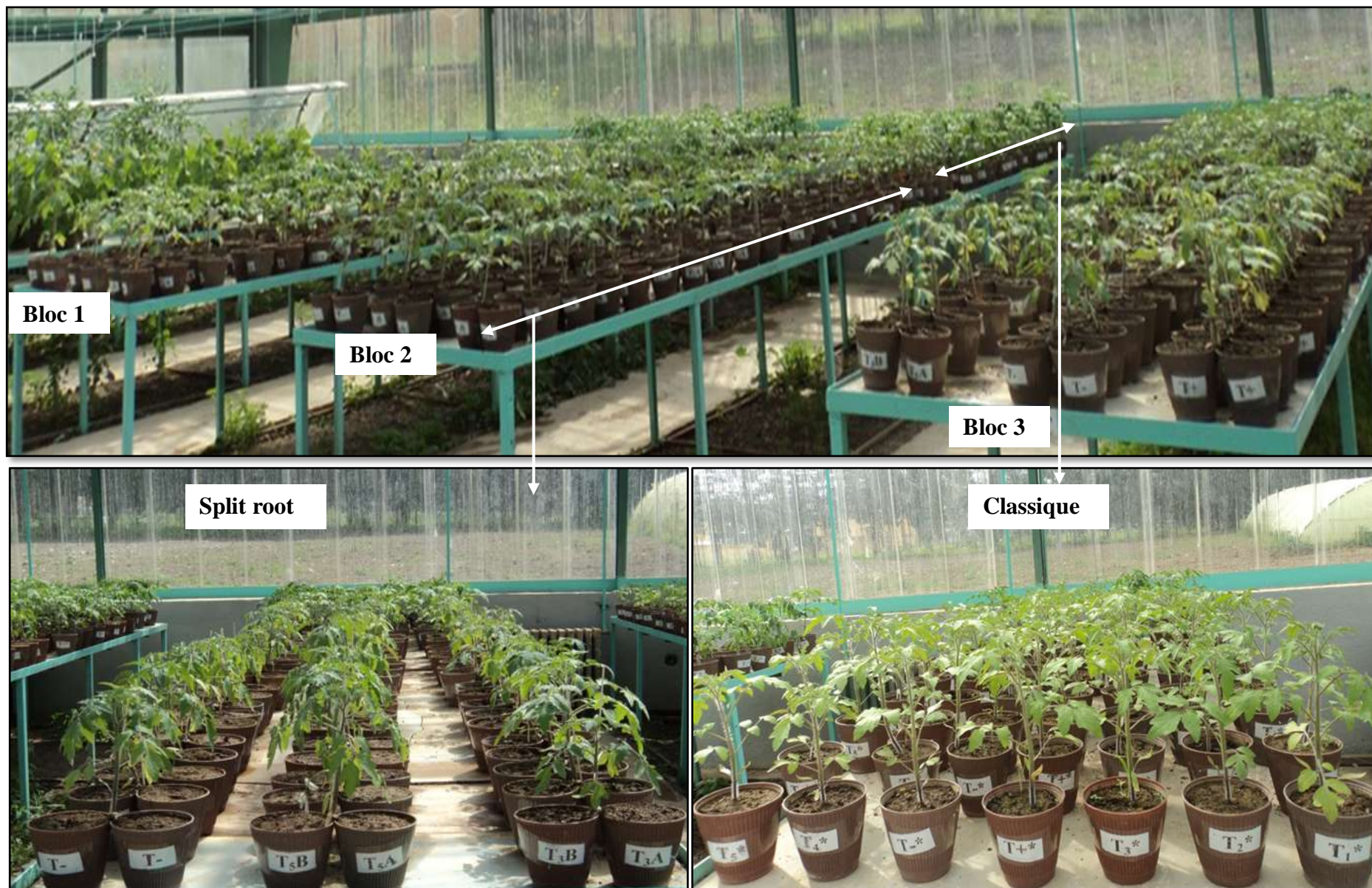


Figure 17: Dispositif expérimental.

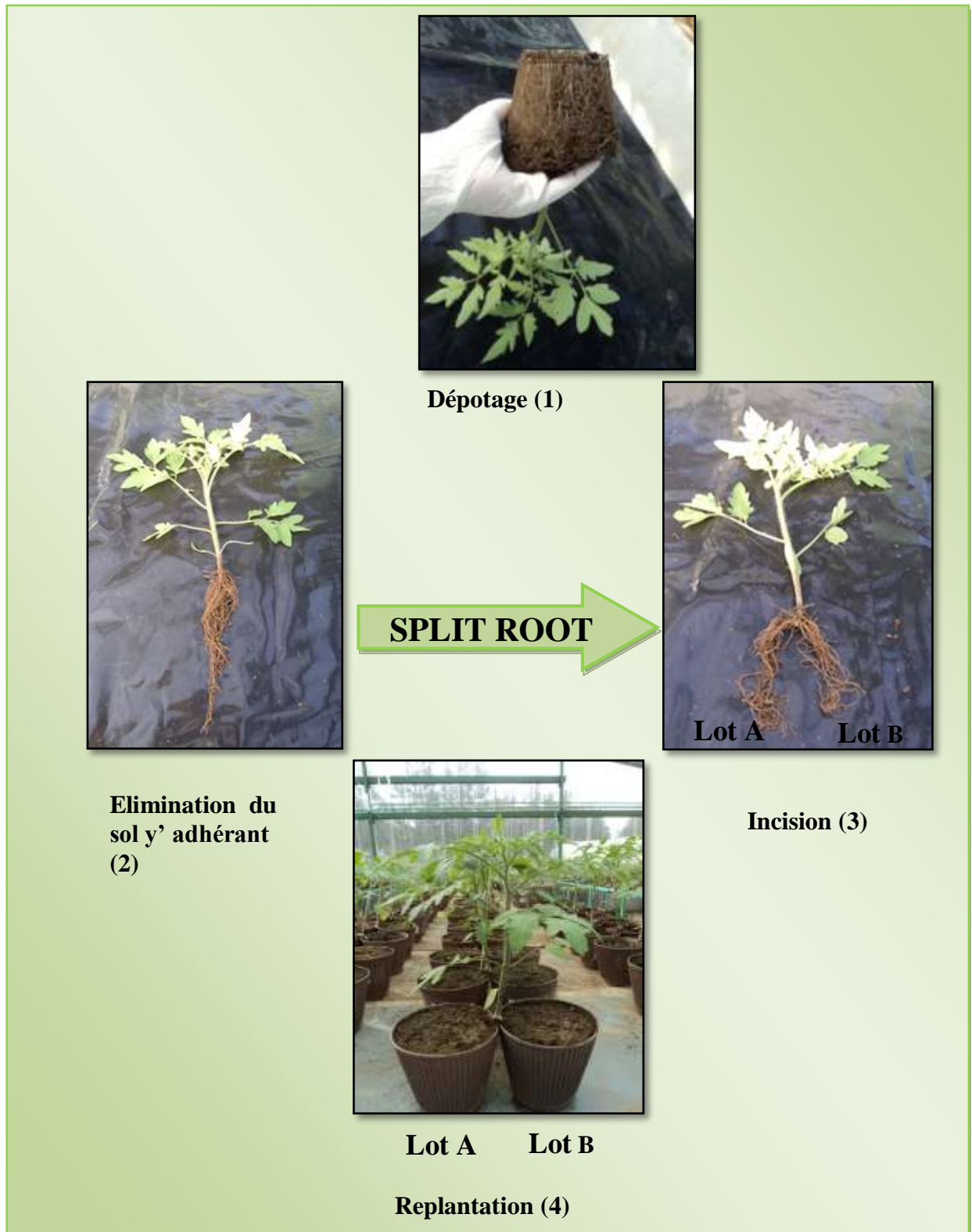


Figure 18 : Système de split root.

Afin de préparer l'inoculum nécessaire à l'infection des plants de tomate, FOL a été d'abord cultivé sur le milieu PDA gélosé (Potato Dextrose Agar) (Annexe 1) et incubé à 25°C pendant 7 jours (Moya et *al.*, 2004). Les cultures obtenues sont raclées et mises en agitation dans le milieu nutritif PDA liquide (Annexe 1) pendant 8 jours (Tello-marquina et Alabouvette, 1984). La suspension obtenue a été ajustée dans du MgSO₄ (10 mM) stérile à une concentration de 10⁶ conidies/mL à l'aide de la cellule de Malasseze. Un volume de 20 mL de cette suspension a été appliqué dans chaque pot. D'après Liu et *al.* (2008), l'infection a été réalisée quatre jours après la bactérisation.

3.4. Paramètres étudiés

Pour mettre en évidence et d'estimer les effets bénéfiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents sur le biocontrôle, l'induction de la résistance systémique et la phytostimulation, nous nous sommes intéressés au suivi de trois types de paramètres : l'évolution de la maladie, les aspects physiologique et biochimique et la croissance végétale.

3.4.1. Evolution de la maladie

Durant notre expérimentation, un suivi quotidien des symptômes a commencé 24 h après l'application de la suspension fongique pendant une période de 43 jours (Tableau 4, Fig. 19). La notation des symptômes typiques de la fusariose vasculaire a été réalisée individuellement sur chaque plant pour évaluer les paramètres de la maladie.

3.4.1.1. Taux d'infection

Ce taux exprime le pourcentage des plants malades, relativement au nombre total des plants (N) observés et le nombre des plants malades (n) (Manikandan et *al.*, 2010).

$$\text{Taux d'infection (\%)} = (\Sigma n / N) \times 100$$

3.4.1.2. Indice de McKinney (Sévérité)

La sévérité de la fusariose vasculaire a été évaluée en calculant l'indice de McKinney (McKinney et *al.*, 1923).

$$\text{Indice de McKinney (\%)} = [\Sigma (f.v) / N .X] \times 100$$

f : Classe de l'infection de 1 à 5 (Tableau 4) , **v** : Nombre des plants par chaque classe, **N** : Nombre total des plants observés, **X** : Valeur la plus élevée de l'échelle d'évaluation (5).

3.4.1.3. Gravité de la maladie

La gravité de la fusariose vasculaire a été calculée dans le but d'estimer la valeur de la classe moyenne des symptômes de la fusariose vasculaire (Ippolito, 2010).

$$G = \Sigma (f.v) / n$$

G : Gravité de la maladie, **f** : Classe de l'infection (1 à 5), **v** : Nombre des plants par chaque classe, **n** : Nombre des plants malades.

Tableau 4 : Echelle d'évaluation des symptômes typiques de la fusariose vasculaire de la tomate.

Classe	Symptômes
« 0 »	Pas de symptômes
« 1 »	Jaunissement unilatéral
« 2 »	Jaunissement généralisé
« 3 »	Flétrissement unilatéral Décoloration longitudinale et unilatérale de la tige
« 4 »	Flétrissement généralisé
« 5 »	Mortalité

3.4.2. Chlorophylle totale

La mesure de la teneur en chlorophylle totale (chlorophylle a et b) a été réalisée selon la méthode de Arnon, (1949). Un mélange de 0,5 g de poudre de feuilles avec 5 mL d'acétone (80%) a été préparé et centrifugé pendant 5 min à 4000 rpm. Les extraits ont été filtrés et l'absorbance a été mesurée dans deux longueurs d'onde (649 nm et 665 nm). La teneur en chlorophylle totale a été calculée et exprimée en mg/g MF. L'indice de chlorophylle a été exprimé comme le rapport entre la teneur en chlorophylle totale chez les plantes traitées par les PGPRs et le contrôle sain.

3.4.3. Biomasse

A la fin de l'expérimentation (43 jours), la biomasse a été analysée afin d'évaluer l'effet phytostimulateur des rhizobactéries appliquées.

Les parties aériennes des plants ont été coupées à partir du collet, la hauteur des plants (du collet à l'apex) et le poids frais des (tige+feuilles) ont été déterminés. La matière sèche de la biomasse aérienne et racinaire a été étuvée à 75 °C jusqu'à ce que le poids se stabilise (3-4 jours).

4. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Statistical Analysis System (Statgraphics plus 5.1). Tous les paramètres étudiés : évolution de la maladie, aspects physiologique et biochimique, et la biomasse végétale ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) et sont comparés par le test de Multiple Range test and Kruskal-Wallis.

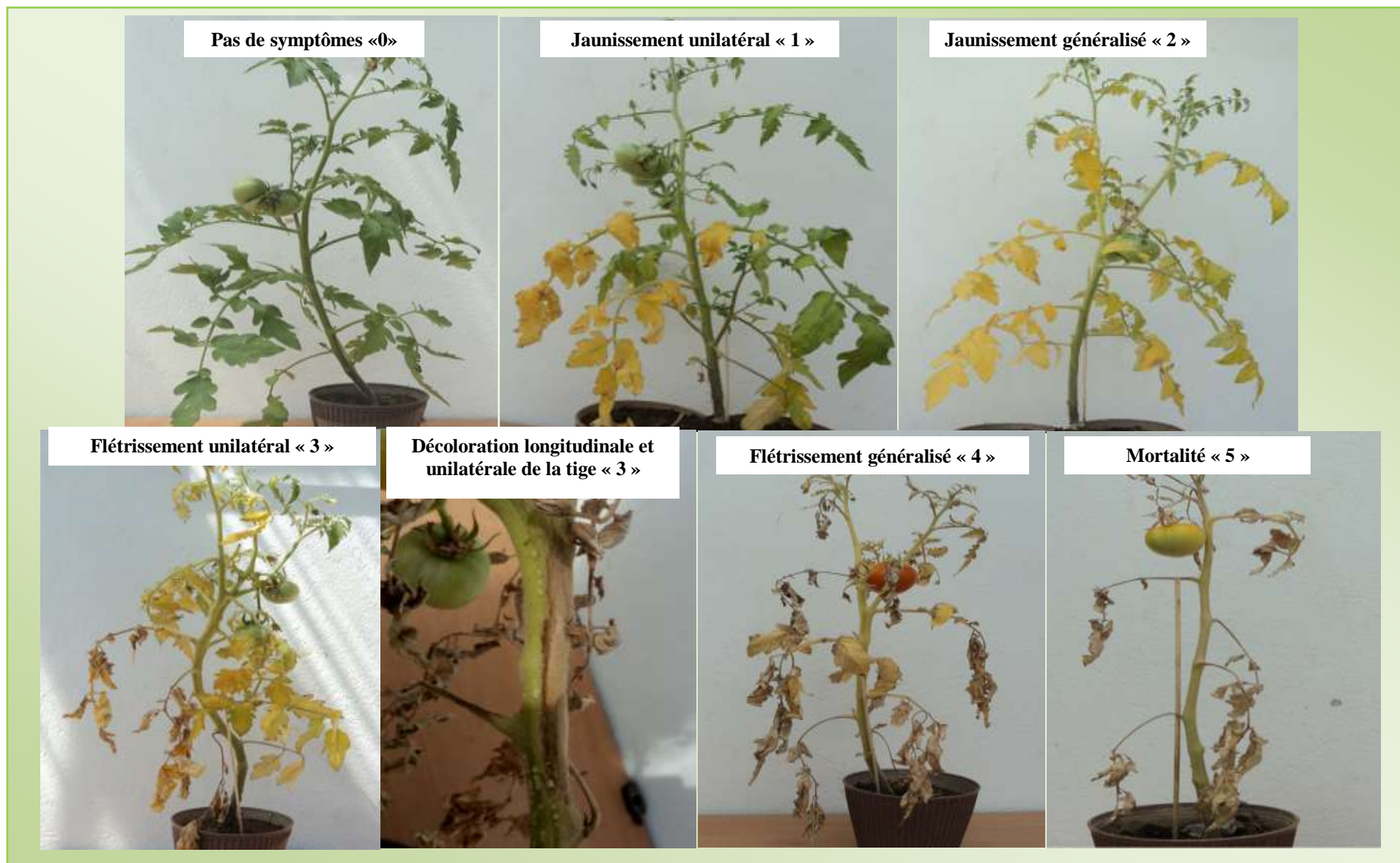


Figure 19 : Symptomatologie typique de la fusariose vasculaire de la tomate.

EXPERIMENTATION 2 : INDUCTION DE LA RÉSISTANCE SYSTÉMIQUE CHEZ LA TOMATE VIS-A-VIS DE LA GALE BACTÉRIENNE

Les essais de cette expérimentation ont été réalisés au niveau du laboratoire de biotechnologie de la rhizosphère de l'Université San Pablo CEU, Madrid, (Espagne) durant les années 2013-2014. Ce travail a été accompli dans le but d'étudier l'effet de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 et ses bioeffecteurs sur la protection de la tomate contre *Xanthomonas campestris*. L'objectif est d'évaluer les changements métabolique, physiologique et transcriptomique induits par l'activation des réactions de défense naturelle chez la tomate. Nous avons essayé de comprendre les interactions qui peuvent corrélérer la croissance, l'activité photosynthétique, les enzymes antioxydantes et les marqueurs de la résistance systémique induite (protéines PRs : *pathogenesis related protein*).

1. Souches bactériennes

La souche PGPR utilisée pour l'induction de la résistance systémique (ISR) chez la tomate est *P. fluorescens* N21.4 (Collection de culture espagnole, CECT 7620), un bacille à Gram négatif, isolé de la rhizosphère de *Nicotiana glauca*, capable de synthétiser des métabolites secondaires, d'induire des réactions de défense chez *Solanum lycopersicum* et *A. thaliana*. Le choix de cette souche a été basé sur sa haute compétence rhizosphérique et sa capacité d'induire la résistance systémique chez plusieurs plantes hôtes (Domenech et al., 2007 ; Ramos Solano et al., 2010 ; Gutierrez et al., 2013).

La souche pathogène utilisée pour l'élicitation des réactions de défense est : *Xanthomonas campestris* CECT 95. Elle a été fournie par la collection de culture espagnole. Cette souche est responsable de la gale bactérienne des solanacées.

2. Bioeffecteurs bactériens

Les effecteurs métaboliques de *P. fluorescens* N21.4 ont été extraits selon la méthode décrite par Gutiérrez Mañero, (2013). N21.4 a été cultivée pendant 24 h à 28°C sous agitation (250 tours par minute) dans un bouillon nutritif pronadisa (laboratoire conda). Le surnageant a été filtré sous une membrane nitrocellulosique, avec des pores de 0,22 µm afin d'éliminer complètement les cellules bactériennes. L'extraction a été poursuivie à partir du liquide

métabolique libre. Le filtrat a été conservé à 20°C pendant 12 h, puis, séché sous vide dans un lyophilisateur (Cryodos 50, Telestar).

Le contenu sec a été dissous dans 10 mL d'acétone, le procédé d'extraction a été poursuivi à partir de la fraction précipitée, en ajoutant 10 mL d'eau et en centrifugeant à 4000 rpm pendant 10 mn à 4 ° C. Le surnageant, contenant les effecteurs solubles dans l'eau a été centrifugé à 4000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Deux fractions ont été obtenues de ce processus ; la fraction des molécules de moins de 10 kDa (petite fraction = P effecteur) et la fraction des molécules de plus de 10 kDa (grande fraction= G effecteur). Les deux fractions ont été lyophilisées avant l'utilisation. Les effecteurs ont été appliqués pour chaque plant à une concentration de 0,01 mg mL⁻¹ dissous dans un tampon de MgSO₄ (10 mM).

3. Plan d'expérimentation

3.1. Action de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 sur l'induction de la résistance systémique

Un total de 48 plantes a été préparé pour chaque traitement, composé de six répétitions de 8 plants. Deux graines ont été semées par pot, remplis de tourbe (Flora Gard) et recouverts d'une couche de vermiculite (Fig. 20).

Quatre traitements ont été définis :

- Témoin négatif (contrôle sain), inoculé avec MgSO₄ (10 mM) ;
- Témoin positif (contrôle pathogène), inoculé avec *Xanthomonas campestris* ;
- Plantes inoculées avec N21.4 ;
- Plantes bactérisées avec N21.4 et inoculées avec l'agent pathogène.

L'expérimentation a été effectuée dans une chambre de culture (18h de lumière, 6h d'obscurité, 28 °C, 60% d'humidité). Pour assurer l'humidité dans le sol, l'arrosage a été effectué une fois par semaine.

3.2. Action des bioeffecteurs bactériens sur l'induction de la résistance systémique

Cette partie a été effectuée en suivant le même protocole expérimental de la première expérimentation. L'objectif est d'élucider la capacité de l'inoculum de N21.4 traité aux UV et de l'extrait bactérien (effecteurs bactériens), d'éliciter des réponses défensives chez les plants de tomate.

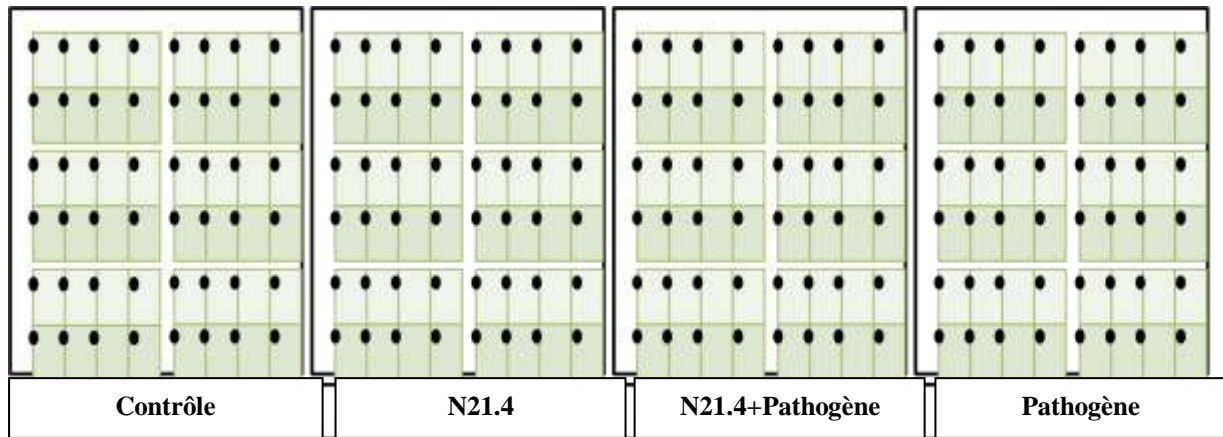


Figure 20 : Dispositif expérimental.

4. Inoculum

L'inoculum de N21.4 et de l'agent pathogène ont été préparés à partir des cultures conservées (-80°C). Ces bactéries ont été ensemencées sur une gélose de PCA (Annexe 1), et incubées à 28°C pendant 24 h. La crème bactérienne est raclée délicatement et mise en suspension dans un tampon stérile de MgSO₄ (10 mM). Les inoculums bactériens ont été ajustés à une concentration de 10⁸ ufc mL⁻¹ (Domenech et *al.*, 2006).

L'inoculum bactérien a été appliqué sur la semence, avec un volume de un mL de la suspension bactérienne (10⁸ ufc mL⁻¹). Quatre semaines après le semis, un second inoculum a été appliqué au niveau racinaire des plantes de tomate, dans un intervalle de quatre jours avant l'inoculation de l'agent pathogène.

Les deux traitements avec l'agent pathogène (N21.4+pathogène et contrôle pathogène) ont été inoculés par pulvérisation avec l'inoculum bactérien (10⁸ ufc mL⁻¹). Les plantes ont été maintenues à 100% d'humidité relative, 24 h avant et après l'application du pathogène pour assurer l'ouverture des stomates.

Dans le deuxième essai, nous avons utilisé un inoculum de N21.4 non viable, afin de tester la capacité des composants structuraux de N21.4 d'induire les réactions de défense de la tomate. Une fois la densité de l'inoculum bactérien a été ajustée à 10⁸ ufc mL⁻¹, la moitié a été utilisée comme inoculum viable et l'autre moitié a été utilisée pour préparer l'inoculum non viable, après traitement à la lumière ultraviolette (UV) pendant 1 h dans des conditions stériles. Il a été confirmé que l'inoculum étant non viable, par culture de la solution bactérienne traitée aux UV 48 h à 28°C.

5. Paramètres étudiés

5.1. Symptomatologie

Les symptômes de la maladie ont été observés une semaine après l'application de l'agent pathogène. Les résultats sont exprimés en incidence de la maladie ; calculée comme le nombre de feuilles présentant des spots par plante sur le nombre total de feuilles de chaque plante.

5.2. Chlorophylle totale

La mesure de la teneur en chlorophylle totale (chlorophylle a et b) a été réalisée selon la méthode de Arnon, (1949), (cf : page 62). L'indice de chlorophylle a été exprimé comme le rapport entre la teneur en chlorophylle totale chez les plantes traitées par les PGPRs et le contrôle sain.

5.3. Mesure de fluorescence du photosystème II (PSII)

La fluorescence de la chlorophylle a été mesurée avec un fluorimètre (Pulze Amplitude modulated, PAM), (Hansatech FM2, Hansatech, Inc. UK) (Fig. 21). Les mesures ont été effectuées après 1 h d'adaptation des feuilles à l'obscurité. Les paramètres évalués sont : la fluorescence minimale (F_0), la fluorescence maximale (F_m) la fluorescence variable (F_v), le rendement quantique maximale du photosystème II (F_v/F_m), l'efficacité photosynthétique du PSII (Φ_{PSII}) et le coefficient de dissipation non-photochimique (NPQ, Non-photochemical quenching). Toutes les mesures ont été effectuées sur 10 plantes à raison de trois feuilles par plante.

5.4. Dosage des activités enzymatiques

Le dosage des enzymes antioxydantes et hydrolytiques a été déterminé dans trois intervalles de temps (24 h, 48 h, 72 h) après l'inoculation de l'agent pathogène. Les activités enzymatiques antioxydantes déterminées sont: ascorbate peroxydase (APX, CE 1.11.1.11), gaïacol peroxydase (GPX, EC 1.11.1.7), glutathion réductase (GR, EC 1.6.4.2), superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), polyphénol oxydase (PPO, EC 1.14.1.8), (Garcia-Limones et *al.*, (2002). Les enzymes hydrolytiques sont : β -1,3-glucanase (PR2, EC 3.2.1.6) et la chitinase (PR3, EC 3.2.1.14) (Boller, 1993).



Figure 21: Dispositif de mesure de la fluorescence chlorophyllienne.

Pour le dosage colorimétrique des activités enzymatiques, l'extraction a été réalisée comme suit : 0,3 g de poudre de feuilles a été remis en suspension dans 1 mL de tampon de phosphate de potassium (50 mM), EDTA (pH 7.5, 1 mM), PMSF (1 mM), ascorbate de sodium (5 mM) ; puis centrifugé pendant 10 min à 14000rpm.

Pour l'activité enzymatique de la chitinase et la β -1,3-glucanase, un tampon différent a été utilisé pour remettre en suspension les échantillons de feuilles ; 0.3 g de poudre de feuille a été mixé avec 1 mL de tampon acétate de sodium (0,1 M, pH 5,2). Toutes les étapes ci-dessus ont été effectuées à 4°C.

La mesure de la quantité de protéine totale dans les extraits foliaires a été effectuée en suivant le protocole de Bradford: 250 μ l de réactif de Bradford, 5 μ l de l'extrait de l'échantillon et 5 μ l de BSA (Bovine serum albumin), les dilutions ont été inoculées dans une plaque ELISA (96 puits) et mises en incubation pendant 45 min à la température ambiante. L'absorbance a été mesurée avec spectrophotomètre à 595 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée à partir de BSA. La teneur en protéine totale a été exprimée en $\text{mg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (Bradford, 1976).

5.4.1. Ascorbate peroxydase (APX)

L'activité de l'APX a été réalisée selon la méthode décrite par Nakano et Asada (1981). Le mélange réactionnel est constitué de tampon de phosphate de potassium (50 mM, pH 7.0), ascorbate de sodium (0,25 mM), 5 μ l H_2O_2 et 100 μ l d'extrait enzymatique dans un volume final de 1,2 mL. La réaction a été démarrée par l'addition de H_2O_2 et l'oxydation de

l'ascorbate a été déterminée par la mesure de la densité optique à la longueur d'onde 290 nm ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). L'unité de l'activité d'APX est définie comme la quantité d'enzyme qui oxyde une $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ de l'ascorbate.

5.4.2. Gaïacol peroxydase (GPX)

L'activité de la GPX a été réalisée selon la description de Srivastava et Van Huystee (1977). Le mélange réactionnel est composé de tampon : de phosphate de potassium (100 mM, pH 6,5), de gaïacol (15 mM), H_2O_2 (0,05%), et de 200 μl d'extrait enzymatique dans un volume final de 1,51 mL. La réaction a été démarrée par l'addition de H_2O_2 et l'oxydation de gaïacol a été déterminée par la mesure de la densité optique à la longueur d'onde 470 nm. L'unité de GPX est définie comme la quantité d'enzyme qui produit 1 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$ de gaïacol oxydé.

5.4.3. Glutathion réductase (GR)

L'activité de GR a été réalisée selon la méthode de Schaedle et Bassham (1977) avec quelques modifications. Le mélange réactionnel est constitué de : tampon de phosphate de potassium (50 mM, pH 7,5), MgCl_2 (3,5 mM), NADPH (0,15 mM), de glutathion oxydé (0,5mM) et 180 μl d'extrait enzymatique dans un volume final de 1,2 mL. La réaction a été démarrée par l'addition de NADPH. L'oxydation de ce composé a été déterminée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm. L'unité de GR est définie comme la quantité d'enzyme qui oxyde une $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$ de NADPH.

5.4.4. Superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de SOD a été déterminée selon la méthodologie décrite par Giannopolis et Ries (1977). Cette activité a été déterminée à partir de l'inhibition de la réduction photochimique de nitrobluetetrazolium (NBT) en présence de riboflavine en suivant les indications du kit de détection de l'activité de SOD (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japon). L'unité d'activité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme capable d'inhiber le taux de réduction du NBT (50%).

5.4.5. Polyphénol oxydase (PPO)

PPO a été déterminée comme décrit Arora, (1985) ; Mohammadi, 2002). 1 g de poudre de feuilles a été homogénéisé dans 5 mL de tampon de phosphate de sodium (1 M, pH 7) et centrifugé 10 mn à 4000 rpm à 4 °C. Le surnageant a été utilisé comme source d'enzyme. Le mélange réactionnel est composé de 0,5 mL d'extrait enzymatique, 0,9 mL de tampon citrate de phosphate (pH 6,4, 25 mM) et 0,4 mL de L-proline. Pour démarrer la réaction, il a été ajouté 0,3 mL de catenol et la variation de la densité optique a été enregistrée à une longueur d'onde de 515 nm. En utilisant la courbe standard, l'activité enzymatique a été exprimée en mol mL⁻¹.

5.4.6. β -1,3-glucanase

L'activité de β -1,3-glucanase a été réalisée en suivant la méthode décrite par Boller (1993). La réaction a été initiée en ajoutant 62,5 μ l d'extrait protéique et 62,5 μ l de β -1,3-glucane (4%). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 10 min à 40 °C, la réaction a été arrêtée par l'addition de 375 μ l d'acide dinitrosalicylique suivie par l'incubation dans l'eau bouillante pendant 5 min. L'absorbance a été mesurée à 500 nm. La courbe standard a été effectuée avec des dilutions de glucose suivant la même procédure. L'unité d'activité de β 1,3-glucanase est définie comme la quantité d'enzyme qui produit 1 μ mol.min⁻¹ de sucre réducteur.

5.4.7. Chitinase

L'activité de la chitinase a été réalisée comme décrit Boller et *al.* (1993). La réaction a été initiée par l'addition de 665 μ l de tampon d'acide citrique (0,1 mM), de phosphate (0,1 mM), d'acide de sodium (pH 5,2), 335 μ l d'extrait enzymatique et 335 μ l de chitine colloïdale (0,5%). Après incubation à 37 °C pendant 20 min sur un agitateur, la réaction a été arrêtée par chauffage dans l'eau bouillante pendant 5 min. Les sucres réducteurs ont été déterminés par l'augmentation de l'absorbance à 420 nm. La courbe standard a été effectuée avec de la N-acétyl glucosamine. Une unité d'activité de chitinase est définie comme la quantité d'enzyme qui produit des sucres réducteurs (1 μ mol.min⁻¹).

5.5. Transcriptome

L'expression de gènes marqueurs de la résistance systémique, les protéines PRs (Pathogenesis-Related) : PR1, PR2 et PR3, a été vérifiée par PCR quantitative (Real Time-PCR) (Tableau 5). L'extraction de l'ARN des échantillons de feuilles de tomate obtenues à partir de chaque traitement et dans les trois intervalles de temps (24 h, 48 h, 72 h) a été réalisée par le kit Pure Link™ Micro Kit (Invitrogen) (Annexe 3).

Une analyse quantitative et qualitative de l'ARN extrait a été réalisée par NanoDrop ; en mesurant la densité optique à des longueurs d'onde de 230 nm et 260 nm. La retrotranscription. L'ADNc (ADN complémentaire) a été réalisée à partir de 1000 ng d'ARN total en utilisant le kit de iScript ADNc (Bio-Rad) (Annexe 3).

RT-PCR a été réalisée en utilisant le SYBR Green détection, iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, MiniOpticon Real-Time PCR system (Bio-Rad). Il a été utilisé trois répétitions biologiques et trois répétitions techniques par traitement.

Le programme utilisé pour la PCR en temps réel a été : 3 min dénaturation initiale à 95°C, suivie de 40 cycles de dénaturation pendant 20 s à 95 ° C, anelage pendant 20 s (PR1: 51,5 ° C; PR2: 51,5 ° C; PR3 : 58 ° C; Ubi3: 51,5 ° C) et l'extension de 20 s à 72 ° C. La spécificité des amplicons a été vérifiée par analyse de courbe de fusion. L'expression relative a été calculée en comparaison avec la référence Ubi (Tableau 5).

6. Analyse statistique

Une analyse de la variance a été réalisée pour évaluer les effets de N21.4 sur tous les paramètres étudiés : la symptomatologie, l'activité photosynthétique, le métabolome et le transcriptome. L'analyse a été réalisée avec le programme Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp).

Tableau 5 : Gènes PRs et contrôle (Song et *al.*, 2010).

Noms	Amorces
PR1	sense, 5'- GCCAAGCTATAACTACGCTACCAAC-3' antisense, 5'-GCAAGAAATGAACCACCATCC- 3'
PR2	sense, 5'-GGACACCCTTCCGCTACTCTT-3' antisense, 5'-TG TTCCTGCCCTCCTTTC-3'
PR3	sens 5'-AACTATGGGCCATGTGGAAGA-3' antisense, 5'-GGCTTTGGGGATTGAGGAG-3'
Ubi3 (référence)	sense, 5'-TCCATCTCGTGCTCCGTCT-3' antisense, 5'- GAACCTTTCCAGTGTCATCAACC-3'

EXPERIMENTATION 3 : INDUCTION DE LA TOLÉRANCE CHEZ *Arabidopsis thaliana* (Col-0) PAR LES *Pseudomonas* FLUORESCENTS ET *Rhizobium* spp.

Cette expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire de l'évolution moléculaire d'*Arabidopsis thaliana* de l'université de Cologne (Allemagne) durant l'année 2016. L'objectif de cet essai préliminaire est de visualiser les changements phénotypiques d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 prétraitées avec PGPRs et exposées à un stress salin.

1. Souches bactériennes

Deux souches de *Rhizobium* : *Rhizobium léguminosarum* (R1), *Sinorhizobium meliloti* (R4) ont été obtenues de l'institut Agro-biotechnologique de Cordoba (Espagne). Deux souches locales de *Pseudomonas* : *Pseudomonas fluorescens* PF.64 (P2) et *Pseudomonas fluorescens* BB.10 (P3) ont été élaborées par le laboratoire de Protection et de Valorisation de Ressources Agro-Biologiques. Faculté SNV, (Université Saad Dahleb, Blida 1).

2. Plan d'expérimentation

Cet essai a été réalisé sur *Arabidopsis thaliana* (Col-0), la semence a été obtenue du laboratoire de l'évolution moléculaire de l'université de Cologne (Allemagne). Les graines ont été stratifiées à 4°C pendant 4 jours et transférées dans des pots (7cm/7cm) remplis d'un substrat (mélange de tourbe et de vermiculite). Deux graines ont été semées par pot; il a été utilisé 40 répétitions par traitement regroupés en 4 blocs (dix plants par bloc) soit un totale de 400 plants pour tous les traitements (Fig. 22). Les plateaux contenant les pots ont été transférés dans une chambre de culture dans des conditions de jour long (18 h de lumière et 6 h d'obscurité, 60 % d'humidité, température, 20 °C). Les plateaux ont été randomisés deux fois par jours.

Dix traitements sont définis : cinq traitements sans stress salin, afin d'évaluer l'effet des ces rhizobactéries sur la croissance :

- Contrôle négatif : plantes traitées avec l'eau ;
- R1 : plantes traitées avec *Rhizobium léguminosarum* (R1) ;
- R4 : plantes traitées avec *Sinorhizobium meliloti* (R4) ;
- P2 : plantes traitées avec *Pseudomonas fluorescens* PF.64 (P2) ;

- P3 : plantes traitées avec *Pseudomonas fluorescens* BB.10 (P3).

Concernant l'évaluation de l'effet des PGPRs sur la tolérance au stress salin, les mêmes traitements ont été définis ; les plantes ont été irriguées avec une solution de chlorure de sodium de 120 mM dans un intervalle de deux jours durant toute l'expérimentation.

La concentration de 120 mM de NaCl a été définie après un essai préliminaire où les plantes d' *A. thaliana* ont été traitées avec des concentrations de 50 mM, 100 mM ou 150 mM de chlorure de sodium. La concentration de 50 mM permet aux plantes de survivre avec un degré de symptomatologie, par contre à une concentration de 100 mM et de 150mM, les plantes ne peuvent pas survivre. Pour cela, il a été défini la concentration de 120 mM.

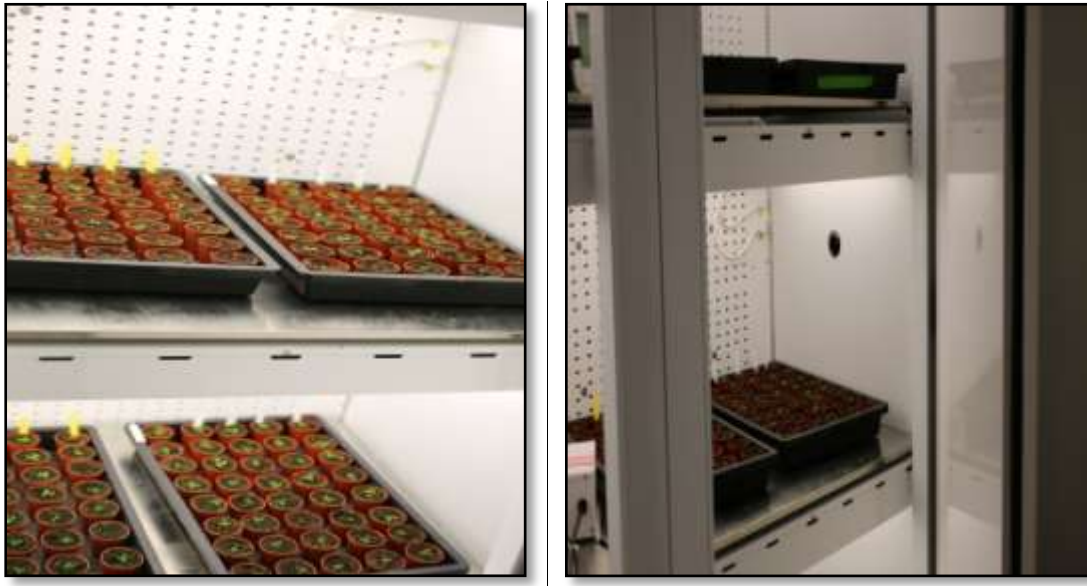


Figure 22 : Dispositif expérimental.

3. Inoculum

Les rhizobactéries phytobénéfiques (R1, R4, P2, P3) ont été cultivées pendant 24 h à 28 °C sur le milieu King B (Annexe1) pour les pseudomonads et YEM pour les *Rhizobium* (Annexe1). La crème bactérienne est raclée délicatement et mise en suspension dans un tampon stérile de MgSO₄ (10 mM). L'inoculum bactérien a été ajusté à la concentration de 10⁸ ufc mL⁻¹ et un volume de 2 mL a été appliqué sur les graines. Un second inoculum a été appliqué après deux semaines. Quatre jours après, une solution de chlorure de sodium (120 mM) a été appliquée avec un volume de 5 ml dans un intervalle de deux jours jusqu' au 60^{ème} jour après germination.

4. Paramètres étudiés

4.1. Symptomatologie

La tolérance des plants d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 au stress salin a été évaluée sur la base d'une échelle de quatre degrés symptomatologiques avec un suivi quotidien de l'évolution de la maladie (Fig. 23) (Chan et al., 2011).



0: Pas de symptôme 1: Feuilles pourpres 2: Feuilles jaunes 3: Feuilles flétries 4 : Plante morte

Figure 23 : Echelle symptomatologique de stress salin chez *Arabidopsis thaliana*.

4.2. Evaluation de la croissance

Le diamètre de la rosette et le nombre de feuilles ont été évalués. Des photos des plateaux ont été prises par une caméra digitale à une distance de 90 cm chaque trois jours. Par la suite ces images ont été analysées par le logiciel Imag J. La surface foliaire a été évaluée par un scanner Epson perfection V700 photo.

4.3. Evaluation de l'architecture racinaire

Cet essai a été réalisé pour évaluer l'effet des PGPRs sur l'architecture racinaire d'*Arabidopsis thaliana* Col-0. Il a été utilisé des boîtes de Petri (12cm/12cm). Les plantes ont été cultivées sur un milieu MS 1% (Annexe 1) avec 1% saccharose et 1% Agar. Les boîtes de Petri ont été positionnées verticalement dans une chambre de culture dans des conditions de jour long (18h de lumière et 6 h d'obscurité, 60% d'humidité, température 22°C). Les observations ont été réalisées après 25 jours.

5. Analyse statistique

Une analyse de la variance a été réalisée pour évaluer les effets de N21.4 sur le taux des plantes survivantes, la croissance et l'architecture racinaire. L'analyse a été réalisée avec le programme Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp).

EXPERIMENTATION 1 : INDUCTION DE LA RESISTANCE SYSTEMIQUE CHEZ LA TOMATE VIS-A-VIS DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE

1. Antagonisme *in vitro*

L'effet antagoniste des PGPRs a été évalué à travers la réduction des diamètres de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Le résultat de cet essai préliminaire a montré une activité inhibitrice appréciable et variable selon les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et selon les milieux de culture. Globalement les taux d'inhibition sont relativement élevés (Fig. 24).

Comparativement à la croissance mycélienne du témoin en l'absence des antagonistes, *Pseudomonas fluorescens* PF15 a induit une activité inhibitrice notable (47%) sur les milieux KB et mixte (PDA+KB). *Pseudomonas putida* PP27 n'a montré aucun effet d'antagonisme sur ces mêmes milieux et il a été noté une réduction significative sur le milieu KB (Figs. 24, 25).

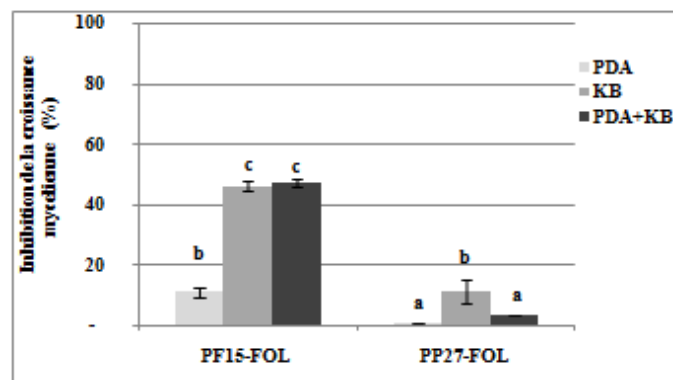


Figure 24: Inhibition de la croissance mycélienne (%) par *Pseudomonas fluorescens* PF15, *Pseudomonas putida* PP27 et *Fusarium lycopersici* f. sp. *oxysporum*. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent des différences significatives ($P < 0,05$).

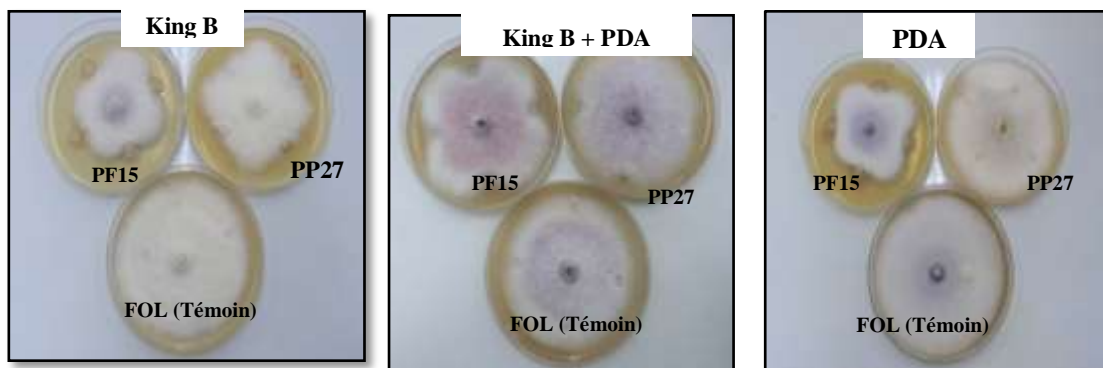


Figure 25: Antagonisme *in vitro* entre *Pseudomonas fluorescens* PF15, *Pseudomonas fluorescens* PP27 et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL).

2. Symptomatologie

Le premier degré symptomatologique de la fusariose vasculaire s'est manifesté par un jaunissement unilatéral au niveau des folioles, des feuilles et du plant entier. Dans certains cas, un jaunissement généralisé a été observé où les parties jaunies finissent par flétrir (Fig. 26).

Chez les plants bactérisés, les symptômes de jaunissement et de flétrissement ont été observés uniquement aux premiers étages foliaires selon les traitements (Figs. 26A, 27), contrairement aux témoins positifs où ces symptômes sont plus développés (Fig. 26B). Nous avons observé une décoloration longitudinale de la tige, un brunissement et une dégradation des vaisseaux vasculaires, qui sont plus accentués chez les témoins positifs par rapport aux plants bactérisés. De même, chez les plants malades, en plus des symptômes aériens, un brunissement à un noircissement des racines sont constatés en plus d'une dégradation partielle et même totale des chevelus racinaires (Figs. 26A, 26B).



Figure 26: Symptomatologie de la fusariose vasculaire. **A** : Symptômes de la fusariose vasculaire sur des plants de tomate traités avec *Pseudomonas* spp. fluorescents et inoculés avec FOL. **B** : Symptômes de la fusariose vasculaire sur des plants de tomate traités avec FOL.



Figure 27: Bioprotection des plants de tomate induite par *Pseudomonas* fluorescents contre la fusariose vasculaire. **T+**: plante inoculée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), **T3***: plante en système non split root traitée avec *Pseudomonas fluorescens* PF15, *Pseudomonas putida* PP27 et infectée avec FOL. **T3A**: plante traitée avec PF15 et PP27 dans la partie A, **T3B**: plante inoculée avec FOL dans la partie B ; plante de tomate en système split root.

3. Evolution de la maladie

Les notations individuelles des symptômes, effectuées sur chaque plant, ont permis d'exprimer en pourcentage l'évolution du taux d'infection, l'indice de McKinney (sévérité) et la gravité de la fusariose vasculaire, durant 43 jours après l'application de l'agent pathogène, soit 95 jours de végétation.

3.1. Taux d'infection

Le suivi du taux d'infection a montré une différence entre les traitements et entre les deux systèmes étudiés, split root (Fig. 28A) et non split root (Fig. 28B). Les plantes traitées par les *Pseudomonas* fluorescents et inoculées avec l'agent pathogène ont enregistré un retard dans l'apparition des symptômes et une faible cinétique de progression de la maladie dans les deux systèmes étudiés, par rapport au contrôle pathogène. Ce dernier a révélé une évolution rapide et vigoureuse, principalement durant les premiers jours de l'apparition de la maladie (Fig. 28).

3.2. Indice de Mckinney

Malgré la progression des taux d'infection, la sévérité de la fusariose a été moins évoluée. Après 41 jours de l'inoculation avec l'agent pathogène, les plantes bactérisées ont montré une réduction de l'indice Mckinney (72%) et une suppression du taux de maladie (36%) (Fig. 28).

Globalement, tous les traitements ont montré des taux approximativement similaires en suppression de la maladie. Les traitements réalisés en split root ont présenté une meilleure bioprotection par rapport au système non split root (Fig. 29A). Les plantes du système split root ont montré un flétrissement unilatéral alors, que les plantes du système non split root ont révélé un jaunissement généralisé par rapport au contrôle pathogène où ils ont atteint des stades avancés de mortalité (Figs. 27, 29B).

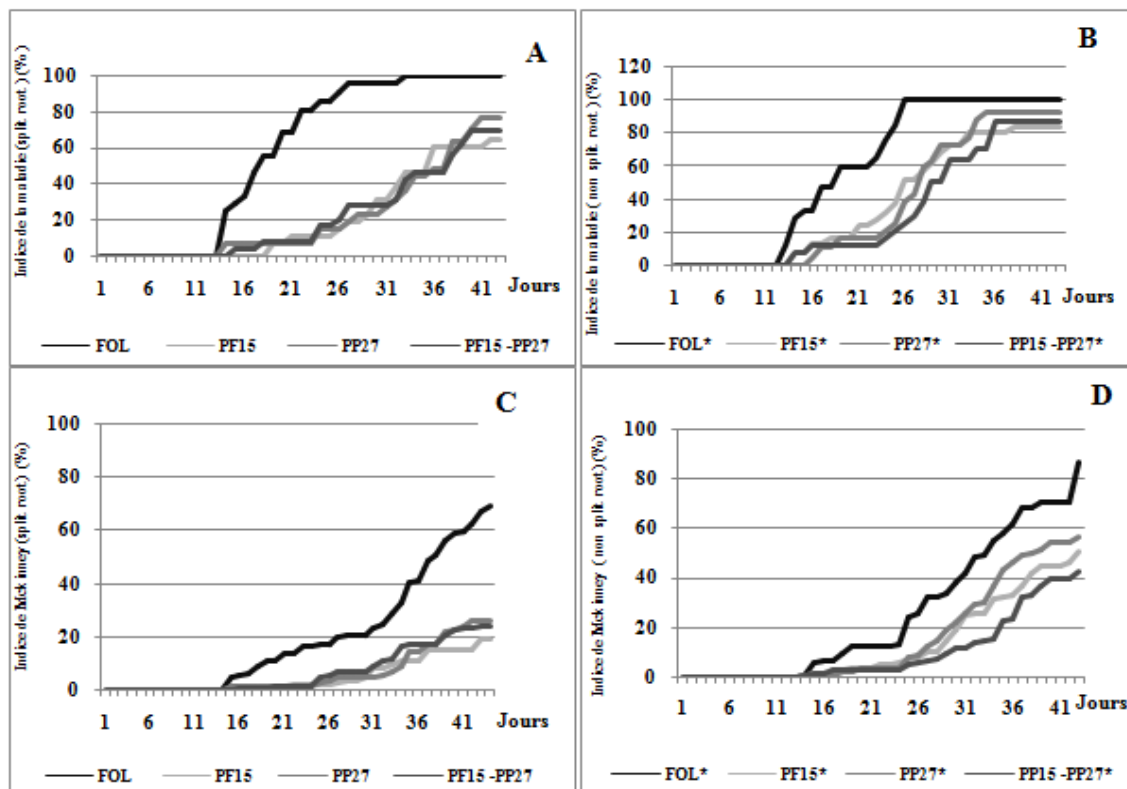


Figure 28: Evolution de la fusariose vasculaire chez la tomate. Les plantes traitées avec *Pseudomonas fluorescens* PF15, *Pseudomonas putida* PP27 ou leur combinaison et inoculées avec *Fusarium lycopersici* f. sp. *oxyporum*. **A** : Evolution de l'indice de la maladie en système split root, **B** : Evolution de l'indice de la maladie en système non split root. **C** : Evolution de l'indice Mckinney en split root. **D** : Evolution de l'indice Mckinney en système non split root. * Plantes en système non split root.

3.3. Gravité

L'expérimentation réalisée a montré différentes classes symptomatologiques de la fusariose vasculaire. *Pseudomonas fluorescens* réduisent significativement la maladie et le constat montre nettement que les symptômes sont très développés chez les plantes traitées uniquement par l'agent pathogène (Fig. 29B).

L'analyse de la variance des taux finaux de la gravité (Fig. 29B) montre une différence très hautement significative entre les traitements. Les plants bactérisés ont présenté une classe moyenne en degrés symptomatologiques (2 à 3) nettement inférieure à celle des témoins positifs (4 à 5). Une supériorité de la gravité s'est manifestée en système non split root, où nous avons enregistré un flétrissement unilatéral contrairement au niveau du système split root. Dans ce dernier système, la symptomatologie s'est stabilisée en jaunissement généralisé sans évolution grave vers l'état de flétrissement.

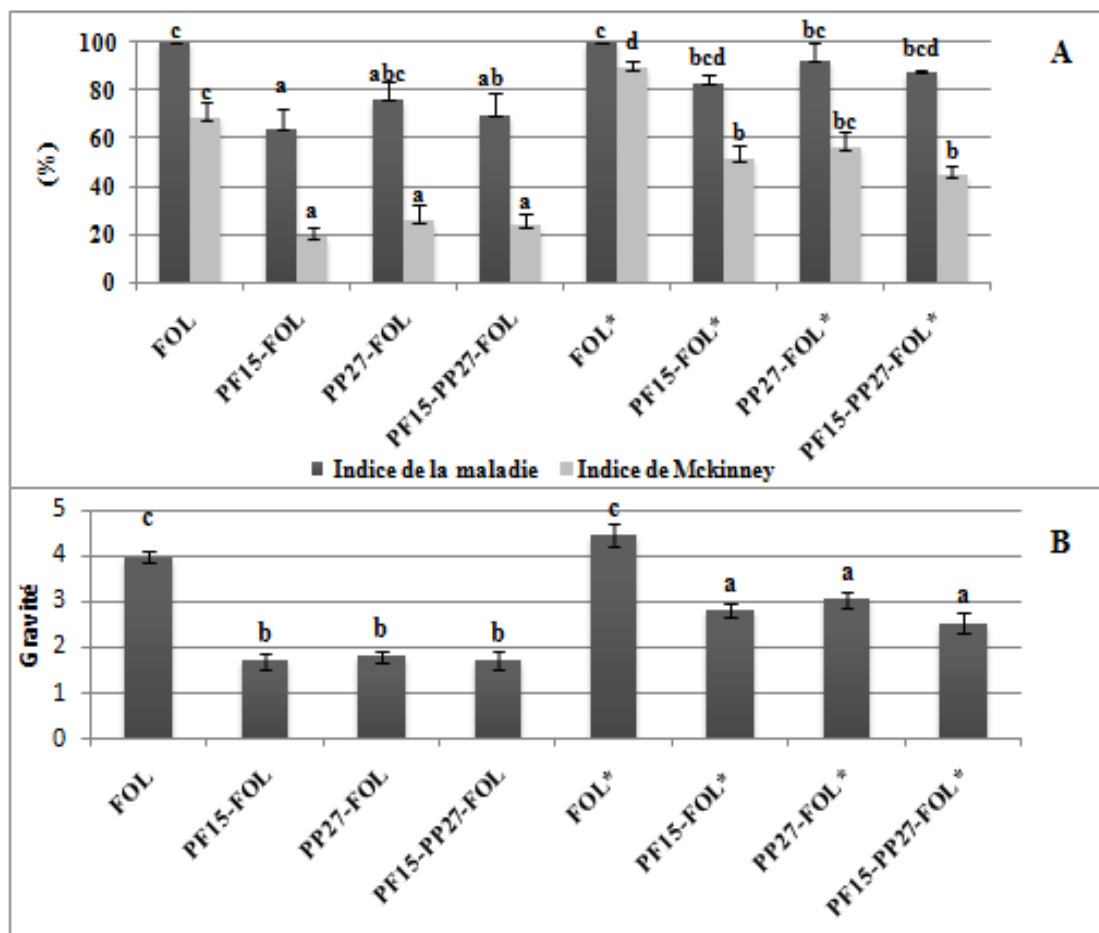


Figure 29: A) Taux finaux de l'indice de la maladie et l'indice de McKinney. B) Gravité de la fusariose vasculaire. Ces paramètres ont été évalués 41 jours après l'inoculation par le pathogène, chez les plants traités avec *Pseudomonas fluorescens* PF15, *Pseudomonas putida* PP27 ou leur combinaison. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent des différences significatives ($P < 0,05$). * Les plantes en système non split root.

4. Chlorophylle totale

Les rhizobactéries phyto-bénifiques PF15 et PP27 ont induit un effet positif sur l'augmentation des pigments chlorophylliens chez les plantes de tomate dans les deux systèmes étudiés. Le contrôle pathogène a révélé une réduction notable de la chlorophylle totale (Fig. 30). La performance la plus marquante a été enregistrée en système non split root chez les plants infectés par FOL et bactérisés avec PP27 (Fig. 30A).

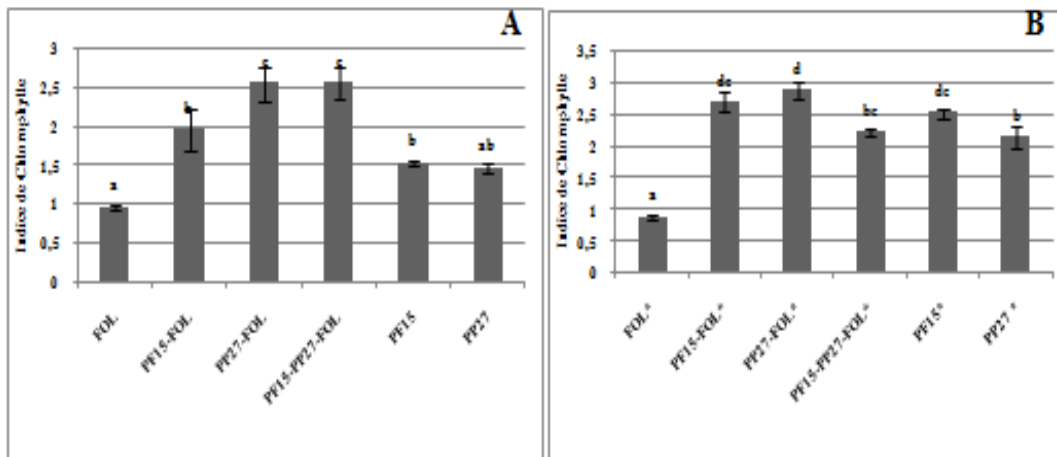


Figure 30: Indice de chlorophylle totale ; rapport entre les plants de tomate stressés et le contrôle sain. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent des différences significatives ($P < 0,05$). * Plantes en système non split root.

5. Proline

La bactérisation des plants de tomate avec les *Pseudomonas* spp. fluorescents au niveau racinaire a montré une augmentation significative en proline au niveau foliaire (Fig. 31). Les teneurs en ce métabolite les plus élevées ont été enregistrées trois jours après la bactérisation et/ou l'infection avec des niveaux maximums de $0.15 \mu\text{g}/\text{mg}$ MF. *Pseudomonas fluorescens* PF15 a montré la meilleure performance dans les deux systèmes (Figs. 31A, 31B).

L'accumulation en proline chez la plupart des traitements a commencé de baisser et a atteint le niveau le plus faible le 25^{ème} jour après bactérisation. Relativement, les témoins malades ont présenté des teneurs en proline plus élevées en comparaison avec les témoins sains (Figs. 31A, 31B).

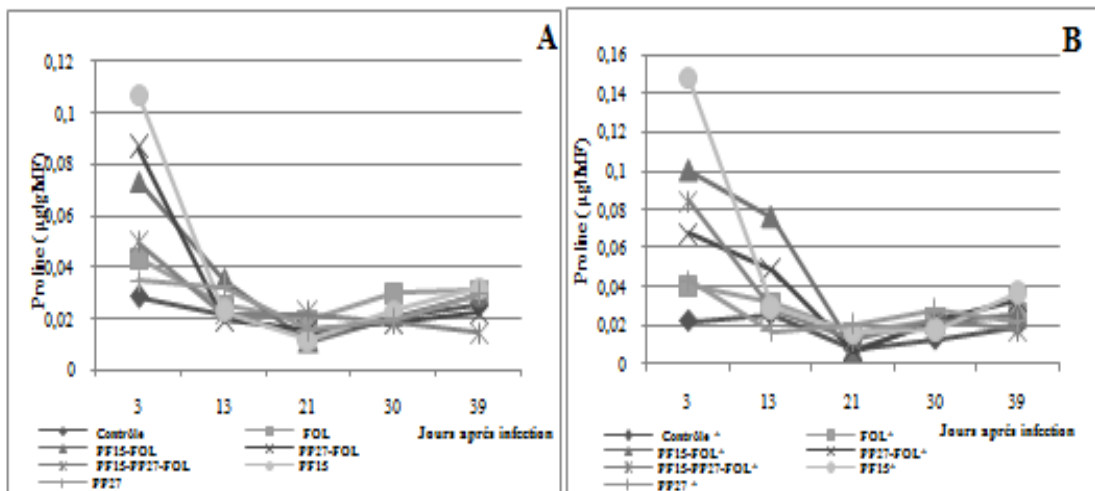


Figure 31: Teneur en proline chez les plants traités avec *Pseudomonas fluorescens* PF15, *Pseudomonas putida* PP27 et leur combinaison, et inoculés avec FOL. A : Traitements en système split root. B : Traitements en système non split root.

6. Biomasse

Les *Pseudomonas* fluorescents PF15 et PP27 appliquées ont stimulé la croissance des plantes, en induisant des changements en poids frais et sec. Les plantes bactérisées et infectées ont montré une croissance aérienne similaire que les plantes saines. Avec la souche PP27, il a été noté la meilleure amélioration de la croissance de la tomate dans le système split root. Le contrôle pathogène a révélé une baisse significative de la croissance (Fig. 32A, 32B).

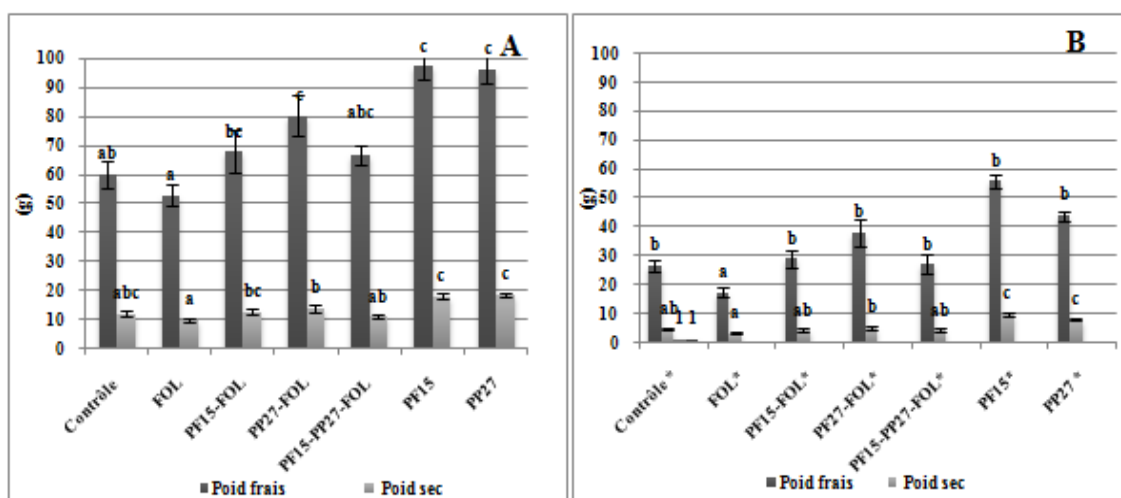


Figure 32 : Poids frais et sec de la partie aérienne (g) des plants de tomate traités avec *Pseudomonas fluorescens* PF15, *Pseudomonas putida* PP27, ou leur combinaison et inoculés par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent les différences significatives ($P < 0,05$). A : Traitements en split root. B : Traitements en système non split root.

7. Discussion

Pseudomonas fluorescens PF15 a induit une importante inhibition de la croissance mycélienne sur milieu KB. Ce milieu est déficient en fer, ce qui favorise la synthèse des sédirophores par les *Pseudomonas* fluorescents pour chélater les ions ferriques, ce qui réduit la disponibilité du fer pour les agents pathogènes et provoque une diminution de leur croissance (King et al., 1954 ; Eyquem et al., 2000 ; Persello-Cartieaux et al., 2003).

Le test d'antagonisme *in vitro* des souches locales de *Pseudomonas* fluorescents a révélé des taux appréciables en réduction de la croissance mycélienne de FOL. Les activités antagonistes enregistrées sur le milieu King B peuvent être attribuées au processus de synthèse des siderophores. En revanche, les deux autres milieux (PDA et mixte), ne favorisent pas la synthèse des siderophores, les actions obtenues sur ces milieux, suggérant l'implication d'autres mécanismes d'action, en particulier l'antibiose et le parasitisme.

Les souches de *Pseudomonas* PF15, PP27 appliquées individuellement ou en combinaison, ont provoqué une bioprotection significative des plants de tomate contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL). Malgré l'apparition des symptômes de la maladie et leur progression, néanmoins, tous les plants bactérisés et inoculés par le pathogène ont montré une expression tardive des symptômes et une réduction significative de leur gravité. La résistance spécifique des plantes s'exprime en tout ou rien (résistance / sensibilité), tandis que la résistance partielle ou quantitative se manifeste par les modulations de l'intensité et de la cinétique de développement de la maladie (Young, 1996). De ce fait, nous pouvons attribuer le développement des symptômes, en présence des rhizobactéries, comme une modulation quantitative, qui peut atténuer les dégâts et les dommages de cette maladie.

Le système racinaire en split root favorise l'interaction de chaque micro-organisme appliqué, soit les *Pseudomonas* ou FOL, avec les racines, en garantissant une séparation physique entre eux. Dans ce cas, le seul mécanisme qui peut expliquer la réduction de la maladie est l'induction d'une résistance systémique des plants de tomate par les rhizobactéries. Dans ce contexte, des observations similaires ont été rapportées par plusieurs études. Selon Verhagen et al., (2010), *Pseudomonas* fluorescents (CHA0, WCS417, Q2-87, WCS358, 7NSK2) induisent la résistance systémique et réduisent significativement la maladie de la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* sur la vigne. Aussi, *Pseudomonas putida* BTP1

stimule les réactions de défense chez le concombre contre *Pythium aphanidermatum* (Ongena et al., 2000).

Les pseudomonads peuvent réduire le pouvoir virulent des pathogènes, en activant les mécanismes de défense et/ou en l'inhibant directement (production d'antibiotiques, enzymes lytiques). Les actions de biocontrôle et d'induction de résistance systémique sont très complexes dans leur expression et sont régulées par plusieurs processus au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Haas et Défago, 2005).

Durant notre expérimentation, la bactérisation avec les PGPRs a montré des effets notables en bioprotection, qui démontre la capacité des plants de tomate à tolérer la fusariose vasculaire. Des gains marquants en chlorophylle totale et en proline sont notés. La phytostimulation constatée peut être due à l'amélioration de l'activité photosynthétique, qui peut avoir un lien possible avec la défense des plantes (Kandasamy et al., 2009).

La proline peut être à l'origine de la manifestation des mécanismes naturels de la résistance des plants de tomate contre l'agent fongique. Il est à noter les taux importants en proline juste après la bactérisation, qui peuvent être l'indicateur d'un déséquilibre de l'environnement rhizosphérique. L'application exogène de la proline a montré une stimulation de la croissance et une induction de la résistance systémique chez *Pennisetum glaucum* contre le mildiou causé par *Sclerospora graminicola*, avec une protection de 58 % sous serre et de 67% en conditions de terrain (Niranjan et al., 2004).

Plusieurs études confirment que l'application préalable des *Pseudomonas* fluorescents renforce la paroi cellulaire, ce qui limite l'invasion des agents pathogènes dans les tissus végétaux (Benhamou et al., 2000). Les plantes sensibilisées peuvent exprimer plusieurs mécanismes de défense : la production d'espèces réactives de l'oxygène (Yoshioka et al., 2008), des composés antimicrobiens, des enzymes lytiques et des protéines PRs (Pathogenesis-Related) (van der Ent et al., 2009). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents augmentent le taux de la phénylalanine ammoniac-lyase, la peroxydase et la polyphénol oxydase, β -1,3-glucanase et des composés phénoliques chez le pois chiche (Saikia et al., 2003; Dutta et al., 2007) et de la tomate (Murugan et Dhandapani, 2006; Latha et al., 2009).

EXPERIMENTATION 2 : INDUCTION DE LA RESISTANCE SYSTEMIQUE CHEZ LA TOMATE VIS-A-VIS DE LA GALE BACTERIENNE

1. Action de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 sur l'induction de la résistance

1.1. Symptomatologie

L'évaluation de la gale bactérienne sur les plants de tomate a permis de constater de petites *tâche* brunes à noires et translucides, apparaissant sur les jeunes folioles ou en bordure du limbe. Elles sont circulaires ou légèrement angulaires, d'un diamètre de 2-3 mm. Des lésions comparables sont apparues sur les pétioles et la tige (Figs. 33A, 33B).

En comparaison avec le témoin positif (Fig. 33B), l'intensité des symptômes décrit précédemment a été réduite chez les plantes bactérisées, en présentant des spots de faible diamètre (Fig. 33A) ; tandis que, les plantes inoculées avec l'agent pathogène ont révélé de larges et de nombreux spots sur la totalité des feuilles.

1.2. Indice de la maladie

L'effet de bioprotection de *P. fluorescens* N21.4 a été déterminé chez les plantes de tomate âgées de 6 semaines. N21.4 a réduit significativement la sévérité de la maladie (40%), alors que, les plantes inoculées avec l'agent pathogène ont atteint un taux d'infection de 100% (Fig. 33C).

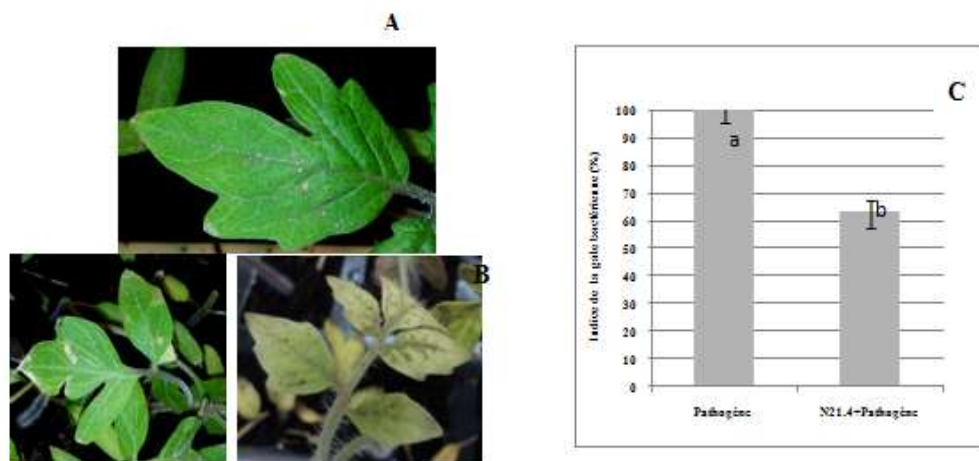


Figure 33 : Indice de la gale bactérienne des plants de tomate traités avec *Pseudomonas fluorescens* N21.4 et infectés avec le pathogène : *Xanthomonas campestris* (n=20). La symptomatologie a été enregistrée une semaine après l'inoculation de l'agent pathogène. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres (a, b) indiquent la présence d'une différence significative ($P < 0,05$). **A** : plants bactérisés avec N21.4 et inoculés avec le pathogène. **B** : plants inoculés avec le pathogène.

1.3. Biomasse

La bioprotection des plants de tomate vis-à-vis de *Xanthomonas campestris* a été associée à une amélioration de la croissance des parties racinaire et foliaire. En présence de la bactérie N21.4, il a été enregistré une biostimulation appréciable entre 17% à 40%, alors que les plantes inoculées avec l'agent pathogène ont montré une réduction significative de leur croissance (Fig. 34).

Pseudomonas fluorescens N21.4 a induit une augmentation de la hauteur des tiges des plants de tomate (12%) par rapport aux témoins non inoculés (contrôles sain et pathogène) (Fig. 35).

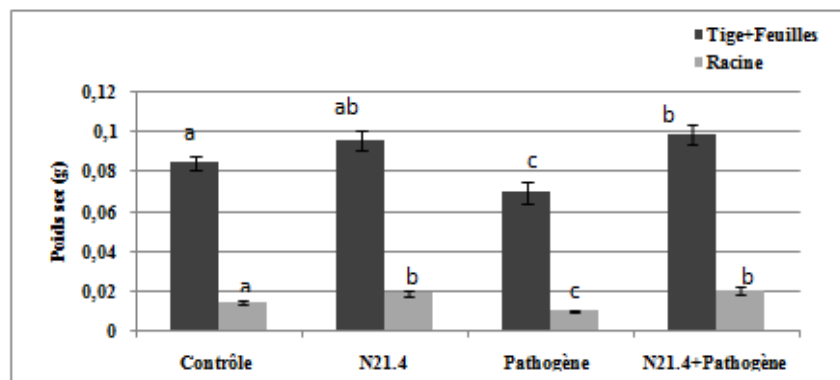


Figure 34 : Effet de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 sur la croissance de la tomate (poids sec des racines et de la partie aérienne). Pathogène : *Xanthomonas campestris*, Contrôle : MgSO₄. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent la présence d'une différence significative (P < 0,05).

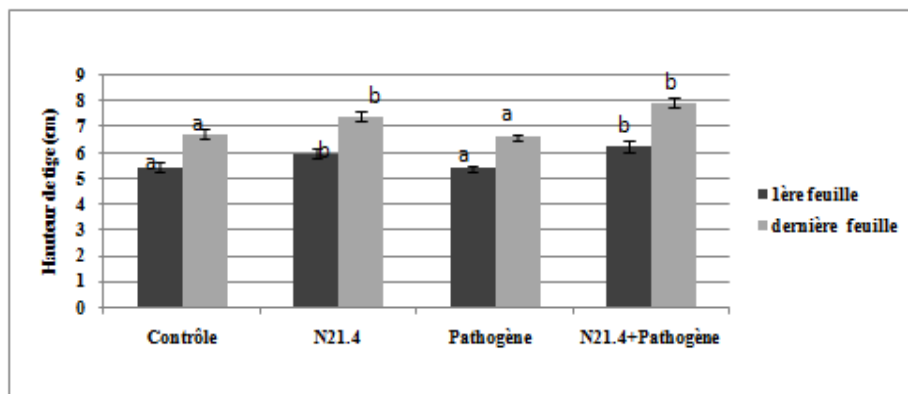


Figure 35 : Effet de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 sur la hauteur des plants de tomate. Pathogène : *Xanthomonas campestris*, Contrôle : MgSO₄. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent la présence d'une différence significative (P < 0,05).

1.4. Activité photosynthétique

1.4.1. Mesure de la fluorescence du photosystème II (PSII)

L'activité photosynthétique a été évaluée à travers la mesure de la fluorescence du PSII. Le rendement quantique maximale du photosystème PSII (F_v/F_m) a été presque similaire pour tous les traitements $0,84 \leq F_v / F_m \leq 0,85$ (Fig. 36A).

Les plantes traitées avec N21.4 et l'agent pathogène ont montré une amélioration significative en rendement quantique du PSII (Φ PSII) par rapport au contrôle pathogène (Fig. 36B). En effet, l'analyse statistique des traitements, classe le traitement des plants bactérisés en groupe homogène à part (c) par rapport aux autres traitements, ce qui montre l'action positive de N21.4 sur l'activité photosynthétique. Les plants inoculés par *Xanthomonas campestris* présentent le rendement quantique le plus faible (bc).

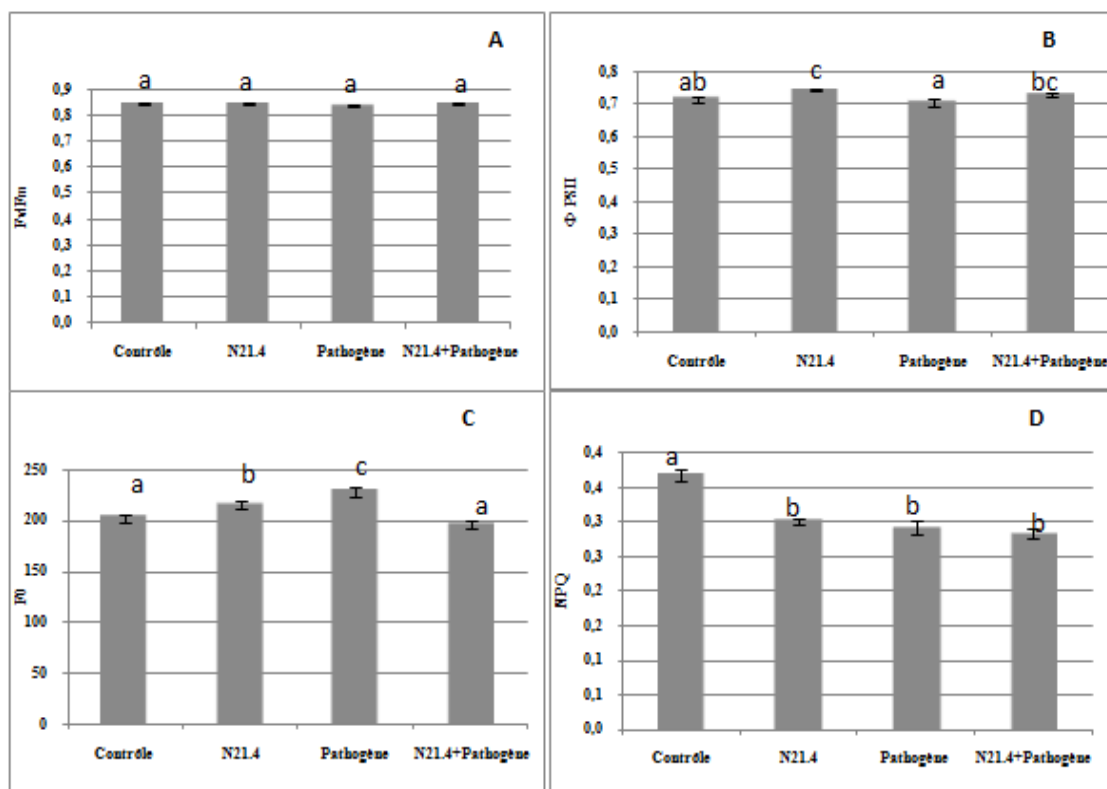


Figure 36: Activité photosynthétique des plants de tomate. *Pseudomonas fluorescens* N21.4, Pathogène : *Xanthomonas campestris*, Contrôle : $MgSO_4$. **A** : F_v / F_m (rendement quantique maximum du PSII), **B** : Φ PSII: efficacité du photosystème II. **C** : F_0 (fluorescence minimale). **D** : NPQ (No photochemical quenching). Ces paramètres ont été mesurés dans des conditions de lumière ambiante, après 1 h d'adaptation à l'obscurité. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent la présence d'une différence significative ($P < 0,05$).

N21.4 a stimulé les plantes infectées à maintenir la fluorescence minimale (F0) similaire au témoin sain (MgSO₄) et faible par rapport au contrôle pathogène (Fig. 36C). En revanche, les plantes inoculées avec *X. campestris* ont révélé une fluorescence minimale plus élevée en présentant un groupe homogène à part (c) et le taux de Φ PSII le plus faible (Fig. 36B, 36C).

La mesure de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur représentée par NPQ (No photochemical quenching), a montré la plus faible valeur chez les plantes traitées avec la souche N21.4 et l'agent pathogène comparativement au témoin sain (MgSO₄) (Fig. 36D).

1.4.2. Indice de chlorophylle

La teneur en chlorophylle totale (a+b) et l'indice chlorophyllien sont significativement élevés chez les plants de tomate traités par N21.4 (Figs. 37A, 37B). Le rapport de la chlorophylle (a/b) s'est montré supérieure chez les plantes traitées avec N21.4 par rapport aux autres traitements. L'analyse de la concentration des pigments chlorophylliens a révélé, le taux le plus élevé chez les plantes bactérisées avec N21.4 avec un indice de 1.15.

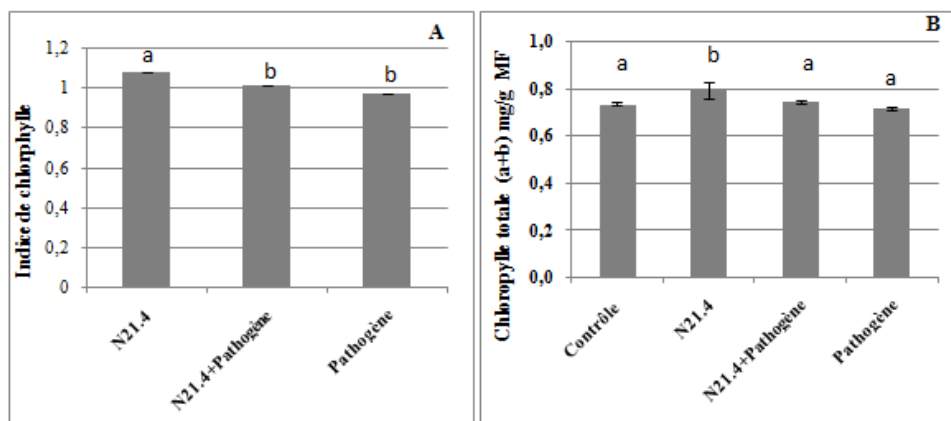


Figure 37: **A** : Indice de chlorophylle (rapport entre les plants de tomate traités avec *Pseudomonas fluorescens* N21.4 et/ou infectés avec *Xanthomonas campestris*, et le contrôle sain). **B** : Chlorophylle totale (a+b) chez les plants de tomate. Pathogène : *X. campestris*, Contrôle : MgSO₄. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent la présence d'une différence significative (P < 0,05).

1.5. Activités enzymatiques

1.5.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Les plantes traitées avec la souche *Pseudomonas fluorescens* N21.4 et/ou l'agent pathogène ont montré le même comportement dans l'expression de la SOD par rapport au contrôle négatif (MgSO₄), qui a exprimé un taux stable durant les trois intervalles de temps (2.8%). Les plantes de tomate traitées avec N21.4 et inoculées avec le pathogène ont révélé une augmentation significative du taux de cette enzyme et ont montré une différence marquée

48h et 72h après l'inoculation de l'agent pathogène. Une diminution remarquable a été enregistrée 48h après application de *X.campestris*, ensuite une réaugmentation du taux de cette enzyme a été observée (Fig. 38A).

1.5.2. Ascorbate peroxydase (APX)

Les plantes de tomate bactérisées avec N21.4 et infectées avec l'agent pathogène ont présenté une différence significative dans l'expression de l'APX par rapport aux autres traitements où leurs taux ont été stables et similaires au contrôle ($MgSO_4$) durant les trois intervalles d'échantillonnage. Une supériorité nettement remarquable de l'expression de cette enzyme a été enregistrée 48 h après l'inoculation de *X.campestris*. Après cet intervalle de temps, une diminution progressivement a été notée (Fig. 38B).

1.5.3. Glutathion réductase (GR)

N21.4 a stimulé significativement l'activité de la glutathion réductase. L'expression de cette enzyme a été plus significative chez les plants traités avec la souche N21.4 ($0.35 \mu\text{mol}/\text{min mg}$ de protéine), 72h après l'inoculation avec l'agent pathogène. Aucune différence n'a été enregistrée après 24 h et 48 h de l'inoculation de l'agent pathogène (Fig. 38C).

1.5.4. Gaïacol peroxydase (GPX)

L'expression de l'activité de gaïacol peroxydase est plus élevée et clairement significative chez les plantes traitées avec N21.4 ($0.04 \mu\text{mol}/\text{min mg}$ de protéine), 24h et 72h après l'inoculation de l'agent pathogène par rapport aux autres traitements (Fig. 38D). Une diminution progressive a été enregistrée après 48 h, qui a atteint un niveau similaire chez le contrôle négatif ($MgSO_4$). Les plantes inoculées avec l'agent pathogène ont révélé une augmentation, 24 h et 48 h après leur inoculation. Ce taux reste faible en comparaison avec les plants bactérisés avec N21.4.

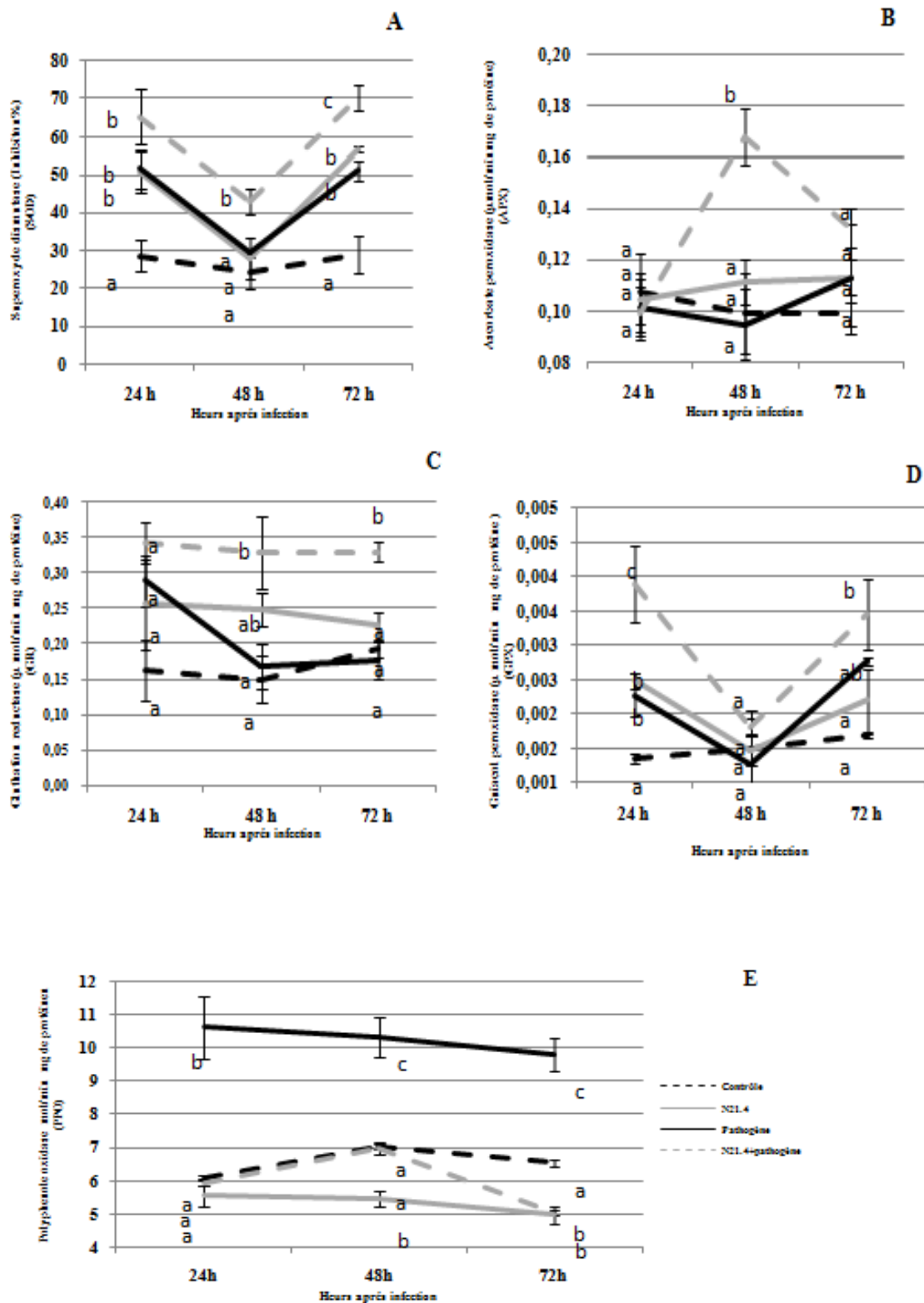


Figure 38: Expression relative de l'activité enzymatique antioxydante, 24 h, 48 h et 72 h après inoculation avec le pathogène chez les plants de tomate. *Pseudomonas fluorescens* N21.4, Pathogène : *Xanthomonas campestris*, Contrôle : $MgSO_4$. **A** : Superoxyde dismutase (SOD), **B** : Ascorbate peroxydase (APX), **C** : Glutathion réductase (GR), **D** : Gaïacol peroxydase (GPX), **E** : Polypénol oxydase (PPO). Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres montrent des différences significatives ($P < 0,05$).

1.5.5. Polyphenol oxidase (PPO)

Pseudomonas fluorescens N21.4 n'a pas stimulé l'activité de la PPO. Alors que les plantes inoculées avec *X.campestris* ont montré une forte expression (11 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de protéine) de cette enzyme et nettement supérieure des autres traitements pendant les trois intervalles d'échantillonnage (Fig. 38E). Les plants bactérisées avec *P.fluorescens* N21.4 ont présenté une réduction de l'expression de la PPO par rapport au contrôle (MgSO_4).

1.5.6. Protéines PRs

L'activité enzymatique de β -1,3 glucanase (PR2) et de chitinases (PR3) n'a pas présenté une différence significative entre les traitements. N21.4 n'a pas stimulé l'activité de ces enzymes hydrolytiques chez les plants de tomate et leurs taux ont été similaires pour la PR3 (0.028- 0.030 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de protéine) et la PR2 (0.058-0.061 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de protéine) (Fig. 39A, 39B).

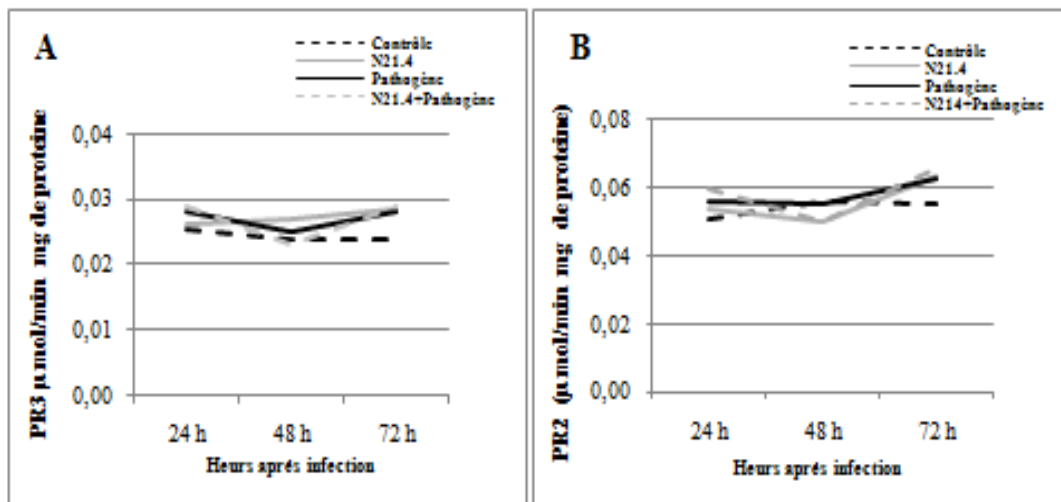


Figure 39: Activités enzymatiques des protéines PRs (Pathogenesis related proteins) chez les plants de tomate traités avec *Pseudomonas fluorescens* N21.4 et inoculés avec *Xanthomonas campestris*, Contrôle : MgSO_4 . **A** : Activité de la chitinase (PR3), **B**: Activité de la β -1,3 Glucanase (PR2). Les barres indiquent les erreurs standards et des différentes lettres indiquent des différences significatives ($P < 0,05$).

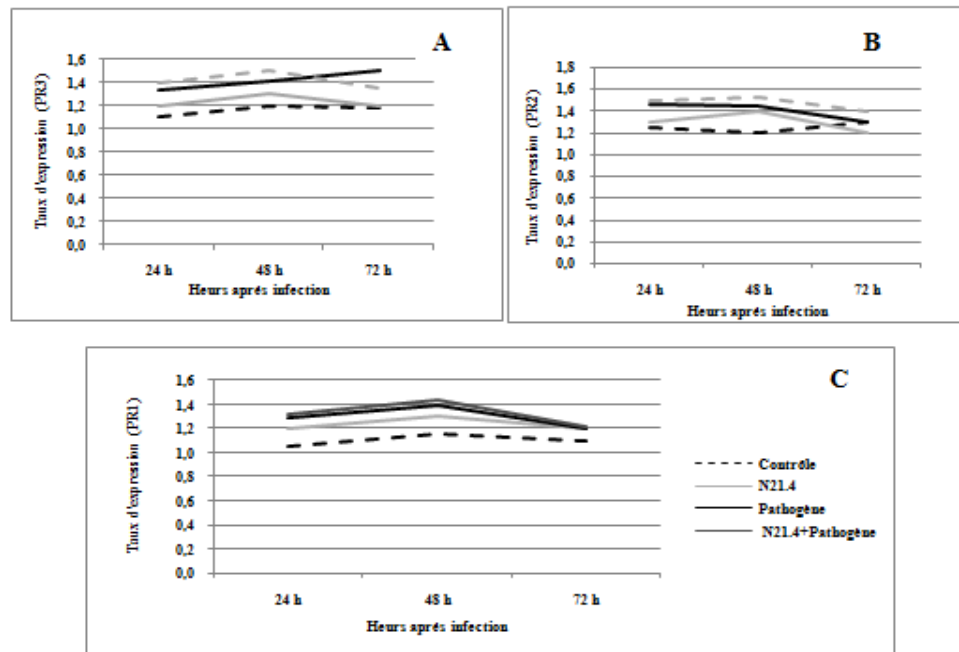


Figure 40 : Expression des gènes PRs (Pathogenesis related proteins). **A** : PR3 (Chitinase), **B** : PR2 (Glucanase), **C** : PR1. Ces taux sont exprimés 24 h, 48 h et 72 h après inoculation de l'agent pathogène *Xanthomonas campestris* chez les plants de tomate traités avec *Pseudomonas fluorescens* N21.4 et/ou inoculés avec l'agent pathogène, Contrôle : MgSO₄. (n = 3). Les barres indiquent les erreurs standards et des différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements pour chaque point de temps (P < 0,05).

1.6. Transcriptome

Le taux de transcriptome de β -1,3 glucanase (PR2), chitinases (PR3) et PR 1 n'a montré aucune différence significative entre les traitements. Les niveaux exprimés sont similaires allant de 1.20 à 1.60 chez les plantes inoculées avec *P.fluorescens* N21.4 et les témoins (contrôle et pathogène). Les changements dans l'expression des gènes PR1, PR2 et PR3 correspondaient à l'expression de leurs activités enzymatiques (Figs. 39, 40).

2. Action des bioeffecteurs bactériens sur l'induction de la résistance systémique

2.1. Indice de la maladie

Pseudomonas fluorescens N21.4 traité aux UV et ses dérivés bioeffecteurs ont été testés pour leur capacité d'induire la défense systémique naturelle chez la tomate vis-à-vis de la gale bactérienne. L'extrait des bioeffecteurs appliqué a provoqué une réduction de la symptomatologie en présentant des spots de faible diamètre (Fig. 33A). Tandis que, les

plantes inoculées avec l'agent pathogène ont révélé de larges et de nombreux spots sur la totalité des feuilles (Fig. 33B).

La grande fraction d'effecteurs a induit la meilleure bioprotection des plants de tomate contre *X. campestris* (80%). L'application de l'inoculum de N21.4 traité aux UV a induit une réduction significative de la maladie (50%) (Fig. 41).

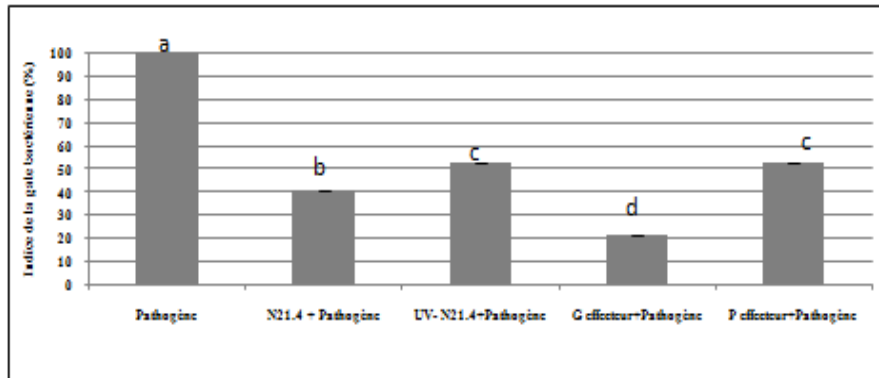


Figure 41: Indice de la gale bactérienne des plants de tomate traités avec *Pseudomonas fluorescens* N21.4 vivant, N21.4 traité aux UV, bioeffecteurs dérivés de N21.4 (grande fraction : G effecteur ; petite fraction : P effecteur), Pathogène : *Xanthomonas campestris*. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent des différences significatives ($P < 0,05$).

2.2.Biomasse

Pseudomonas fluorescens N21.4 traités aux UV et la petite fraction des bioeffecteurs ont diminué significativement le poids sec des racines. Les plants de tomate traités avec la petite fraction des bioeffecteurs ont présenté le meilleur poids sec de la partie aérienne avec un groupe homogène à part (d) (Fig. 42). Les plantes traitées avec N21.4 et les bioeffecteurs de la grande fraction ont révélé un poids sec des racines similaire au contrôle ($MgSO_4$).

La mesure de la hauteur des plants de tomate n'a pas montré une différence significative entre les traitements étudiés en comparaison avec le contrôle négatif ($MgSO_4$) et l'agent pathogène (Fig. 43).

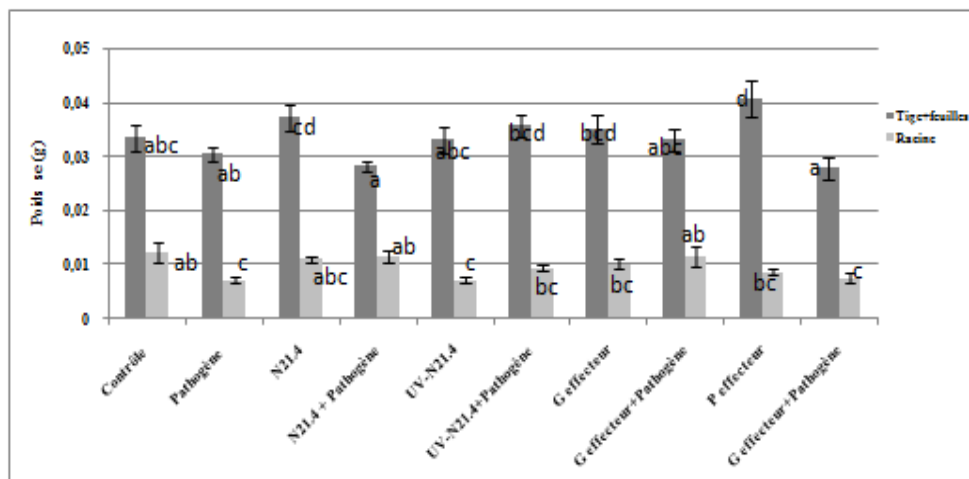


Figure 42 : Poids sec de la partie aérienne et racinaire des plants de tomate traités avec *Pseudomonas fluorescens* N21.4 vivant, N21.4 traité aux UV, bioeffecteurs dérivés de N21.4 (grande fraction : G effecteur ; petite fraction : P effecteur) et inoculés avec le pathogène *Xanthomonas campestris*. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent des différences significatives ($P < 0,05$).

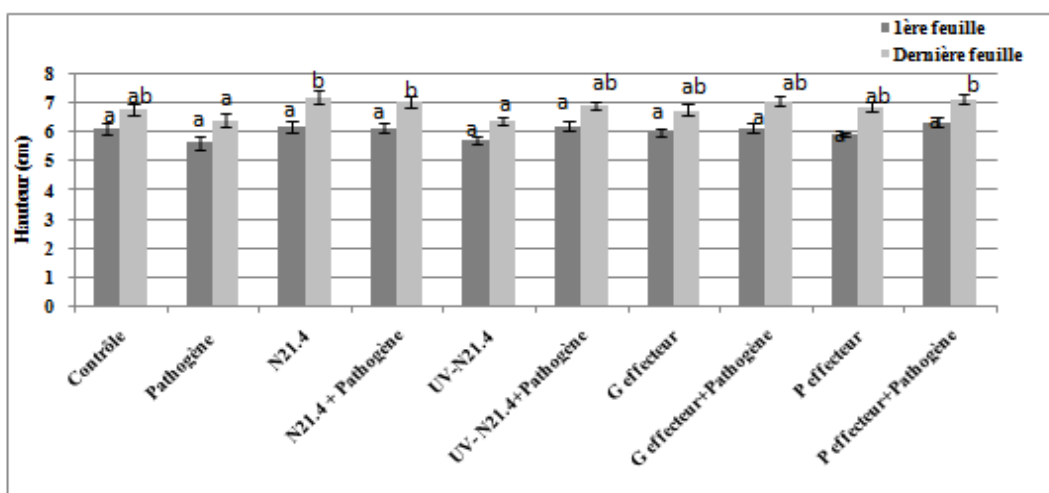


Figure 43 : Hauteur des plants de tomate (du collet à la 1^{ère} feuille ou à la dernière feuille) traités avec *Pseudomonas fluorescens* N21.4 vivant, N21.4 traité aux UV, bioeffecteurs dérivés de N21.4 (grande fraction : G effecteur et petite fraction : P effecteur) et inoculés avec le pathogène *Xanthomonas campestris*. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent des différences significatives ($P < 0,05$).

2.3. Activité photosynthétique

Tous les plants bactérisés ou inoculés avec les bioeffecteurs ont présenté un rendement quantique maximal (F_v/F_m) similaire au contrôle négatif ($MgSO_4$), alors que le contrôle pathogène a révélé le taux le plus faible avec un groupe homogène à part (b) (Fig. 44A). Les plantes de tomate traitées avec la petite fraction ont montré un rendement quantique Φ PSII le plus élevé (0.6) par rapport aux autres traitements (Fig. 44A).

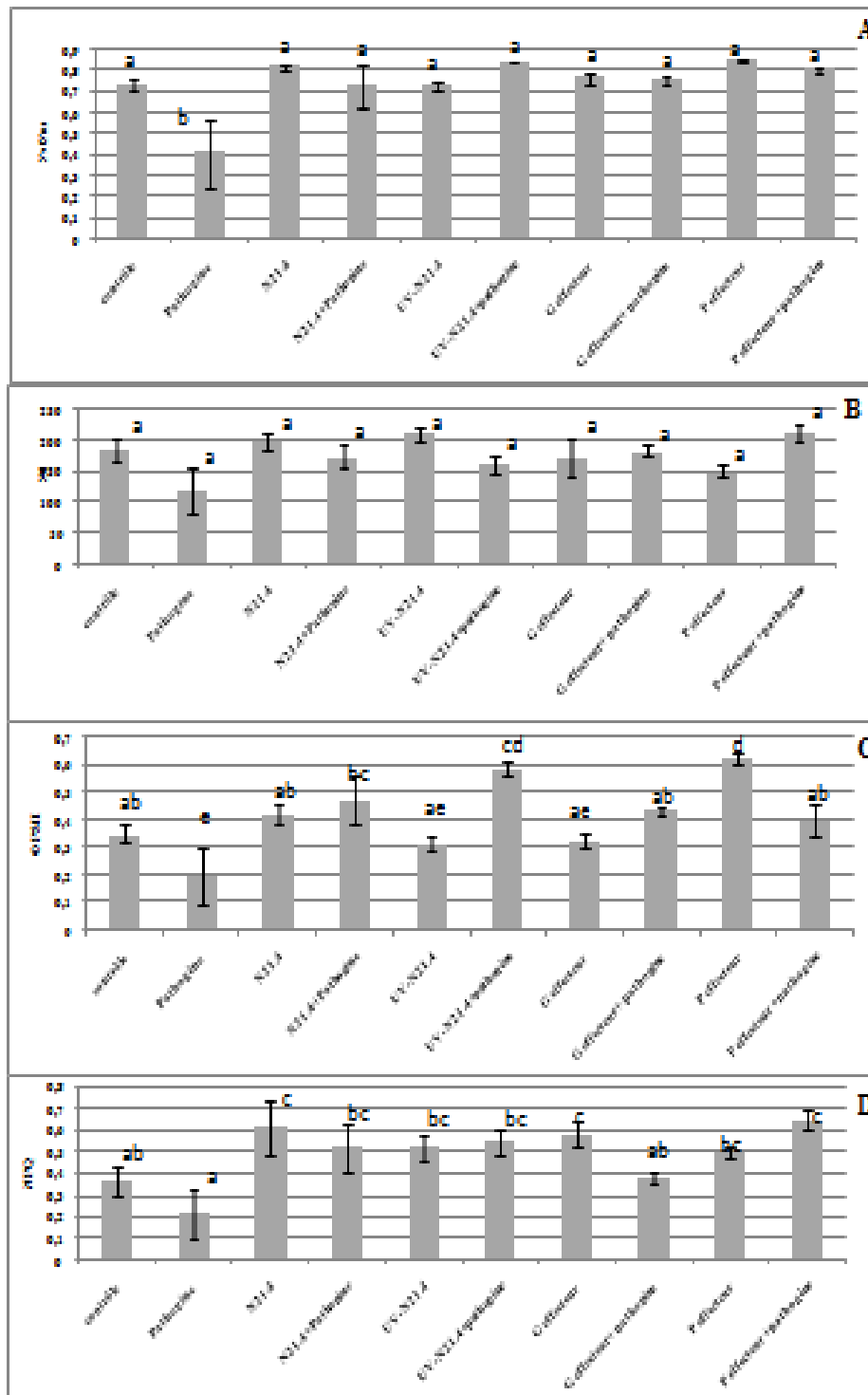


Figure 44: Activité photosynthétique des plants de tomate traités avec *Pseudomonas fluorescens* N21.4 vivant, N21.4 traité aux UV, bioeffecteurs dérivés de N21.4 (grande fraction : G effecteur et petite fraction : P effecteur) et inoculés avec le pathogène : *Xanthomonas campestris*, Contrôle : MgSO₄. **A** : Fv / Fm (rendement quantique maximum du PSII), **B** : Φ PSII: efficacité du photosystème II. **C** : F0 (fluorescence minimale). **D** : NPQ (No photochemical quenching). Ces paramètres ont été mesurés dans des conditions de lumière ambiante, après 1 h d'adaptation à l'obscurité. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent la présence d'une différence significative (P < 0,05).

L'inoculum de la grande fraction a présenté un rendement quantique similaire au contrôle sain ($MgSO_4$). *Pseudomonas fluorescens* N21.4 traité aux UV a causé une augmentation Φ PSII chez les plantes inoculées avec le pathogène et a induit en parallèle un changement dans le taux de dissipation d'énergie NPQ (Fig. 44). La fluorescence minimale n'a pas présenté une différence significative entre les traitements.

3. Discussion

La séparation spatiale, entre l'agent pathogène inoculé au niveau foliaire et *P. fluorescens* N21.4 appliquée au niveau racinaire, confirme que la réduction de la symptomatologie est une conséquence de l'induction de la résistance systémique chez la plante. Des résultats similaires ont été décrits chez le haricot, le pois chiche et la tomate (Benchabane et al., 2000 ; Ongena et al., 2002; Saikia et al., 2003 ; Boukerma et al., 2017).

Pseudomonas fluorescens N21.4 traité aux UV a montré une réduction importante de la maladie. Les cellules non viables de *P. aeruginosa* KMPCH-567 ont déclenché les réactions de défense naturelle chez la vigne contre *B. cinerea* (Verhagen et al., 2010). Selon Ongena et al. (2002), *P. putida* BTP1 tué par la chaleur n'a assuré aucune protection. Aussi, les taux de bioprotection enregistrés avec N21.4 tué aux UV et par les cellules vivantes de N21.4 ont été significativement élevés. Nous suggérons que les composants structurels de la surface bactérienne de N21.4 sont très importants pour éliciter l'ISR.

Les lipopolysaccharides (LPS) des rhizobactéries inoculés chez *A. thaliana*, ont induit la résistance systémique, en réduisant la gravité de la maladie (Bakker et al., 2003; Meziane et al., 2005; Ramos-Solano et al., 2008). Ainsi, les flagelles de *P. putida* WCS358 déclenchent l'ISR chez *Arabidopsis*, le haricot et la tomate (Meziane et al., 2005).

La reconnaissance entre les bioeffeteurs métaboliques (grande ou petite fraction) et les cellules racinaires de la tomate a stimulé leurs réactions de défense naturelle, ce qui a réduit la sévérité de la maladie. La grande fraction de l'extrait métabolique a révélé une meilleure suppression de la gale bactérienne (80%). Cet effecteur de plus de 10 kDa est un important déterminant chez N21.4 pour déclencher l'ISR. D'autres éliciteurs ou leur combinaison peuvent jouer un rôle dans l'augmentation de l'efficacité de l'ISR. Dans ce contexte, les extraits bactériens des souches C01HA0 et WCS417 ont sensibilisé la vigne contre *B. cinerea* (Verhagen et al., 2010). Il a été démontré que l'application des éliciteurs bactériens réduit l'infection chez de nombreuses plantes (Wiesel et al., 2014). L'application des éliciteurs de

B.subtilis a élicité la résistance systémique et a protégé la tomate contre *Pseudomonas syringae* (Rudrappa et al., 2010).

L'ISR est basée sur la perception de plusieurs déterminants bactériens (Van Wees et al., 2008). Les PGPRs possèdent une variété de molécules élicitrices des réactions de défense naturelle des plantes; qui peuvent être soit des composants de la surface bactérienne ou des métabolites excrétés (Van der Ent et al., 2009a). Si un seul déterminant ne peut pas induire la résistance systémique, ou n'est pas produit dans certaines conditions, d'autres caractères peuvent également être efficaces. Dans de tels cas, les différents déterminants peuvent être différemment régulés (Bakker et al., 2007). Bien que, d'autres éliciteurs comme l'acide salicylique, BABA (acide aminobutyrique), INA (2,6 dichloroisonicotinique) ou BTH (Acibenzolar -S- méthyl) sensibilisent les cellules végétales pour répondre rapidement et efficacement à de futures attaques (Conrath et al., 2002).

Les cellules vivantes de N21.4 sont capables d'induire la résistance systémique et promouvoir la croissance des plants de tomate. La capacité des *Pseudomonas* fluorescents à stimuler la croissance des plantes a été largement signalée (Fischer et al, 2007; Baset et al., 2010 ; Fischer et al., 2010). La grande fraction d'éliciteurs de la souche N21.4 a déclenché la défense naturelle chez les plantes de tomate et a maintenu le même niveau de croissance comme chez le contrôle sain. Cependant, N21.4 tué aux UV et la petite fraction ont diminué le poids sec des racines et ont assuré 50% de suppression de la gale bactérienne. Selon Worrall et al. (2012), l'induction de la défense de la tomate par traitement des semences avec des activateurs de défense n'a pas été accompagnée par une réduction de la croissance, et peut donc être adaptée à une exploitation commerciale.

Les corrélations négatives entre les taux de croissance et la résistance aux maladies est un phénomène connu depuis longtemps (Smedegaard-Petersen et Tolstrup, 1985). L'expression des gènes de défense peut causer des effets négatifs sur l'état physiologique de la plante. Il est généralement mentionné que l'induction de la résistance systémique a évolué pour économiser l'énergie en présence des pathogènes ou les insectes ; bien que les coûts augmentent lorsque les défenses sont activées suite à l'attaque (Walters et Heil, 2007; Henry et al, 2012). La résistance systémique induite peut être associée à l'amélioration de la croissance ou une diminution. Tout cela dépend de la nature de l'éliciteur et la réponse de la plante, sa gestion de son métabolisme et la distribution de ses ressources.

Les bioeffecteurs de *P.fluorescens* N21.4 induisent la résistance systémique. Cette protection a été couplée avec l'amélioration de l'activité photosynthétique. Les PGPRs peuvent modifier la physiologie et le fonctionnement des tissus végétaux en colonisant leur système racinaire (Vacheron et al., 2013). Le rapport de chlorophylle a/b a été faible chez les plantes traitées avec N21.4 et élevé chez le contrôle pathogène. Il a été rapporté qu'un rapport de chlorophylle a/b élevé chez les plantes stressées est un signe de la réduction des unités photosynthétiques (Terashima et Hikosaka, 1995 ; Alberte et Thornber, 1977).

N21.4 a augmenté la quantité de chlorophylle totale par rapport aux contrôles sain et pathogène. Cette souche a également amélioré la croissance racinaire et la hauteur des tiges. Il a été montré que les souches de *Pseudomonas* fluorescents peuvent augmenter la teneur totale en chlorophylle des plantes (Bavaresco et Fogher, 1996; Sharma et al., 2003; Farhan et al., 2010). La capacité des *Pseudomonas* d'augmenter le niveau de chlorophylle totale peut être liée à leur approvisionnement en certains nutriments, tels que l'azote et le phosphore (Hameed et Farhan, 2007). Des plants de riz inoculés avec *P. fluorescens* KH-1 ont montré une surexpression de la rubisco (ribulose 1,5-carboxylase bisphosphate - oxygénase). Il a été supposé que la rubisco joue un rôle clé dans la photosynthèse et l'accumulation de chlorophylle (Agrios, 2005). Il est supposé que la surexpression de la rubisco peut conduire à une augmentation de l'activité photosynthétique des plantes traitées (Kandasamy et al., 2009).

Pseudomonas fluorescens N21.4 et ses dérivés bioeffecteurs ont amélioré l'efficacité du photosystème II (Φ PSII). Ce dernier a été associé à une faible valeur de F0 (fluorescence minimale) alors que Fv/Fm reste stable. Cependant, Φ PSII pour le témoin positif (contrôle pathogène) était plus faible et F0 a présenté une valeur élevée. La petite fraction d'effecteur appliquée a induit la meilleure amélioration du Φ PSII.

L'efficacité du PSII représente le taux de transport d'électrons relative (Genty et al., 1989). La diminution de la Φ PSII peut être directement liée à une diminution dans le transport d'électrons. Cette baisse est également corrélée à la diminution de Fv/Fm (Zou et al., 2005). Par conséquent, les variations de Φ PSII peuvent être une conséquence de la perte partielle de la capacité de la photosynthèse (Cruz et al., 2003). Dans ce contexte, chez l'arabette et la pomme de terre, la photosynthèse a diminué après traitement avec *P. syringae* (Berger et al., 2006). Le dysfonctionnement de PSII a été exprimé par le déclin à la fois de l'efficacité photochimique maximale (Fv/FM) et le rendement quantique (Φ PSII), et un nombre plus élevé de centres fermés de PSII (Synková et al., 2006). Zou et al., (2005) ont suggéré que la diminution de Φ PSII chez le soja infecté par *P. syringae* pv. *glycinea* a été

causée par des dommages directs au niveau des centres réactionnels du PSII. Ces dommages peuvent causer une dégradation de la protéine D1 et l'action directe des ROS sur le mécanisme de la photosynthèse.

Le contrôle pathogène a montré la plus faible valeur de NPQ et de Φ PSII. Les plantes traitées avec N21.4 et inoculées par l'agent pathogène ont révélé une faible valeur de dissipation d'énergie (NPQ) et une augmentation de Φ PSII. Les plantes peuvent dissiper l'énergie lumineuse absorbée sous forme de chaleur (NPQ) (Müller et *al.*, 2001). Des niveaux plus élevés de NPQ peuvent protéger contre la photo-inhibition et les photodommages, quand Φ PSII est faible dans des conditions de stress (Cousins et *al.*, 2002).

La production des espèces réactives d'oxygène (ROS) est l'une des premières réponses de la plante vis-à-vis de l'agent pathogène. Ces espèces réactives peuvent être impliquées dans les voies de signalisation des réactions de défense (Lamb et Dixon, 1997 ; Hancock et *al.*, 2002; Shetty et *al.*, 2009). Les ROS sont synthétisées avec un niveau contrôlé, ce qui conduit à une réponse définie comme l'activation des protéines kinases et la régulation de l'expression des gènes (Hancock et *al.*, 2002).

L'application de la souche bactérienne N21.4 stimule une surexpression des enzymes antioxydantes plus significativement chez les plants de tomate inoculés avec le pathogène et une faible augmentation a été montrée chez les plantes non infectées dans les différents temps d'échantillonnage (24 h 48 h, et 72 h après l'inoculation de l'agent pathogène). Dans certaines situations, les plantes stressées avec *X. campestris* ont montré une faible expression des enzymes antioxydantes. Il semble que c'est une réponse naturelle des plants de tomate au stress biotique, tandis que, N21.4 renforce cette réponse chez les plantes infectées pour pouvoir limiter l'envahissement de l'agent pathogène.

Le cycle ascorbate-glutathion est parmi les principales voies antioxydantes dans les cellules végétales (Kuźniak, 2010). Il a été révélé que l'induction de l'activité du cycle ascorbate-glutathion peut être déclenchée dans l'interaction de différents pathosystèmes (KuzÂniak et Skøodowska, 2004). SOD a été proposée comme signe de tolérance de certaines plantes aux stress. Plusieurs études ont montré qu'après l'application de l'agent pathogène, les rhizobactéries peuvent augmenter l'activité enzymatique de la SOD (Jetiyanon et *al.*, 2007 ; Ramamoorthy et *al.*, 2002a, 2002b; Jetiyanon et *al.*, 2007). Cette enzyme peut exprimer la première ligne de défense contre les niveaux élevés des ROS (Rio et *al.*, 2006). GR fonctionne dans la régénération de l'ascorbate réduit après avoir été converti en

monodehydroascorbate par l'APX (Mittler et *al.*, 2004). L'amélioration de l'activité de la superoxyde dismutase et l'ascorbate peroxydase peut également jouer un rôle important dans la tolérance des plantes au stress salin, ce qui maintient l'activité PSII à un niveau élevé (Tanaka et *al.*, 1998).

Il a été observé une forte augmentation des enzymes du stress oxydatif chez les plantes traitées avec N21.4 et inoculées avec *X. campestris*. Ces plantes ont montré un niveau significatif de suppression de la maladie et l'amélioration de la photosynthèse. Les centres réactionnels PSI et PSII dans les thylakoïdes des chloroplastes sont de majeurs sites de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Asada, 2006). Il semble qu'il existe une relation étroite entre cette expression et l'amélioration de l'activité photosynthétique et la protection des plantes de tomate, par la détoxification des ROS afin de minimiser leur niveau. Un réseau antioxydant efficace est également indispensable afin de traiter efficacement les ROS et de les maintenir à un niveau intracellulaire faible. L'importance des enzymes antioxydantes dans le maintien d'un taux élevé de la photosynthèse a été démontrée dans de nombreuses études (Foyer et Shigeoka, 2011).

Le rôle de la photosynthèse dans la défense des plantes est fondamental, nécessitant des explications au niveau moléculaire et physiologique (Garavaglia et *al.*, 2010). L'amélioration de la photosynthèse pourrait avoir un rôle clé dans la tolérance des plants de la tomate contre les agents pathogènes en fournissant de l'énergie pour couvrir les coûts de l'immunité. Par conséquent la plante peut exprimer sa résistance rapidement et efficacement.

N21.4 n'a pas influencé l'activité de la PPO. En revanche, il a été noté une forte activité chez les plantes prétraitées avec l'agent pathogène. PPO est impliqué dans la cicatrisation des plaies issues de l'attaque par l'agent pathogène, et plusieurs autres processus cellulaires, tels que le contrôle des niveaux d'oxygène dans les chloroplastes (Mayer, 2006). Dans d'autres études, il a été observé un rôle critique de la PPO dans la résistance aux maladies. La suppression de la PPO augmente la susceptibilité au *Pseudomonas syringae* (Li et Steffens, 2002). En outre, la PPO est impliquée dans les réactions secondaires de quinones qui conduisent à la formation de pigments bruns ou noirs, qui sont responsables d'une perte importante de post-récolte des fruits et des légumes (Bachern et *al.*, 1994).

P. fluorescens N21.4 n'a pas influencé l'activité de la glucanase (PR2) et de la chitinase (PR3) chez les plants de tomate. Il a été suggéré que ces enzymes hydrolytiques (PR2 et PR3) sont impliquées dans la stratégie de défense de la plante (Stintzi et *al.*, 1993; Edreva et *al.*,

2005). Elles s'accumulent dans les tissus des plantes après une attaque par l'agent pathogène (Lepoivre, 2003; Gomez-Ariza et al., 2007).

L'expression des protéines PRs constitue des gènes marqueurs associés à la résistance systémique acquise élicitée par la voie de signalisation acide salicylique dépendante, induite par des agents pathogènes (Uknes et al., 1992; van Loon et al., 1998 ; Yedidia et al., 1999 ; Kim et al., 2014). Parmi ces PRs, certains ont un rôle spécifique comme PR3 (chitinase) ou PR2 (glucanase), tandis que d'autres ne déterminent pas un rôle spécifique telle que la PR1 (Mitsuhara et al., 2008). Le profil d'expression de PR1, PR2 et PR3 a suggéré que N21.4 peut suivre la voie de signalisation AS-indépendante pour déclencher la résistance aux maladies (van Loon et al., 1998).

L'expression des gènes marqueurs dépend de l'éliciteur de la résistance systémique et l'agent pathogène (Sanchez et al., 2004, 2005, 2012 ; van Loon et al., 1998 ; Piertese et al., 2014). Selon Thangavelu et al., (2003), *P. fluorescens* PF10 augmente le taux de la chitinase et la β 1-3 glucanase chez les bananiers (*Musa sp*) contre *F.oxysporum* f. sp *cubense*. Une augmentation des activités de PR2 et PR3 extracellulaires a également été enregistrée dans les feuilles de *Diplocarpon. rosae* traitées avec le BTH; ce qui suggère que l'augmentation des PR2 et PR3 peut jouer un rôle dans la suppression des symptômes de la maladie (Suo et al., 2001).

EXPERIMENTATION 3 : INDUCTION DE LA TOLERANCE CHEZ *Arabidopsis thaliana* (Col-0) PAR LES *Pseudomonas* FLUORESCENTS ET *Rhizobium* spp.

1. Symptomatologie

Le traitement d'*Arabidopsis thaliana* avec le chlorure de sodium (120 mM) a montré différents degrés symptomatologiques allant de la classe 0 (pas de symptôme) à la classe 4 (mort de la plante). Chez le témoin positif, il a été noté la classe symptomatologique la plus élevée, donc tous les plants n'ont pas pu survivre ; alors que les plants traités avec les rhizobactéries ont montré des symptômes moins graves sous forme de feuilles pourpres et/ou jaune parfois accompagné d'un léger flétrissement (Figs. 45A, 45B).

Les plantes inoculées avec *Pseudomonas fluorescens* BB10 (P3) ont révélé le niveau le plus faible de la maladie (feuilles pourpres et jaunes). Tandis que, les plantes bactérisées avec *Pseudomonas fluorescens* E64 (P2) et *Rhizobium léguminosarum* (R1) ont révélé un flétrissement des feuilles (Fig. 45A).

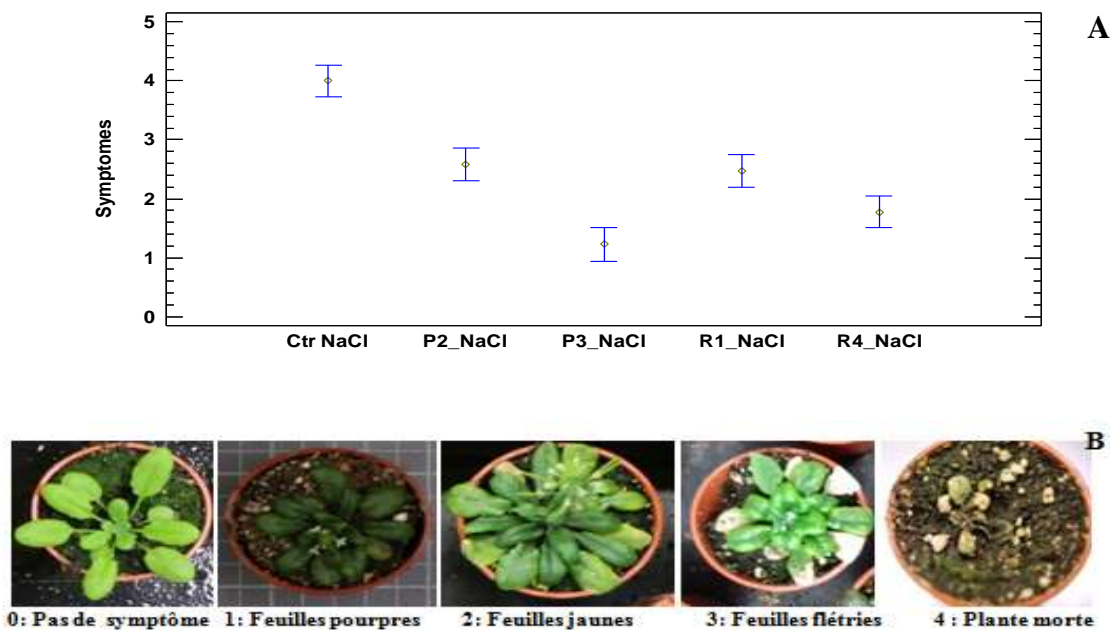


Figure 45 : Symptômes du stress salin sur chez *Arabidopsis thaliana*. **A** : Degrés symptomatologiques du stress salin chez *Arabidopsis thaliana*, 60 jours après germination, 33 jours après traitement salin (120 mM), appliqué dans un intervalle de deux jours (n= 40). P2: *Pseudomonas fluorescens* E64, P3: *Pseudomonas fluorescens* BB10, R1: *Rhizobium léguminosarum*, R4: *Sinorhizobium meliloti*. **B** : Classes symptomatologiques chez *Arabidopsis thaliana*.

2. Indice de la maladie

L'inoculation d'*A.thaliana* avec les *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Rhizobium* spp. a révélé un taux élevé de plantes tolérantes, qui ont survécu après un traitement au chlorure de sodium (120 mM) (Fig. 46). Dans le cas d'application des *Sinorhizobium meliloti* (R4), *Rhizobium léguminosarum* (R1) et *Pseudomonas fluorescens* (P3), il a été constaté la survie de la presque totalité des plantes stressées (97 % à 100 %), alors qu'une inoculation avec *P. fluorescens* (P2) a montré 63 % de plantes apparaissant comme tolérantes.

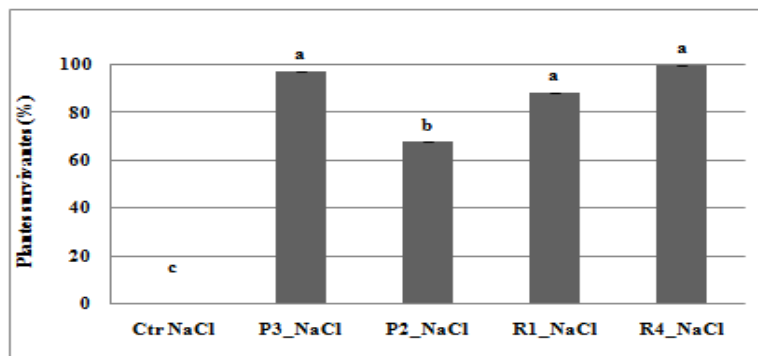


Figure 46: Pourcentage des plantes survivantes (tolérantes) d'*Arabidopsis thaliana* Col-0, inoculées avec P2: *Pseudomonas fluorescens* E64, P3: *Pseudomonas fluorescens* BB10, R1: *Rhizobium léguminosarum*, R4: *Sinorhizobium meliloti* et traitées au chlorure de sodium (120 mM). Les résultats ont été collectés 60 jours après germination. Les différentes lettres indiquent des différences significatives ($P < 0,05$).

3. Biomasse

L'inoculation des PGPRs a permis aux plants d'arabette de maintenir un niveau de croissance nettement significative par rapport au contrôle traité avec le chlorure de sodium (Fig. 47). L'application du NaCl (120 mM) a diminué fortement la croissance des plantes d'arabette par rapport aux plantes non stressées. Les rhizobacteries phytobénifiques appliquées chez les plants d'arabette sans stress salin n'ont révélé aucune différence significative par rapport au contrôle négatif traité avec l'eau.



R léguminosarum R 4+NaCl *R.léguminosarum* R1+NaCl *P. fluorescens* P3+NaCl *P. fluorescens* P2+ NaCl Contrôle



R léguminosarum R 4 *R.léguminosarum* R1 *P. fluorescens* P3 *P. fluorescens* P2 Contrôle (NaCl)

Figure 47 : Tolérance des plantes d'*Arabidopsis thaliana* Col-0, inoculées avec P2: *Pseudomonas fluorescens*E64, P3: *Pseudomonas fluorescens* BB10, R1: *Rhizobium léguminosarum*, R4: *Sinorhizobium meliloti* et traitées avec chlorure de sodium (120 mM), contrôle positif (NaCl), contrôle négatif (H₂O) (plantes âgées de 60 jours).

L'application de *Rhizobium léguminosarum* (R1) a augmenté significativement la surface foliaire, en présentant un groupe homogène à part dans les deux cas de l'expérimentation sans stress salin (a) ou avec stress salin (e). En comparant, la surface foliaire du témoin positif traité avec NaCl (3 cm²/g), tous les plants bactérisés ont présenté une surface foliaire nettement élevée (24 cm²/g à 70 cm²/g) (Figs. 48, 49). Les deux souches de *Rhizobium* appliquées, ont présenté le résultat le plus significatif dans la stimulation de la surface foliaire chez les plants traités avec le chlorure de sodium par rapport aux *Pseudomonas* fluorescents (Figs. 48, 49).

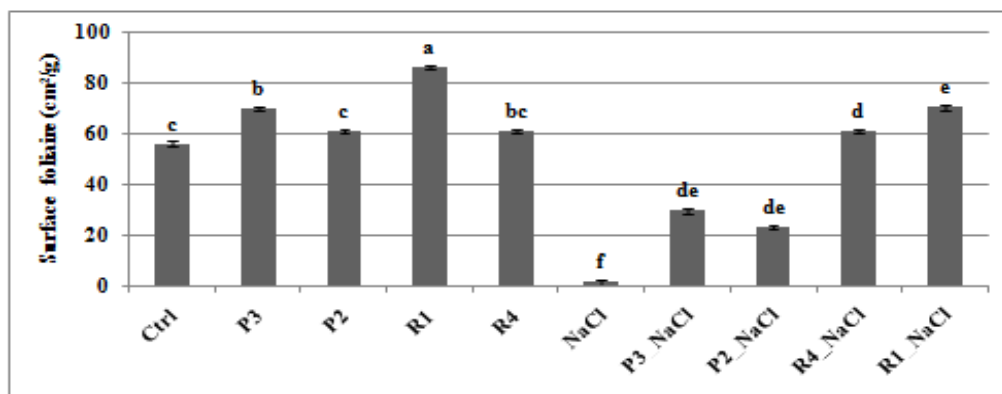


Figure 48 : Surface foliaire (cm²/g) des plantes d'*Arabidopsis thaliana* Col-0, inoculées avec P2: *Pseudomonas fluorescens* E64, P3: *Pseudomonas fluorescens* BB10, R1: *Rhizobium léguminosarum*, R4: *Sinorhizobium meliloti* et traitées au chlorure de sodium (120 mM), contrôle positif (NaCl), contrôle négatif (H₂O), (60 jours après germination). (P < 0,05).

4. Diamètre de la rosette

L'évolution du diamètre de la rosette des plants d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 durant 48 jours après germination a été évaluée (Fig. 50). Les plantes traitées avec les PGPRs et le chlorure de sodium ont révélé une stabilité dans l'évolution du diamètre à partir du 8^{ème} jour après l'application du stress salin par rapport au contrôle positif (NaCl), qui a montré une régression remarquable dans l'évolution. Les plantes traitées uniquement avec les rhizobactéries phyto-bénéfiques n'ont pas montré une différence significative par rapport au témoin négatif (H₂O) (Fig. 50).

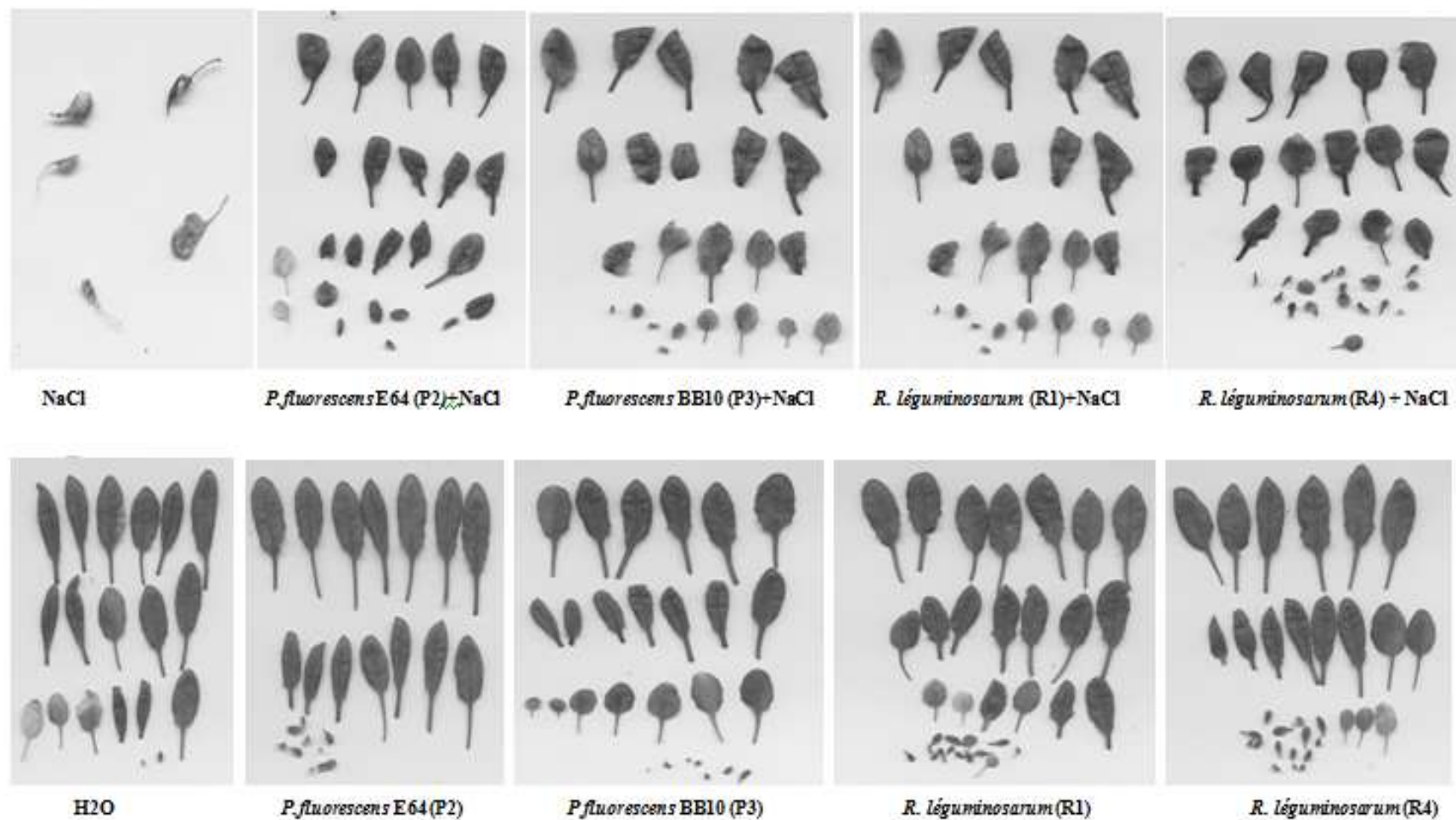


Figure 49 : Surfaces foliaires des plantes d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 inoculées avec P2: *Pseudomonas fluorescens* E64, P3: *Pseudomonas fluorescens* BB10, R1: *Rhizobium léguminosarum*, R4: *Sinorhizobium meliloti* et traitées avec chlorure de sodium (120 mM). Photos prises par scanner Epson perfection V700 photo.

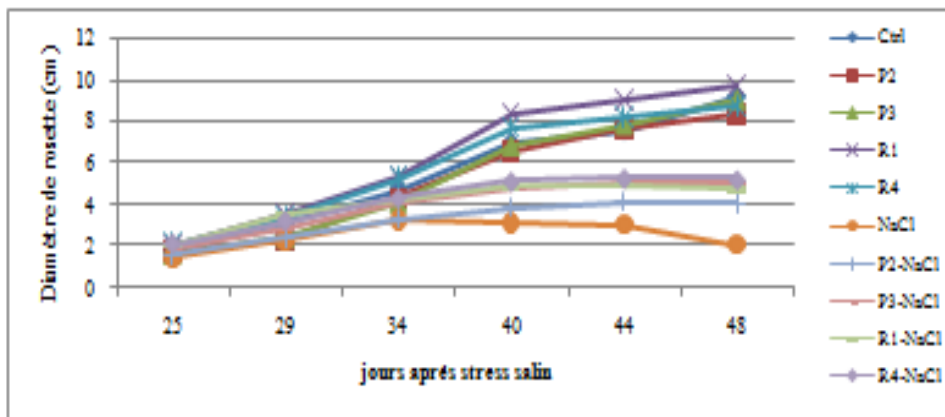


Figure 50 : Evolution du diamètre de rosette des plantes d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 inoculées avec P2: *Pseudomonas fluorescens* E64, P3: *Pseudomonas fluorescens* BB10, R1: *Rhizobium léguminosarum* R4: *Sinorhizobium meliloti* et traitées avec chlorure de sodium (120 mM) à partir du 25^{ème} jour après germination. ($P < 0,05$).

5. Architecture racinaire

L'application des rhizobactéries phyto-bénéfiques en interaction avec les plants d'arabette sur milieu MS a montré un effet notable sur la croissance et l'architecture racinaire. *Pseudomonas fluorescens* (P1), *Pseudomonas fluorescens* (P2) et *Rhizobium léguminosarum* (R1) ont inhibé la croissance en longueur des racines d'*A.thaliana*. *Pseudomonas fluorescens* (P3) et *Sinorhizobium meliloti* (R4) ont stimulé la croissance en longueur des plants d'*A.thaliana* (Fig. 51).

6. Discussion

L'expérimentation réalisée a montré un effet hautement significatif des PGPRs appliquées sur l'induction de la tolérance et la réduction de la symptomatologie des plants d'*A.thaliana* vis-à-vis du stress salin (120 Mm). Des études similaires ont montré l'effet positif des rhizobactéries phyto-bénéfiques à atténuer la sévérité du stress salin chez les plantes (Eaton, 1966 ; Grundon, 1987 ; Kurniadie et Redmann, 1999 ; Xu et al., 2000).

Les microorganismes de la rhizosphère peuvent conférer un certain degré de tolérance aux végétaux vis-à-vis des stress abiotiques comme la sécheresse, le froid, la salinité, la toxicité des métaux et la température élevée. Des bactéries appartenant aux différents genres, y compris *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Microbacterium*, *Enterobacter* ont été signalées comme des inducteurs de la tolérance chez les plantes vis-à-vis des stress abiotiques (Grover et al., 2011 ; Bharti et al.,

2016). La tolérance systémique, induite par les PGPRs, est proposée comme des changements physiques et chimiques qui peuvent atténuer et minimiser les menaces abiotiques (Kohler et *al.*, 2006).

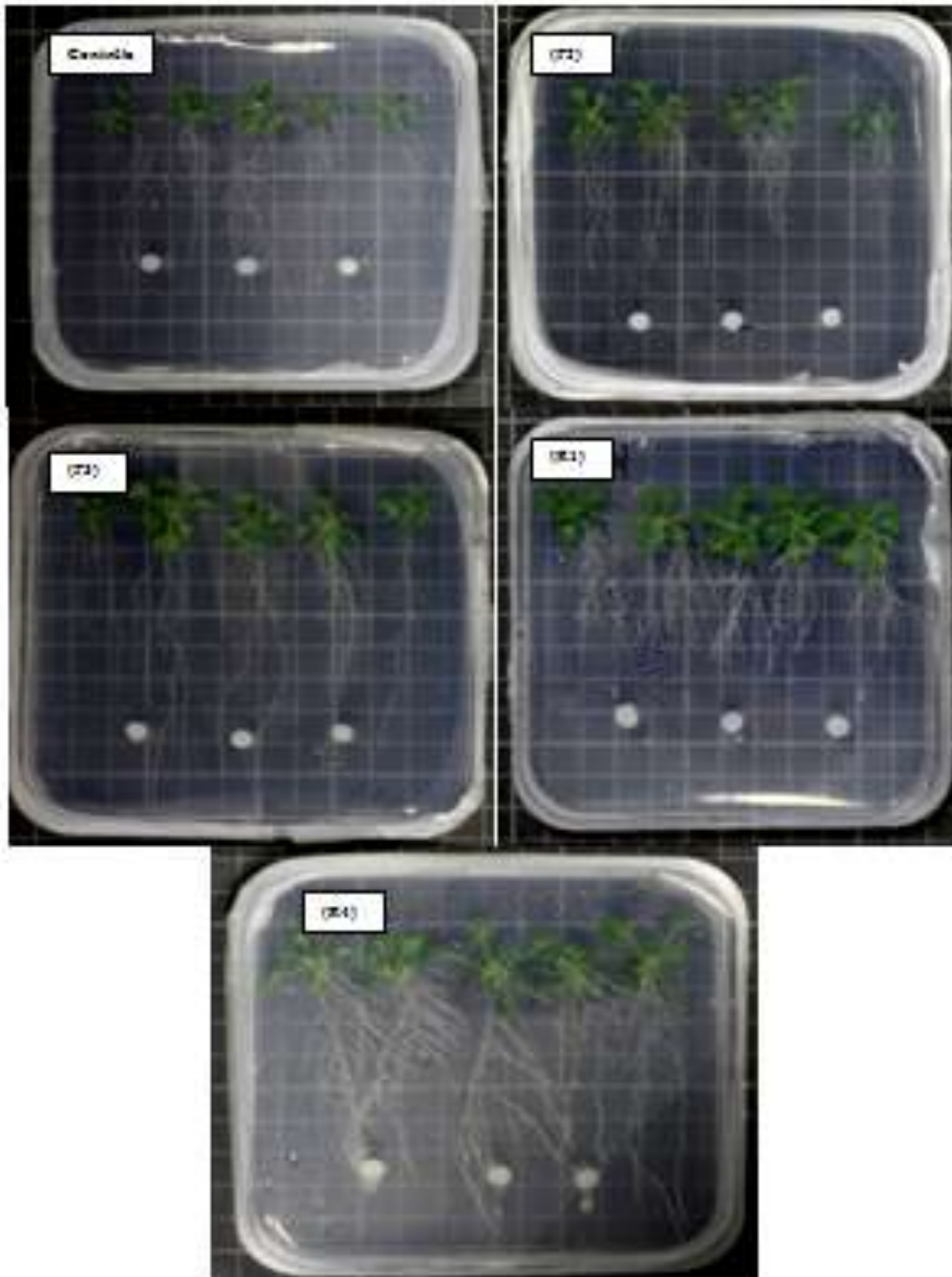


Figure 51 : Architecture racinaire des plantes d'*Arabidopsis thaliana* en interaction avec *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Rhizobium* spp. P2: *Pseudomonas fluorescens* E64, P3: *Pseudomonas fluorescens* BB10, R1: *Rhizobium léguminosarum*, R4: *Sinorhizobium meliloti*. Photos prises par caméra digitale à une distance de 50 cm.

Les rhizobactéries appliquées ont stimulé le diamètre de la rosette et la surface foliaire, cet effet était plus significatif chez les plantes stressées par NaCl. Dans ce contexte, sous des conditions de stress salin, plusieurs PGPRs ont stimulé la croissance des plantes en altérant la sélectivité de Na^+ , K^+ , et Ca^{2+} et en maintenant un niveau plus élevé du ration K^+/Na^+ (Hamdia *et al.*, 2004 ; Bharti *et al.*, 2016). Une fois la capacité de la cellule à stocker les sels est épuisée, les sels s'accumulent dans l'espace intercellulaire, conduisant à la déshydratation et à la mort cellulaire (Munns, 1993). Des concentrations élevées en Cl^- dans les tissus foliaires peuvent perturber la fonction photosynthétique par l'inhibition de l'activité de la nitrate réductase (Xu *et al.*, 2000).

Le stress salin est un effet cumulatif des stress osmotique et ionique qui affectent négativement la croissance et le rendement des plantes. Un réseau de gènes a été rapporté comme étant impliqués dans la tolérance à la salinité, la transduction du signal, les transporteurs d'ions, la régulation de la transcription et les voies métaboliques (Deinlein *et al.*, 2014).

Le stress osmotique peut être modulé par les voies ABA-dépendant et ABA-indépendant alors que, le stress ionique est atténué par la voie Salt Overly Sensitive (SOS) et les transporteurs d'ions via l'homéostasie des ions. Les plantes inoculées par des PGPRs présentent une expression plus élevée des gènes SOS sous stress salin par rapport aux plantes non bactériées; suggérant leur participation à des mécanismes de tolérance à la salinité. Le gène SOS4 est associé aux mécanismes de l'auxine et de l'éthylène ainsi qu'au développement des chevelus racinaires chez *Arabidopsis* (Shi *et al.*, 2008). L'expression de SOS4 dans les racines de blé inoculées par les PGPRs peut être corrélée avec l'amélioration de la longueur des racines et la croissance des plantes (Bharti *et al.*, 2016).

L'application de certains PGPRs a inhibé la croissance de la racine primaire et a favorisé la formation des racines secondaires, alors que l'application de d'autres souches stimule l'élongation de la racine primaire. Ces effets peuvent être liés à des potentialités exprimées par les PGPRs sur milieu MS. De nombreuses souches de PGPRs sont connues par leur effet à provoquer des modifications sur l'architecture du système racinaire des végétaux, en favorisant la formation des racines secondaires et en améliorant ainsi leur fonctionnement. Cependant, les mécanismes moléculaires qui expliquent et déterminent ce phénomène restent peu connus (López-Bucio *et al.*, 2007; Felten *et al.*, 2009).

L'architecture du système racinaire est définie par trois processus: la croissance indéterminée de la racine principale qui est orchestrée par le méristème racinaire; la formation

des racines latérales et la formation des chevelus racinaire. Le développement postembryonnaire des racines est contrôlé par la division cellulaire dans la zone méristématique, et la différenciation fonctionnelle en des cellules spécialisées (Bennett et Scheres, 2010). Les racines latérales et les chevelus racinaires constituent d'importants aspects de l'architecture racinaire qui facilitent l'ancrage des plantes et augmentent leur capacité d'absorption de l'eau et des minéraux (Casimiro et *al.*, 2003 ; Overvoorde et *al.*, 2011).

Les changements dans l'architecture du système racinaire peuvent résulter de l'interaction des PGPRs avec les hormones impliquées dans la régulation du développement des racines comme l'auxine, la cytokinine, l'éthylène, la gibbérelline et l'acide ascorbique (Dodd et *al.*, 2010; Overvoorde et *al.*, 2011).

La balance entre l'auxine et le cytokinine est un régulateur clé de l'organogénèse des plantes et de l'architecture des racines (Aloni et *al.*, 2006). Le rapport entre l'auxine et le cytokinine peut être affecté par les PGPRs. Ces rhizobactéries sont capables de produire une large gamme de phytohormones, y compris les auxines et/ou les cytokinines et les métabolites secondaires qui peuvent interférer avec ces voies hormonales (Bharti et *al.*, 2016).

De nombreux PGPRs sont capables de produire des phytohormones, des métabolites secondaires interférant avec la voie de l'auxine comme l'auxine, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG) et le nitroxyde (NON). L'acide indole-3-acétique (IAA) est le composé le plus synthétisé par plusieurs PGPRs (Spaepen et *al.*, 2007a). L'IAA exogène contrôle différents processus de développement et de croissance chez les plantes. Une faible concentration de l'IAA peut stimuler l'élongation de la racine primaire, alors qu'une concentration élevée stimule la formation des racines secondaire, diminue la longueur de la racine primaire et augmente le nombre de chevelus racinaires (Dobbelaere et *al.*, 1999 ; Remans et *al.*, 2008).

Le DAPG est un composé produit par les pseudomonads fluorescents, est bien connu par son activité antimicrobienne (Phillips et *al.*, 2004 ; Couillerot et *al.*, 2011). Le DAPG peut interférer avec la voie de l'auxine-dépendant qui modifie l'architecture du système racinaire. L'application exogène du DAPG a induit l'inhibition de la racine primaire et la stimulation de la formation des racines latérales chez tomate (Brazelton et *al.*, 2008).

DISCUSSION GENERALE

Pseudomonas fluorescents ont une grande importance économique et agricole comme agents de lutte biologique (Moynihan et *al.*, 2009). Ils sont largement exploités pour leurs contributions à augmenter la productivité des cultures agricoles en stimulant la croissance et en renforçant les capacités défensives des plantes (van Loon et *al.*, 2008; Pieterse et *al.*, 2014; Bharti et *al.*, 2016). Ces ressources microbiennes bénéfiques sont devenues une alternative ou complémentaire de l'utilisation des produits chimiques, qui peuvent engendrer des effets secondaires sur l'environnement et la santé humaine. Les communautés microbiennes naturelles offrent une opportunité pour une gestion durable des écosystèmes (Ramamoorthy et *al.*, 2001 ; Pieterse et *al.*, 2014 ; Boukerma et *al.*, 2017).

Le test d'antagonisme *in vitro* est souvent utilisé comme indicateur dans la sélection des souches bénéfiques, même si les potentialités antagonistes ne peuvent pas être déterminées avec précision à travers cet essai. Les résultats obtenus ne transposent pas en pratique les potentialités réelles des agents antagonistes. Ce test reste comme un critère orientatif dans le criblage préliminaire des souches qui peuvent renfermer des potentialités bioactives en antagonisme microbien.

L'étude de l'architecture racinaire a montré que les *Pseudomonas* fluorescents locaux et les *Rhizobium* spp. d'origine espagnole affectent la croissance des racines, en dépendance des potentialités de chaque souche et de l'interaction souche-génotype. Cet effet est exprimé soit en inhibant la croissance en longueur et en favorisant le développement des racines latérales ou bien en stimulant la croissance de la racine primaire et les racines secondaires.

Les PGPRs sont connues par leurs effets à stimuler les réactions de défense des plantes contre différents stress abiotique et biotique (Ryu et *al.*, 2003; Lugtenberg et Kamilova, 2009; Schwachtje et *al.*, 2011). Différents types de résistance induite ont été définis en fonction de leurs voies de signalisation et leurs spectres d'efficacité, y compris la résistance systémique acquise et la résistance systémique induite. Une variété d'agents biologiques et de molécules biotiques et abiotiques ont été signalés comme inducteur de la résistance systémique chez les plants. La résistance résultante peut être efficace vis-à-vis d'un large spectre d'agents pathogènes. Elle peut être durable, mais est rarement complète ; la plupart des agents inducteurs réduisent la taille et / ou le nombre de lésions en diminuant la maladie entre 20 et 85% (Walters et *al.*, 2011 ; Pieterse et *al.*, 2014).

Les résultats de notre étude ont montré l'effet positif des souches rhizobactériennes appliquées (locales et de référence) sur l'induction de la résistance et de la tolérance de l'arabette et la tomate avec différents degrés de protection. Des modifications significatives au niveau du métabolome et du transcriptome et de la physiologie ont été également notées. Les recherches récentes en biologie moléculaire ont démontré que la sensibilisation des plantes pour répondre plus rapidement à l'infection peut conférer une protection significative contre les microorganismes virulents (Benhamou et Picard 2000 ; Piertese et *al.*, 2014).

La bioprotection notée a été stimulée par l'application des souches bactériennes vivantes ou traitées aux UV, et également par des bioeffecteurs isolés et appliqués. Les travaux de Ongena et *al.*, (2002) n'ont pas présenté un effet positif suite à l'application de souches rhizobactériennes traitées à la chaleur, ce qui suggère que les composants structurels de la surface bactérienne de N21.4 sont très importants pour éliciter l'ISR. Les éliciteurs des PGPRs ont été largement signalés par leur efficacité dans la protection des cultures contre les maladies (Bakker et *al.*, 2003; Meziane et *al.*, 2005; Ramos-Solano et *al.*, 2008).

Nos résultats ont également révélé que l'induction de la résistance systémique chez les plants de tomate traités par *P. fluorescens* N21.4 n'est pas associée à des changements de l'expression des gènes codants pour PR1, PR2 et PR3. Généralement l'ISR n'est pas associée à l'expression des protéines PRs. Ce qui suggère que l'induction de la résistance systémique élicitée par N21.4 phyto-bénéfique appliquée suit une voie de signalisation AS-indépendante.

Les réponses des plantes à l'attaque des micro-organismes sont complexes et comportent l'induction de l'expression d'un grand nombre de gènes codant pour une variété de protéines. La SAR est caractérisée par l'accumulation de l'acide salicylique et de protéines PRs qui servent de marqueurs de ce type de résistance (Sarosh et *al.*, 2005). Ces protéines PRs sont actuellement classées en 17 groupes selon leurs propriétés biochimiques et moléculaires. Elles sont définies comme protéines codées par la plante hôte, mais induites spécifiquement dans des situations pathologiques (van Loon et *al.*, 2008).

L'action des rhizobactéries appliquées sur la croissance a été différente selon leurs conditions d'application et le génotype étudié. Cette action a été soit positive, neutre ou négative. Cet effet peut être lié à la réponse de la plante à son environnement et selon la distribution de ses ressources énergétiques entre la croissance et l'expression des mécanismes de défense ou de tolérance. Selon Walters et *al.*, (2013), la résistance induite est une réponse de l'hôte, son expression est influencée par différentes conditions : l'environnement, le

génotype, la nutrition des cultures. La compréhension de l'impact de ces influences sur l'expression de la résistance induite est peu claire.

Il est connu que le génotype de l'hôte affecte l'expression de la résistance (Martelli et al., 1993, Hijwegen et Verhaar, 1994; Dann et coll., 1998; Tucci et al., 2011). Walters et al. (2011a) ont examiné l'influence du génotype de l'hôte sur l'expression de la résistance induite chez l'orge. En utilisant une combinaison d'éliciteurs de résistance (BABA et cis-jasmone), ils ont découvert que l'expression de la résistance induite varie considérablement entre les variétés d'orge, alors que certaines variétés n'ont pas exprimé de résistance (Walters et al., 2011). Dans une étude similaire, les génotypes de tomate traités avec des éliciteurs de BABA varient significativement dans leur expression de la résistance contre *Phytophthora infestans* (Sharma et al., 2010). Le niveau d'induction de la résistance est affecté significativement par les isolats du pathogène. Sharma et al. (2010) ont également observé que le degré d'induction de résistance a tendance à diminuer avec l'augmentation de l'âge des feuilles (Cohen et Gisi, 1994).

La mesure de la fluorescence a révélé une amélioration de l'activité photosynthétique, représentée avec un taux significatif du rendement quantique du PSII. L'expression des réactions de défense nécessite de l'énergie, ce qui peut diminuer la croissance. Cet effet peut dépendre de l'interaction Plante-PGPR-Pathogène. L'expression de la défense des plantes est coûteuse, nécessitant de l'énergie qui sera autrement utilisé pour la croissance et le développement. Les réactions de défense de la résistance induite ne sont activées qu'à la suite d'une attaque par un agent pathogène, ce qui représente un avantage sélectif pour la plante (Walters et Heil, 2007).

Smedegaard-Petersen et Stolen (1981) ont montré que l'expression de la résistance chez l'orge vis-à-vis de l'oïdium a été associée à une réduction de 7% dans le rendement et une réduction de 4% dans la taille des grains et dans la teneur en protéines. Cependant, d'autres travaux n'ont trouvé aucun effet négatif (Oerke et al., 1989).

Les enzymes antioxydantes peuvent être impliquées dans l'élimination des ROS générées lors de l'attaque de l'agent pathogène ou les ROS générées au niveau du PSII, lors de la photosynthèse. Il a été montré une corrélation entre la réponse de la plante et les changements du métabolome et de la physiologie des cellules. Ces changements ont été accompagnés par des modifications structurales incluant la formation d'appositions pariétales riches en callose et l'accumulation des composés phénoliques au niveau des sites de pénétration de l'agent pathogène. L'activation de la voie des phénylpropanoïdes est un

phénomène crucial dans la limitation de la croissance de l'agent pathogène et dans la survie des cellules-hôtes (Benhamou et Picard, 2000).

L'élicitation de l'ISR chez les plantes implique le priming des réactions de défense, ce qui renforce les capacités défensives des plantes vis-à-vis des agents pathogènes (Baluska et Ninkovic, 2010 ; Tonelli et *al.*, 2011 ; Pietese et *al.*, 2014). Ce phénomène potentialise la résistance des plantes et il est efficace vis-à-vis de différents stress biotiques et abiotiques (Kuč, 1982). En plus de la résistance aux agents pathogènes, différentes études ont démontré que l'activation des défenses inductibles affecte la croissance et la reproduction des plantes (Heil et Bostock 2002).

Le quorum sensing contrôle l'activité de biocontrôle et d'induction de la résistance systémique par les PGPRs (Liu et *al.*, 2008 ; Girard et *al.*, 2006). *P. putida* ISOF colonise les racines de la tomate et produit des N-acyl homoserines lactones dans la rhizosphère, ces molécules augmentent la résistance systémique des plants de tomate contre *Alternaria alternata* (Schuhegger et *al.*, 2006). Chez le radis, l'élicitation de l'ISR par *P. fluorescens* WCS374 nécessite une densité de population de 10^5 cfu/g pour la suppression significative de la maladie (Raaijmakers et *al.*, 1995).

Les plantes traitées avec NaCl (120Mm) et bactérisées ont pu survivre et maintenir une faible croissance. À partir de nos données, il semble que ces plantes ont toléré les conditions salines en présence des rhizobactéries appliquées. L'application de nos souches locales a montré une induction de la tolérance vis-à-vis à la salinité alors que leur application dans des conditions normales n'a montré aucun effet.

En raison, de la complexité du métabolisme bactérien, la régulation de la production des métabolites secondaires, les caractéristiques génotypiques de chaque souche et l'expression phénotypique qui restent dépendante des conditions du milieu. En plus, plusieurs mécanismes d'action peuvent intervenir directement ou indirectement dans l'activité des rhizobactéries phytobénéfiques.

Le stress abiotique est l'une des contraintes les plus importantes dans la production agricole. Les concentrations élevées en sel dans les terres agricoles est un problème mondial et constituent un effet inhibiteur de la croissance des plantes dans de nombreuses cultures (Mayak et *al.*, 2004 ; Cheng et *al.*, 2007).

Les microorganismes associés aux plantes peuvent jouer un rôle important par l'induction de la tolérance aux stress abiotiques et en soulageant la plante. Les rhizobactéries peuvent exercer une variété de mécanismes comme production des hormones de croissance, des nutriments, et en induisant l'expression de gènes de tolérance chez les plantes (Bharti et *al.*, 2016). L'étude de Kim et *al.* (2014) a révélé que la souche *Enterobacter* sp. EJ01, améliore la croissance de la tomate et l'arabette et réduit la gravité du stress salin en produisant 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase et l'Indole-3-acétique (IAA).

CONCLUSION

De nombreuses études ont rapporté et proposent l'utilisation des PGPRs comme une solution alternative ou complémentaire aux intrants chimiques, qui peuvent assurer une efficacité durable (Ongena et *al.*, 2000 ; Verhagen et *al.*, 2010 ; Haas et Défago, 2005; Piertese et *al.*, 2014). Les PGPRs peuvent contrôler les maladies des cultures par leurs actions directes et indirectes sur les phytopathogènes, en stimulant les réactions de défense des végétaux et/ou en produisant des métabolites secondaires, antimicrobiens et/ou d'enzymes hydrolytiques et/ou par compétition trophique.

Les travaux de ce manuscrit ont été réalisés avec différentes souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et de *Rhizobium* spp. locales et de référence. Ces souches ont montré leur potentiel en biocontrôle et en induction de la résistance systémique vis-à-vis de la fusariose vasculaire et de la gale bactérienne chez la tomate. Aussi, elles ont induit la tolérance chez l'arabette vis-à-vis du stress salin.

La séparation spatiale, entre les agents pathogènes inoculés au niveau foliaire ou en système split root et les PGPRs (N21.4, PF15, PP27, P2, P3, R1, R4) appliquées au niveau racinaire confirme que la réduction de la maladie, comme une conséquence de l'induction de la résistance systémique chez la plante. La colonisation des racines par les PGPRs a modifié leur croissance en dépendant des potentialités exprimées de chaque souche et de l'interaction souche (PGPR)-génotype (plante).

L'action des PGPRs suite à la reconnaissance avec la plante peut toucher différents niveaux : un changement du phénotype qui peut être liés à des changements dans le métabolome et le transcriptome. L'apport des souches rhizobactériennes retarde l'apparition et l'évolution des symptômes et réduit significativement la cinétique d'évolution des trois stress étudiées (la fusariose vasculaire, la gale bactérienne et le stress salin). Cette bioprotection s'est exprimée en réduisant le processus de la symptomatologie, fortement quantitativement plutôt que qualitativement.

P. fluorescens N21.4 a stimulé les enzymes antioxydantes après l'application de l'agent pathogène chez la tomate. Ces enzymes peuvent être impliquées dans l'élimination des ROS générées lors de l'attaque de l'agent pathogène ou les ROS générées au niveau du PSII lors de la photosynthèse.

L'application des rhizobactéries bénéfiques comme agent de biocontrôle et inducteur de la défense naturelle chez les plants de tomate a amélioré l'activité photosynthétique (Φ PSII,

F0, NPQ), qui peut affecter directement l'induction des réactions de défense des plantes ; en les approvisionnant par l'énergie nécessaire à l'expression des réactions de défense ; dans ce cas, le taux de croissance est peu affecté.

Nos résultats ont également révélé que l'induction de la résistance systémique chez les plants de tomate traités avec *P. fluorescens* N21.4 n'est pas associée à des changements de l'expression des gènes codants pour PR1, PR2, PR3. Ce qui suggère que l'induction de la résistance systémique élicitée par N21.4 phyto-bénéfique appliquée suit une voie de signalisation AS-independante.

La gestion durable en agriculture est fortement orientée ces dernières années vers des réductions de l'utilisation des pesticides (Hillocks, 2012). Il est donc nécessaire de rechercher et de développer des approches de lutte contre les maladies des plantes. L'induction de la résistance peut offrir des perspectives d'une gestion durable pour protéger les cultures en utilisant un phénomène existant dans la plante, sa propre résistance. Induire et renforcer les mécanismes de défense propres d'une plante (ISR) en appliquant les rhizobactéries phyto-bénéfiques est une nouvelle stratégie en matière de gestion des bioagresseurs. Bien que de nombreux exemples d'induction de la résistance systémique par les PGPRs soient disponibles, peu d'études biochimiques et transcriptomiques ont démontré l'effet protecteur chez la plante hôte. Cependant, l'induction de la résistance est peu efficace dans la gestion des maladies par rapport aux pesticides. L'expression de la défense est une réponse de l'hôte et est grandement influencée par le génotype et l'environnement.

La gestion des maladies des cultures par l'application des PGPRs dépend de la reconnaissance et du dialogue moléculaire qui s'établira entre le végétal, les PGPRs et l'agresseur. *Pseudomonas* spp. fluorescents présentent de nombreux avantages pour leur utilisation dans la gestion des maladies des cultures. Ils peuvent établir une reconnaissance et coloniser divers génotypes végétaux, ces actions sont justifiées par leurs capacités adaptatives et évolutives. De plus, les nombreuses connaissances acquises sur leur génétique, leur physiologie et leur formulation commerciale peuvent ouvrir des voies vers des préparations commerciales à l'échelle pratique.

Des études sur la relation entre les racines et le microbiote sont essentielles pour comprendre et maîtriser les interactions au niveau de la rhizosphère, l'origine de la stimulation des capacités défensives, afin d'atteindre des pratiques efficaces pour une agriculture durable. Des connaissances approfondies sur les potentialités des PGPRs et une compréhension précise des mécanismes d'action sont bien exigées, pour améliorer l'efficacité

pratique des rhizobactéries, obtenir de meilleures performances écologiques et pour éviter des échecs éventuels. Pour cela, il est indispensable de sélectionner des souches douées de potentialités stables, reproductibles et adaptées aux différentes conditions telluriques par le séquençage (NGS) afin de raccourcir le temps de sélection des souches bénéfiques.

Il est fortement souhaitable d'approfondir les investigations relatives au séquençage de l'ARN (ARN seq) afin de détecter les gènes de défense exprimés qui pourraient expliquer les aspects sous adjacent de biocontrôle. Identifier les éliciteurs et les signaux activant la résistance naturelle, constitue une solution intéressante sur les plans scientifique et agronomique, qui pourrait bien être une solution d'avenir.

ANNEXE 1 : milieux de culture

● Milieu King B (King et *al.*, 1954).

- ✓ Peptone(Difco) 20 g
- ✓ Glycérol (prolabo) 15 ml
- ✓ K₂HPO₄ (sigma) 1,5 g
- ✓ MgSO₄ (sigma) 1,5 g
- ✓ Agar (sigma) 15 g
- ✓ Eau distillée 1000 ml
- ✓ pH=7,2, autoclavage 20 minutes à 120 °C

● Milieu YEM (Yeast Extract-Mannitol, Vincent, 1970)

- ✓ K₂HPO₄ 0,5g/l
- ✓ MgSO₄, 7 H₂O 0,2g/l
- ✓ NaCl 0,1g/l
- ✓ Extrait de levure 0,6g/l
- ✓ Mannitol 10g/l

● Milieu PDA gélosé (Potato Dextrose Agar) (Jonsthor et Booth, 1983).

- ✓ Pomme de terre 200 g
- ✓ Dextrose 20 g
- ✓ Agar 15 g
- ✓ Eau distillée 1000 ml
- ✓ pH=7, autoclavage 20 minutes à 120 °C

● Milieu mixte.

- ✓ PDA 50%
- ✓ KB 50%
- ✓ pH= 7, autoclavage 20 minutes à 120 °C

● Milieu PDA liquide (Potato Dextrose Agar) (Jonsthor et Booth, 1983).

- ✓ Pomme de terre 200 g
- ✓ Dextrose 20 g
- ✓ Eau distillée 1000 ml
- ✓ pH=7, autoclavage 20 minutes à 120 °C

● Milieu PCA (Plate Count Agar)

- ✓ Peptone caséine 5g
- ✓ Extrait de levure 2.5g
- ✓ Glucose 1g
- ✓ Agar 15g
- ✓ pH= 7, autoclavage 20 minutes à 120 °C

ANNEXE 2 : Fiche technique de la variété Marmande V (Institut Technique des Cultures Maraîchères et Industrielles, Staoueli, ITCMI)

● Plante

- ✓ Type de semences : fixée ou standard
- ✓ Croissance : semi déterminée
- ✓ Vigueur : moyenne
- ✓ Précocité : très bonne
- ✓ Couvert végétal : moyen
- ✓ Couleur du feuillage : vert
- ✓ Aération : moyenne
- ✓ Ecart entre nœud : court à moyen

ANNEXE 3 : protocoles

Extraction d'ARN et conditions de qPCR

Transférer la poudre de l'échantillon à un eppendorf

Ajouter 1 ml d'ARN solution de lyse

Homogénéiser l'échantillon avec un homogénéisateur a une haute vitesse pendant 45s

Centrifuger 2600g/5mn à la température ambiante

Transférer le supernageant a un nouveau tube (RNase free tube)

Les étapes suivantes sont effectuées pour laver et éluer l'échantillon :

Ajouter 0.5 volume de 100% d'éthanol à chaque volume d'homogénat

Homogénéiser par vortex

Transférer 700 µl de l'échantillon de l'ARN à un tube de spin cartridge

Centrifuger à 12000 g/ 15 s

Répéter 3-4 fois

ADNase traitement en utilisant le kit (DNase I)

Ajouter wash buffer I. Centrifuger à 12000 g/ 15 s

Ajouter 500 µl wash buffer II et l'éthanol

Centrifuger 12000g/1 mn

Pour éluer l'ARN, ajouter 50 µl H₂O stérile

Centrifuger 12000g/ 2mn

Collecter l'ARN, mettre sur glace et conserve à - 80°C

Rétrotranscription

4 µl de 5x iScript reaction mix,

1 µl iScript reverse transcriptase

x µl Nuclease-free water

x µl RNA template

Le mix final doit avoir un volume total de 20 µl

L'incubation a été réalisée:

5 minutes à 25°C

30 minutes à 42°C

5 minutes à 85°C

Conservation à 4°C

PCR quantitative (qRT)

Utiliser 1 à 4 µL d'ADNc dilué.

Préparer un mélange pour chaque d'ADNc.-template avec les composés suivants

DNAc 1.3 µL

H₂O sterile 1 µL

Mixer bien.

Mettre le mélange réactionnel dans une plaque de 384 puits.

Préparer un second mélange réactionnel avec les composants suivants

Pour chaque combinaison d'amorces, il a été utilise :

SybrGreen Mix 5 µL

Primer (forward) 0.3 µL

Primer (reverse) 0.3 µL

Analyse des données:

La formule suivante a été utilisée pour calculer le taux d'expression de gènes cibles par rapport aux gènes de contrôle:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Target}})^{CP_{\text{Target}}}}{(E_{\text{Control}})^{CP_{\text{Control}}}}$$

E : RT.PCR efficiencies, CP : crossing point

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aarons S., Abbas A., Adams C., Fenton A. and O'gara F. 2000. A Regulatory RNA (PrrB RNA) Modulates Expression of Secondary Metabolite Genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of bacteriology*, 182, (14): 3913-3919.
2. Abdel-Salam M.S., Abd El-Halim M.M. and El-Hamshary O.I.M. 2007. Improvement of *Pseudomonas* antagonism against *Fusarium Oxysporium* through protoplast fusion: I- fusants induction. *Research Journal of Cell and Molecular Biology*, 1, (1): 37-41.
3. Aboul-Soud M.A.M., Yun B.W, Harrier L.A., and Loake G.J. 2003. Transformation of *Fusarium oxysporum* by particle bombardment and characterisation of the resulting transformants expressing a GFP transgene. *Mycopathologia*, 00: 1-8.
4. Agrios G.N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, Department of Plant Pathology University of Florida, 635p.
5. Alberte Randall S. and J. Philip Thornber Edwin L. Fiscus. 1977. Water Stress Effects on the Content and Organization of Chlorophyll in Mesophyll and Bundle Sheath Chloroplasts of Maize *Plant Physiol.* 59 (3): 351–353.
6. Alit-Susanta W., Gusti N. and Takikawa Y. 2006. Analysis of the *gacS-gacA* regulatory genes of spontaneous mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain PfG32R. *J Gen Plant Pathol.* 72: 159-167.
7. Alka G., Murali G. 2008. Siderophore production by plant growth promoting rhizobacteria. *Indian Journal of Agricultural Research*, 42, (2): 153-156.
8. Allen J.A, Chambers JL, Stine M. 1994. Prospects for increasing the salt tolerance of forest trees: a review. *Tree Physiol*, 14, (7-9): 843-853.
9. Almagro L., Gomez R.L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros B.A., and Pedreno M.A. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60, (2): 377-390.
10. Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich C.I. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot*, 97:883–893.
11. AL-Saleh Mohammed A. 2011. Pathogenic variability among five bacterial isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causing spot disease on tomato and their response to salicylic acid Moha. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10, (1): 47-51.
12. Alvarez M. E., Nota F., Cambiagno D. A. 2010. Epigenetic control of plant immunity. *Mol. Plant Pathol.* 11 : 563–576.
13. Arkhipova T.N., Veselov S.U., Melantiev A.I., Marty N.E.V., Kudoyerova G.R. 2005. Ability of bacterium *Bacillus* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272: 201-209.
14. Arnason J.T. and Bernard M.A. 2010. Impact of constitutive plant natural products on herbivores and pathogens *Can. J. Zool*, 88: 615-627.
15. Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24: 1-15.
16. Asada Koz. 2006. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology*, 141 (2) :391- 396.
17. Aslantas R., Cakmakci R., Sahin F. 2007. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apples trees growth and fruit yield under orchard conditions. *SCI HORT*, 111 (4): 371-377.
18. Ausubel F.M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol*, 6, (10): 973-979.
19. Babalola O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett*, 32, (11): 1559-1570.
20. Bachem C.W.B., Speckmann G., Linde P.C.G., Verheggen F.T.M., Hunt M.D., Steffens J.C. and Zabeau, M. 1994. Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. *Bio/Technology*, 12 : 1101-1 105.
21. Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J., and Van Loon L.C. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97, (2): 239-243.
22. Bakker P.A.H.M., Ran L.X., Pieterse C.M.J. and Van Loon L.C. 2003. Understanding the involvement of rhizobacteriamediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can. J. Plant Pathol*, 25: 5-9.
23. Baluska F. and Ninkovic V. 2010. *Plant Communication from an Ecological Perspective*. Springer, Germany, 252 p.
24. Baset M.M.A., Shamsuddin Z.H., Wahab Z. and Marziah M. 2010. Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured *Musa* plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *Australian Journal of Crop Science*, 4 (2): 85-90.
25. Baudry C., Brézellec H. 2006. *Microbiologie-Immunologie: Cahiers du Préparateur. Porphyre (2^{ème} édition)*, France, 126 p.
26. Bavaresco L., Fogher C. 1996. Lime-chlorosis occurrence and leaf mineral composition of grapevine treated by root microorganisms. *Journal of plant nutrition*, (1), 19: 87-98.
27. Beckers G.J.M. and Conrath U. 2007. Priming for stress resistance: From the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 425-431.
28. Benchabane M., Bakour R., Toua D., Boutekrabort A. 2000. Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. *EPPO Bulletin*, 30, (2) : 243-246.
29. Benchabane M., Bakour R., Toua D., Boutekrabort A. 2000. Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. *EPPO Bulletin*, 30: 243–246.
30. Benhamou N., Gagne S., Quere D.L and Dehbi L. 2000 Bacterial mediated induced resistance in cucumber: Beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 90: 45- 56.
31. Benhamou Nicole et Picard Karine. 2000. La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes *PHYTOPROTECTION*, 80 : 137-168.
32. Bennett T, Scheres B. 2010. Root development: two meristems for the price of one? *Curr Top Dev Biol*, 91: 67–102.
33. Berger Susanne, Zuzana Benediktyová, Karel Matouš, Katharina Bonfig, Martin J. Mueller, Ladislav Nedbal, Thomas Roitsch. 2007. Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *J Exp Bot*, 58 (4): 797-806.
34. Bernstein L. 1975. Effects of salinity and sodicity on plant growth. *Annual Review of Phytopathology*, 13 : 295-312.
35. Berrocal-Lobo M. and Molina A. 2007. *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends in Plant Science*, 13, (3): 145-150.

36. Bharti Nidhi, Shiv Shanker Pandey , Deepti Barnawal , Vikas Kumar Patel & Alok Kalra. 2016. Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress Scientific Reports 6.
37. Bharti Niharika and Bhatla C Satish. 2016. Nitric oxide mediates strigolactone signaling in auxin and ethylene-sensitive lateral root formation in sunflower seedlings Plant Signal Behav, 10, (8): 1-10.
38. Bloemberg G.V. and Lugtenberg B.J.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr. Opin. Plant Biol, 4, 343-350.
39. Bloemberg G.V., Wijffes A.H.M., Lamers G.E.M., Stuurman N. and Lugtenberg B.J.J. 2000. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. Mol. Plant Microbe Interact. 13: 1170-1176.
40. Blumer C., Heeb S., Pessi G. and Haas D. 1999. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 96: 14073-14078.
41. Boller T. 1993. Antimicrobial functions of the plant hydrolases chitinase and β -1,3-glucanase. In Developments in Plant Pathology. Eds. B. Fritig and M. Legrand. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 391-396
42. Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner Sarah L., Gerrish Chris and Minibayeva Farida. 2002. The apoplastic oxidative burst in response biotic stress in plants: A three component system. Journal of Experimental Botany, 53 (372): 1367-1376.
43. Bolwell G.P., Gerrish C., Salaun J.P. 1997. Changes in enzymes involved in suberization in elicitor treated French bean cells. Photochemistry, 45: 1351-1357.
44. Bordiec S., Paquis S., Lacroix H., Dhondt S., Ait Barka E., Kauffmann S., Jeandet P., Mazeyrat-Gourbeyre F., Clément C., Baillieul F., Dorey S. 2010. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in grapevine cell suspensions. J Exp Bot.
45. Boukerma L., Benchabane M., Charif A., Khélifi L. 2017. Activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) in the biocontrol of tomato Fusarium wilt. Plant Protect. Sci. 53: 78–84.
46. Boukerma, L. 2012. Effet des PGPR (*Pseudomonas* spp. fluorescents) sur le biocontrôle et l'induction de la résistance systémique (IRS) chez la tomate *vis-a-vis* de la fusariose vasculaire. Thèse de Magister. 165p.
47. Bowles D.J. 1990. Defense related proteins in higher plants. Annu. Rev. Biochem, 59, 873-907.
48. Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
49. Brazelton J.N., Pfeufer E.E., Sweat T.A., McSpadden Gardener B.B., Coenen C. 2008. 2,4-Diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21:1349–1358.
50. Brodhagen M., Henkels M.D. and Loper J.E. 2004. Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl.Environ.Microbiol*, 70, 1758-1766.
51. Brooks B.E., Buchanan S.K. 2008. Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1778, 1930-1945.
52. Bruce T.J.A. and Pickett J.A. 2007. Plant defence signalling induced by biotic attacks. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 387-392.
53. Bruce T.J.A., Matthes M.C., Napier Johnathan A., Pickett J.A. 2007. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, 173: 603-608.
54. Bulit J., Louvet J., Bouhot D., Toutain G. 1967. Travaux sur le Bayoud, fusariose du Palmier dattier en Afrique du Nord. *Ann. Epiphyties*, 18 : 213-239.
55. Burton J. C. 1985. Rhizobium relationships. *Agronomy*, 25 : 161-185.
56. Caballero-Mellado J., Martínez-Aguilar L., Paredes-Valdez G., and Estrada-de L.S.P. 2004. *Burkholderia unamae* sp nov. a N₂-fixing rhizospheric and endophytic species, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 54, 1165-1172.
57. Cao H., Bowling S.A., Gordon A.S., Dong X. 1994. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 6: 1583-1592.
58. Casimiro I, Beekman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang HM, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ. 2003. Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci*, 8: 165–17.
59. Cazorla F.M., Duckett S.B., Bergström E.T., Noreen S., Odijk R., Lugtenberg B.J.J., Thomas-Oates J.E. and Bloemberg Guido V. 2006. Biocontrol of Avocado Dematophora Root Rot by Antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 correlates with the Production of 2-Hexyl 5-Propyl Resorcinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, (4): 418-428.
60. Chan, Z., Grumet, R., Loescher, W. 2011. Global gene expression analysis of transgenic, mannitol-producing and salt tolerant *Arabidopsis thaliana* indicates widespread changes in expression of abiotic- and biotic-stress related genes. *J. Expt. Bot.* (in press).
61. Chen C., Bélanger R.R., Benhamou N. and Paulitz T. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 56: 13-23.
62. Cheng Z., Park, E., Glick, B.R. 2007. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Can. J. Microbiol*. 53 : 912-918.
63. Chhipa BR and Lal P. 1995. Na/K ratios as the basis of salt tolerance in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46, 533-539.
64. Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Mulders I.H.M., Dekkers L.C. and Ben J.J. 2000. Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant Microbe Interact*, 13: 1340-1345.
65. Chin-A-Woeng T.F.C., de Priester W., van der Bij A. & Lugtenberg B.J.J. 1997. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Mol. Plant Microbe Interact*, 10: 79-86.
66. Chisholm S.T., Coaker G., Day B. and Staskawicz B. J. 2006. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124, (4): 803-814.

67. Choudhary D.K. and Johri B.N. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164, (5): 493-513.
68. Choudhary D.K., Prakash A., Wray V., and Johri B.N. 2009. Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation. *Current Science*, 97, (2): 170-179.
69. Christian A. and Somerville S.C. 2009. Callose in Biotic Stress (Pathogenesis): Biology, biochemistry and molecular biology of callose in plant defence: Callose deposition and turnover in plant–pathogen interactions. *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*, 525-562.
70. Cohen Y, Gisi U. 1994. Systemic translocation of C-14 DL-3- aminobutyric acid in tomato plants in relation to induced resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45 : 441–456.
71. Conrath U., Pieterse C.M.J. and Mauch-Mani B. 2002. Priming in plant–pathogen interactions. *TRENDS in Plant Science*, 7 (5): 210-216.
72. Cook, R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, 31: 53-80.
73. Corbaz R. 1981. Vingt ans de lutte contre le mildiou du tabac (*Peronospora tabacina*) en Suisse. *Annales du tabac*, 17 : 65-72.
74. Corbaz R. 1990. Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaire romandes (première édition), Lausanne, Suisse. 286 p.
75. Corbell N.A., Loper J.E. 1995. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol*, 177: 6230-6236.
76. Cornelis P. 2008. The ‘core’ and ‘accessory’ regulons of *Pseudomonas*-specific extracytoplasmic sigma factors. *Molecular Microbiology*, 68,(4): 810-812.
77. Cosma M.P, Tanaka T., Nasmyth K. 1999. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter, *Cell*, 97:299–311.
78. Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J., Moëne-Loccoz Y. 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens *Letters in Applied Microbiology*, 48, (5): 505-512.
79. Couillerot Olivier, Emeline Combes-Meynet, Joe L.F. Pothier, Floriant Bellvert, Elita Challita, Marie-André e Poirier, René´ Rohr, Gilles Comte, Yvan Moenne-Loccoz and Claire Prigent-Combaret. 2011. The role of the antimicrobial compound 2,4-diacetylphloroglucinol in the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on *Azospirillum brasilense* phyto-stimulators *Microbiology*, 157: 1694-1705.
80. Cousins A.B., N.R. Adam, GW Wall, B.A Kimball, P.J Pinter, MJ Ottman, S.W Leavitt, A.N Webber Photosystem II energy use, non-photochemical quenching and the xanthophyll cycle in *Sorghum bicolor* grown under drought and free-air CO₂ enrichment (FACE) conditions *Plant, Cell and Environment*, 1551-1559.
81. Coutinho I.D., N.R. Poppi, C.L. Cardoso. 2008. Identification of the volatile compounds of leaves and flowers in Guavira (*Campomanesia adamantium* O. Berg). *J. Essen. Oil Res*, 20 : 405-407.
82. Cranshaw W. 1998. Pests of the West: Prevention and Control for Today's Garden and Small. Copyright (2), Canada, 248 p.
83. Cruz C, Lips H, Martins-Loução MA. 2003a. Nitrogen use efficiency by a slow-growing species as affected by CO₂ levels, root temperature, N source and availability. *J Plant Physiol*, 160:1421–1428.
84. Cvetkovska M., Rampitsch C., Bykova N. and Xing T. 2005. Genomic Analysis of MAP Kinase Cascades in *Arabidopsis* Defense Responses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23: 331-343.
85. D’Ovidio R, Mattei B, Roberti S Bellincampi D. 2004. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions, *Biochim Biophys Acta-Proteins Proteomics*, 16, (96) : 237-244
86. Dann E, Diers B, Byrum J, Hammerschmidt R. 1998. Effect of treating soybean with 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the level of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in field and greenhouse studies. *European Journal of Plant Pathology*, 104 : 271–278.
87. De Coste N.J., Gadkar V.J. and Filion M. 2010. *Verticillium dahliae* alters *Pseudomonas* spp. populations and HCN gene expression in the rhizosphere of strawberry. *Canadian Journal of Microbiology*, 56, (11): 906-915.
88. De Ley J., and De Vos P. 1984. Biological and clinical: The genus *Pseudomonas*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 50: 281-303.
89. De Lorenzo V., Giovannini F., Herrero M., and Neilands J. B. 1988. Metalion regulation of gene expression. Fur repressor-operator interaction at the promoter region of the aerobactin system of pColV-K30. *J. Mol. Biol*, 203: 875-884.
90. Degenhardt L., Hall W., Lynskey M. 2003. Testing hypotheses about the relationship between cannabis use and psychosis *Drug and Alcohol Dependence*, 71: 37-48.
91. Deinlein, U. et al. 2014. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends Plant Sc*, 19 : 371–379.
92. Delany I, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V. 2001. The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 42, (5) : 1297-309.
93. Delany I.R. 1999. Genetic analysis of the production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113. Ph.D. thesis. National University of Ireland, Cork, Ireland.
94. Delany I.R., Sheehan M.M., Fenton A, Bardin S., Aarons S., O’Gara F. 2000. Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of *phlF* as a transcriptional repressor. *Microbiology*, 146: 537-546.
95. Denison R. Ford and E. Toby Kiers. 2011. Life Histories of Symbiotic Rhizobia and Mycorrhizal Fungi *Current Biology* : 775–785.
96. Derylo M. and Skorupska A. 1993. Enhancement of symbiotic nitrogen fixation by vitamin-secreting fluorescent *Pseudomonas*. *Plant and Soil*, 154: 211-217.
97. Deshwal V.K., Singh, S.B., Nilmani, K., Raza, T., Ansari, F.A., Jha, A. and Kumar, A.D. 2010. Plant growth and nodulation of *Mucuna* (*Mucuna pruriens*) in response to Rhizobium inoculation. *J. Plant Devel. Sci*, 2 (3-4): 103-107.
98. Diby P., Saju K.A., Jisha J.P., Sarma Y.R., Kumar A., Anandaraj M. 2005a. Mycolytic Enzymes Produced by *Trichoderma* and *Pseudomonas fluorescens* spp. Against *Phytophthora capsici*, foot rot pathogen of the black pepper (*Piper nigrum* L.). *Annals of Microbiology*, 55, (2): 129-133.

99. Diby P., Sarma Y.R., Srinivasan V. and Anandaraj M. 2005b. *Pseudomonas fluorescens* mediated vigour in Black pepper (*Piper nigrum* L.) under green house cultivation. *Annals of Microbiology*, 55, (3): 171-174.
100. Ding C.K., Wang C.Y., Gross K.C., Smith D.L. 2001. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta*, 214: 895-901.
101. Djilbaoui R. and Bensoltane A. 2005. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*, *African Journal of Biotechnology*, 4: 697-702.
102. Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Broek A.V., Vanderleyden J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212: 155-164.
103. Dodd, I.C., Zinovkina, N.Y., Safronova, V.I., and Belimov, A.A. 2010. Rhizobacterial mediated on of plant hormone status. *Ann. Appl. Biol.*, 157, 361-379.
104. Domenech J., Reddy M. S., Kloepper J. W., Ramos B., Gutierrez-Manero J. 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *Biocontrol*, 51: 245-258.
105. Domenech J., Reddy M. S., Kloepper J. W., Ramos B., Gutierrez-Manero J. 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *Biocontrol*, 51 : 245-258.
106. Domenech J., Reddy M.S., Kloepper J.W., Ramos B., and Gutierrez-Manero J. 2006. Combined application of the biological product LS21 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *BioControl*, 51: 245-258.
107. Dong X. 2004. NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol*, 7: 547-552.
108. Durand-Tardif M. and Pelletier G. 2003. Contribution of molecular and cellular biology and genetics to plant protection. *C. R. Biologies*, 326: 23-35.
109. Durrant W.E. and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42: 185-209.
110. Dutta S., Mishra A.K., Dileep Kumar B.S. 2008. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 452-461.
111. Duyvesteijn R.G.E., Wijk R.V., Boer Y., Rep M., Cornelissen B.J.C, and Haring M.A. 2005. Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato *Molecular Microbiology*, 57, (4): 1051-1063.
112. Eaton FE. 1966. Chlorine. In 'Diagnostic criteria for plants and soils'. (Eds. HD Chapman.). (Division of Agricultural Science, University of California: Pathogenic variability among five bacterial isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causing spot disease on tomato and their response to salicylic acid.
113. Ebel J, Cosio EG. 1994. Elicitors of plant defense responses. *Int Rev Cytol*, 148:1-36.
114. Edreva A. 2005. Pathogenesis-related proteins: research Progress in the last 15 years. *gen. Appl. Plant physiology*, 31, (1-2): 105-124.
115. Edreva A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agr. Ecosyst. Environ*, 106 : 119-133.
116. Egusa M., Akamatsu H., Tsuge T., Otani H., Kodama M. 2009. Induced resistance in tomato plants to the toxin-dependent necrotrophic pathogen *Alternaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 73: 67-77.
117. El Guilli M., Achbani E., Fahad K., Jijakli H. 2009. Les biopesticides: Alternatives à la Lutte Chimique? Symposium international (AGDUME), Agriculture durable en région Méditerranéenne Rabat, Maroc, 266-280.
118. Elias K.S., Zamir D., Lichtman-Pleban T., and Katan T. 1993. Population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Restriction fragment length polymorphisms provide genetic evidence that vegetative compatibility group is an indicator of evolutionary origin. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 6: 565-572.
119. Elias K.S., Schneider R.W. 1991. Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology*, 81, (2): 159-162.
120. Elvira M.I., Galdeano M.M., Gilardi P., Garcia-Luque I. and Serra M.T. 2008. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. *Experimental Botany*, 59, (6): 1253-1265.
121. Eparvier A., Lemanceau P., Alabouvette C. 1991. Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiol Ecol*, 86:177-184.
122. Espinosa A, Alfano JR. 2004. Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell Microbiol*, 6, (11):1027-40.
123. Etebarian H.R. 1992. Studies of *Fusarium* wilt of tomato and its chemical control in Varamin area. *Iranian Journal of Agricultural sciences*, 23: 1-14.
124. Etebarian H.R., Sholberg P.L., Eastwell K.C. and Saylor R.J. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens* Can. *J. Microbiol*, 51: 591-598.
125. Eyquem A., Alouf J., Montagnier L. 2000. *Traité de microbiologie clinique: Deuxièmes mises à jour et compléments*. Piccin Nuova Libreria, Italie. 238 p.
126. Fagerström KO, Schneider NG. 1989. Measuring nicotine dependence - A review of the Fagerström tolerance questionnaire. *Journal of Behavioral Medicine*, 12:159-182.
127. Faheed F.A., Abd-elaah G.A. and Mazen A. 2005. Alleviation of disease effect on tomato plants by heat shock and salicylic acid infected with *Alternaria solani*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7, (5): 783-789.
128. Fallahzadeh-Mamaghani V., Ahmadzadeh M. and Sharifi R. 2009. Screening systemic resistance inducing fluorescent pseudomonads for control of bacterial blight of cotton Caused By *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Journal of plant pathology*, 91, (3): 663-670.
129. Farhan H.N., Abdullah B.H. and Hameed A.T. 2010. The biological activity of bacterial vaccine of *Pseudomonas putida* 2 and *Pseudomonas fluorescens* 3 isolates to protect sesame crop (*Sesamum indicum*) from *Fusarium* fungi under field conditions. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1, (5): 803-811.
130. Feinberg AP. 2007. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*. 447:433-440.

131. Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditegou FA, Legué V. 2009. The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiol*, 151: 1991–2005.
132. Feng F, Zhou JM. 2012. Plant-bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Curr Opin Plant Biol*, 15, (4):469-76.
133. Fernando W.G., Dilantha N.S. and Zhang Y. 2005. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In Siddiqui Z.A., (ed) *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Springer, Netherlands, 313 p.
134. Fischer S.E, Fischer S.I, Magris S., Mori G. 2007. Isolation and characterization of bacteria from rhizosphere wheat. *World J Microbiol Biotechnol*, 23: 895-903.
135. Fischer S.E, Jofre E.C., Cordero P.V., Gutierrez M.F.J., Mori G.B. 2010. Survival of native *Pseudomonas* in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97: 241-251.
136. Flor H.H. 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296.
137. Flors C., Nonell S. 2006. Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenalenone phytoalexins. *Acc Chem Res*, 39, (5) : 293-300.
138. Foyer CH, Shigeoka S. 2011. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis *Plant Physiology*, 155: 93-100.
139. Fravel D., Olivain C., and Alabouvette C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157, 493-502.
140. Fred EB, Baldwin IL, McCoy E. 2007. *Root nodule bacteria and leguminous plants*. Madison: University of Wisconsin Press.
141. Friedrich L., Lawton K., Dietrich R., Willits M., Cade R., Ryals J. 2001. NIM1 overexpression in *Arabidopsis* potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14: 1114-1124.
142. Fuchs J.G., Moëne-Loccoz Y., and Défago G. 1997. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* Wilt in tomato. *Plant Disease*, 81: (5), 492-496.
143. Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261, 754-756.
144. Gandia-Herrero F., Jimenez-Atienzar M., Cabanes J., Garcia-Carmona F., Escribano J. 2005. Differential activation of a latent polyphenol oxidase mediated by sodium dodecyl sulfate. *J Agric Food Chem*, 53, 6825-6830.
145. Garavaglia F., Gailhard J., Paquet E., Lang M., Garçon R., and Bernardara P. 2010. Introducing a rainfall compound distribution model based on weather patterns sub-sampling. *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 14, 951-964.
146. García-Limones C, Hervas A, Navas-Cortes JA, Jimenez-Díaz RM, Tena M. 2002. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61: 325-337.
147. Gauissou T., Baâ A.M., Gbuinko S., Duponnois R., Plenchette C. 1998. Influence des phosphates naturels et des mycorhizes à vésicules et à arbuscules sur la croissance et la nutrition minérale de *Zizyphus mauritiana* Lam. dans un sol à pH alcalin. *Ann. Sci.For.* 55 : 925-931.
148. Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta General Subject*, 990, 87-92.
149. Georgakopoulos D., Henderson M., Panopoulos N.J., and Schroth M. N. 1994. Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression in vitro with the ice nucleation reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol*, 60: 2931-2938.
150. Giannopolitis CN, Ries SK, Superoxide dismutases I. 1977. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314.
151. Girard G., Van Rij E.T, Lugtenberg B.J and Bloemberg G.V. 2006. Regulatory roles of *psrA* and *rpoS* in phenazine-1- carboxamide synthesis by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Microbiology*, 152, 43-58.
152. Glick B.R., Patten C.L., Holguin G. and Penrose D. M. 1999. *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting bacteria*. Imperial College Press, London, UK, 270 p.
153. Goellner K. and Conrath U. 2008. Priming: It's all the world to induced disease resistance. *Eur J Plant Pathol*, 121p.
154. Göhre V., Robatzek S. 2008. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol*, 46, 189-215.
155. Gomez-Ariza J., Campo S., Rufat M., Estopa M., Messeguer J., San Segundo B., Coca Maria. 2007. Sucrose-mediated priming of plant defense responses and broad-spectrum disease resistance by overexpression of the maize pathogenesis-related PRms protein in rice plants. *Molecular plant-microbe interactions*, 20 (7) : 832-842.
156. Gómez-Gómez L., Felix G. and Boller T. 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 18: 277-284.
157. Gothwal R.K, Nigam V.K., Mohan M.K., Sasmal D., Ghosh P. 2008. Screening of nitrogen fixers from rhizospheric bacterial isolates associated with important desert plants. *Appl Ecol Environ Res*, (6), 2:101-109.
158. Govrin E.M., Levine A. 2002. Infection of *Arabidopsis* with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant Mol. Biol*, 48:267–276.
159. Gray E.J., and Smith D.L. 2004. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes, 37 (3): 395-412.
160. Grover, M., Ali, Sk.Z., Sandhya, V., Rasul, A., Venkateswarlu, B. 2011. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 27 : 1231–1240.
161. Grundon NJ Edwards DG Takkar PN Asher CJ and Clark RB. 1987. Nutritional Disorders of Grain Sorghum.' (Australian Centre for International Agricultural Research: *Canberra, Australia*, 99 : 8 p.
162. Gutiérrez-Mañero F.J. 2013. Bacterial bioeffectors modify bioactive profile and increase isoflavone content in soybean sprouts (*Glycine max* var *Osumi*). *Plant Foods Hum Nutr*, 68 : 299-305.
163. Gutierrez-Manero F.J., Ramos B., Probanza A., Mehouchi J., Talon M. 2001. The plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberelins. *Physiol Plant*, 111: 206-211.
164. Haas D., Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Review of Microbiology*, 3: 307-319.
165. Haas D., Keel C. and Reimann C. 2002. Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 385-395.

166. Hamdia, A.B.E., Shaddad, M.A.K. & Doaa, M.M. 2004. Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasiliense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. *Plant Growth Regul*, 44 : 165–174.
167. Hameed A.T. and Farhan H.N. 2007. Effect of *Pseudomonas aureofaciens* and *Pseudomonas putida* on growth of sorghum biocolor and protect them from infection of *Rhizoctonia solani* fungi. *Al-Anbar University Journal for Pure Science*, 1 (3): 8-16.
168. Hammami Inés, Slim Smaoui, Anis Ben Hsouna, Naceur Hamdi, and Mohamed Ali Triki Ruta montana L. 2015. Leaf essential oil and extracts: characterization of bioactive compounds and suppression of crown gall disease. *EXCLI J*, 14 : 83–94.
169. Hancock J.T., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D. and Neill Steven J. 2002. Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, (6-8): 611-617.
170. Hancock JT, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Neill Steven J. 2002. Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 611-617.
171. Hare P.D. and Cress W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21: 79-102.
172. Hase S., Van Pelt J.A., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. 2003. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas fluorescens* primes the plant to produce higher levels of ethylene upon pathogen infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62: 219-226.
173. Hassan K.A., Johnson A., Shaffer B.T, Ren Q., Kidarsa Teresa A. Elbourne Liam D. H., Hartney Sierra, Duboy Robert, Goebel Neal C., Zabriskie T. M., Paulsen I.T., Loper J.E. 2010. Inactivation of the GacA response regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 has far-reaching transcriptomic consequences. *Environmental Microbiology*, 12, (4): 899-915.
174. Heeb S. and Haas D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol.Plant.Microbe Interact*, 14, 1351-1363.
175. Heil M. and Bostock R.M. 2002. Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Oxford Journals*, 89, (5): 503-512.
176. Heil M. and Walters D.R. 2009. Ecological consequences of plant defence signalling. *Advances in botanical research*, 51: 667-716.
177. Heimann J.D. 2003. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Advances in Microbial Physiology*, 46: 47-110.
178. Henry G, Thonart P, Ongena M. 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 16, 257-268.
179. Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.-F., Aupinel P., et al. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336, 348–350.
180. Hijwegen T, Verhaar MA. 1994. Effects of cucumber genotype on the induction of resistance to powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*, by 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Pathology*, 44, 756–762.
181. Hillocks R.J. 2012. Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. *Crop Prot*, 31 : 85-93.
182. Holub E.B. and Cooper A. 2004. Matrix, reinvention in plants: how genetics is unveiling secrets of non-host disease resistance. *Trends in Plant Science*, 9, (5): 211-241.
183. Hopkins W.G. 2003. *Physiologie végétale*. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck, 514 p.
184. Howat D. 2000. Acceptable salinity, sodicity and pH values for boreal forest reclamation., Alberta Environment, Environmental Sciences Division, Edmonton, AB. Report no. ESD/LM/00-2. ISBC 1173–1191
185. Howell C.R., Bell A.A., Stipanovic R.D. 1976. Effect of aging on flavonoid content and resistance of cotton leaves to *Verticillium* wilt. *Physiol. Plant Pathol*, 8 : 181-188.
186. Hunt M.C., Pettis G.S., and McIntosh M.A. 1994. Promoter and operator determinants for Fur-mediated iron regulation in the bidirectional *fepA-fes* control region of the *Escherichia coli* enterobactin gene system. *J. Bacteriol*, 176: 3944-3955.
187. Iavicoli A., Boutet E., Buchala A. and Metraux J.P. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interactions*. 16: 851-858.
188. Ingle R.A., Carstens M., Denby K.J. 2006. PAMP recognition and the plant–pathogen arms race. *BioEssays*, 28, (9): 880-889.
189. Inoue I., Namiki F., and Tsuge T. 2002. Plant Colonization by the Vascular Wilt Fungus *Fusarium oxysporum* Requires FOW1, a Gene Encoding a Mitochondrial Protein. *The Plant Cell*, 14: 1869-1883.
190. Ippolito A. 2010. Dannosità delle malattie, lecture presentation, Università' degli Studi di Bari, 18p.
191. Iqbal A., John P. and Shamsul H. 2008. *Plant-Bacteria Interactions*. Copyright, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 310 p.
192. Jabs T., Tschöpe M., Colling C., Hahlbrock K. and Scheel D. 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components, phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4800-4805.
193. Jacobsen C.S. 1997. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1 (pRO101) in 2,4-D contaminated soil. *Plant Soil*, 189: 139-144.
194. Jacques P., Delfosse P., Ongena M., Lepoivre P., Cornélis P., Koedam N., Neirinckx L., Thonart P. 1993. Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas fluorescens* dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahier Agriculture*, 2 : 301-307.
195. Jakab G., Cottier V., Toquin V., Rigoli G., Zimmerli L., Métraux J-P., Mauch-Mani B. 2001.-Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol*, 107 (1): 29-37.
196. Jalloul A., Clerivet A., Nicole M. 2009. La signalisation hormonale dans la résistance des plantes aux bioagresseurs. *Cah Agric*, 18, (6), 493-497.
197. James D.W.J., Suslow T.V. and Steiback K.E. 1985. Relation between rapid, firm adhesion and longterm colonization of roots by bacteria. *Applied & Environmental Microbiology*, 50, 393-397.
198. Jettyanon K, Kloepper JW. 2002. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control*, 24, 285–291.
199. Jettyanon, K. 1997. Interaction between PGPR and cucumber during induced systemic resistance: recognition and early host defense responses. Ph.D. dissertation, Auburn University, Auburn, AL, USA.
200. Jones J.D. and Dangl J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
201. Jonhson J. and Palleroni N.J. 1989. Desoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 39: 230-235.

202. Jordan Vacheron, Guilhem Desbrosses, Marie-Lara Bouffaud, Bruno Touraine, Yvan Moëgne-Loccoz, Daniel Muller, Laurent Legendre, Florence Wisniewski-Dyé, and Claire Prigent-Combaret. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci*, 4: 356.
203. Jordan, D. C. 1984. Family III. Rhizobiaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins Co. K, (1), 234-242.
204. Jourdan E., Ongena M. et Thonart P. 2008. Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 12, (4) : 437-449.
205. Krishnamurthy R Anbazhagan M and Bhagwat. K. A. 1987. Effect of NaCl toxicity of chlorophyll breakdown in rice. *Indian Journal of Agricultural Science*, 57 : 567-570.
206. Kyeon Min-Seong, Soo-Hyeong Son, Young-Hee Noh, Yong-Eon Kim, Hyok-In Lee, and Jae-Soon Cha. 2016. *Xanthomonas euvesicatoria* Causes Bacterial Spot Disease on Pepper Plant in Korea *Plant Pathol J*, 32 (5): 431–440.
207. Kim JY, Wu J, Kwon SJ, Oh H, Lee SE, Kim SG, Wang Y, Agrawal GK, Rakwal R, Kang KY, Ahn IP, Kim BG, Kim ST. 2014. Proteomics of rice and *Cochliobolus miyabeanus* fungal interaction: insight into proteins at intracellular and extracellular spaces. *Proteomics*, 14:2307–2318.
208. Kohler A, et al. 2006. The mRNA export factor *Sus1* is involved in *Spt/Ada/Gen5* acetyltransferase-mediated H2B deubiquitinylation through its interaction with *Ubp8* and *Sgf11*. *Mol Biol Cell*, 17 (10): 4228-36.
209. Kuc J. 1982. Induced immunity to plant disease. *BioScience*, 32 : 854–860.
210. Kurniadie D and Redmann RE. 1999. Growth and Cl accumulation in soybean cultivars treated with excess KCl in solution culture. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30 : 699-709.
211. Kuzniak Elzbieta and Skłodowska Maria D. 2007. The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves . Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana* *J Exp Bot*, 58, (4): 797-806.
212. Kuźniak E. 2010. The ascorbate-glutathione cycle and related redox signals in plant pathogen interactions. In *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. Anjum, N.A., Umar, S. & Chan, M.-T. (eds.), 115-136, Springer, ISBN 978-90- 481-9403-2, Dordrecht, The Netherlands L.
213. Kadota Y., Goh T., Tomatsu H., Tamauchi R., Higashi K., Muto S. and Kuchitsu K. 2004. Cryptogein-Induced Initial Events in Tobacco BY-2 Cells: Pharmacological Characterization of Molecular Relationship among Cytosolic Ca²⁺ Transients, Anion Efflux and Production of Reactive Oxygen Species. *Plant Cell Physiol*, 45, (2), 160-170.
214. Kamilova F, Kravchenko L.V., Shaposhnikov A.I., Makarova N., and Lugtenberg B. 2006. Effects of the Tomato Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the Biocontrol Bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the Composition of Organic Acids and Sugars in Tomato Root Exudate. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, (10): 1121-1126.
215. Kamilova F., Lamers G., Lugtenberg B. 2008. Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. *Environmental Microbiology*, 10, (9): 2455-2461.
216. Kandasamy S., Loganathan K, Muthuraj R., Duraisamy S., Seetharaman S., Thiruvengadam R., Ponnusamy B., Ramasamy S. 2009. Understanding the molecular basis of plant growth promotional effect of *Pseudomonas fluorescens* on rice through protein profiling. *Proteome Science*, 7: 47 p.
217. Karadeniz A., Topcuoglu S.F., Inan S. 2006. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World J. Microbiol. Biotech*, 22 (10): 1061-1064.
218. Kaymakanova M. and Stoeva N. 2008. Physiological reaction of bean plants (*Phaseolus vulg. L.*) to salt stress. *Gen. Appl. Plant Physiology*, 34 (3-4): 177-188.
219. Keller L. and Surette M. G. 2006. *Communication in bacteria: An ecological and evolutionary perspective*. *Nat Rev Microbiol*, 4: 249-258.
220. Kikuyama M., Kuchitsu K., Shibuya N. 1997. Membrane Depolarization Induced by *N*-Acetylchitoooligosaccharide Elicitor in Suspension-Cultured Rice Cells. *Plant Cell Physiol*, 38, (8): 902-909.
221. King E.O., Ward M.K. and Raney D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med*, 44, 301-307.
222. Khakipour N., Khavazi K., Mojallali H., Pazira and E., Asadirahmani H. 2008. Production of auxin hormone by fluorescent pseudomonads. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 4, (6) : 687-692.
223. Klarzynski O. et Fritig B. 2001. Stimulation des défenses naturelles des plantes. *Sciences de la Vie*, 324, (10): 953-963.
224. Kloepper J.W. and Schroth M.N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. ed. Station de Pathologie Végétale et Phytobactériologie. 2: 879-882.
225. Kloepper J.W., Leong J., Teintze M. and Schroth M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*. 286: 885- 886.
226. Kloepper J.W., Ryu C. M., and Zhang, S.A. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94: 1259-1266.
227. Knight C.D., Perroud P.F, Cove D.J. Lawton M., Saidasan H. 2009. Pathogenesis in Mosses. *Annual Plant Reviews*, 36. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781444316070.ch12/summary>.
228. Kohler J., Hernández J.A., Caravaca F., and Roldán A. 2008. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional Plant Biology*, 35 (2):141-151.
229. Kunkel B.N. and Brooks D.M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 325-331.
230. Kuc J. 1982. Induced immunity to plant disease. *Bioscience*, 32: 854-860.
231. Kwak Y.S., Han S., Thomashow L.S., Rice J.T., Paulitz T.C., Kim D., Weller D.M. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* Genome-Wide Mutant Screen for Sensitivity to 2,4-Diacetylphloroglucinol, an Antibiotic Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and environmental microbiology*, 77, (5) : 1770-1776.

232. Lamb C, Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 251-275.
233. Latha P., Anand T., Ragupathi N., Prakasam V., Samiyappan R. 2009. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control*, 50: 85-93.
234. Latour X. et Lemanceau P. 1997. Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes à oxydase positive. *Agronomie*, 17 : 427-428.
235. Lauge R., Joosten M.H.A.J., Haanstra J.P.W., Goodwin P.H., Lindhout P. and De Wit P.J.G.M. 1998. Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 9014-9018.
236. Lee H., Damsz B., Woloshuk C.P., Bressan R.A., Narasimhan ML. 2010. Use of the plant defense protein osmotin to identify *Fusarium oxysporum* genes that control cell wall properties. *Eukaryot Cell*, 9 (4): 558-68.
237. Lefrère J.J. et Rouger P. 2000. Transfusion sanguine: Une approche sécuritaire. John Libbey Eurotext, France, 175-177.
238. Leinhos V. 1994. Effects of pH and glucose on auxin production of phosphate-solubilizing rhizobacteria *in vitro*. *Microbiological Research*, 149: 135-138.
239. Lepoivre P. 2003. Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck Université, Bruxelles, 432 p.
240. Leslie J.F. 1995. *Gibberella fujikuroi*: Available populations and variable traits. *Canad. J. Botany*, 73 (suppl. 1), 282 p.
241. Levine A., Tenhaken R., Dixon R. and Lamb C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79 (4): 583-593.
242. Li L and Steffens John C. 2002. Overexpression of p_otyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215: 239-247.
243. Liang J.G., Tao R.X., Hao Z.N., Wang L.P. and Zhang X. 2011. Induction of resistance in cucumber against seedling damping-off by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) *Bacillus megaterium* strain L8. *African Journal of Biotechnology*, 10, (36): 6920-6927.
244. Limones García-C, Hervas A, Navas-Cortes JA, Jimenez-Díaz RM, Tena M. 2002. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 325-337.
245. Lipka V., Dittgen J., Bednarek P., Bhat R., Wiermer M., Stein M., Landtag J., Brandt W., Rosahl S., Scheel D., Llorente F., Molina A., Parker J., Somerville S., Liefert P.S. 2005. Pre- and postinvasion defenses both contribute to non host resistance in *Arabidopsis*. *Science*, 310: 1180-1183.
246. Liu L., Kloepper J.W., and Tuzun S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt By plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 85 (6): 695-695.
247. Liu X., Williams C.E., Nemacheck J.A., Wang H., Subramanyam S., Zheng C., and Chen M.S. 2010. Reactive Oxygen Species Are Involved in Plant Defense against a Gall Midge. *Plant Physiol*, 152, (2): 985-999.
248. Liu Y.H., Huang C.J., and Chen C.Y. 2008. Evidence of induced systemic resistance against *Botrytis elliptica* in lily. *Phytopathology*, 98, 7: 830-836.
249. López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 280–287.
250. Lugtenberg B. and Kamilova F. 2009. Plant-Growth-Promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63:541-556.
251. Lugtenberg B.J.J., Dekkers L., and Bloemberg G.V. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by pseudomonas. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 461-490.
252. Mert-Türk F., 2002. Phytoalexins: Defence or just a response to stress? *Journal of Cell and Molecular Biology*, 1: 1-6.
253. Misko A.L., Germida-James J. 2002. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiology Ecology*, 42: 399-407.
254. Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, *Lausanne*, 192 p.
255. Mahé E., Vossen P., Hooven H.W., Van den D., Nguyen L., Vervoort J., De Wit P.J.G.M. 2009. Solid-phase synthesis, conformational analysis, and biological activity of AVRp elicitor peptides of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *The Journal of Peptide Research*, 52, (6) : 482-494.
256. Manikandan R., Saravanakumar D., Rajendran L., Raguchander T. and Samiyappan R. 2010. Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfl for its efficacy against Fusarium wilt of tomato. *Biological Control*, 4: 83-89.
257. Marek-Kozaczuk M. and Skorupska A. 2001. Production of B-group vitamins by plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and the importance of vitamins in the colonization and nodulation of red clover. *Biol Fertil Soils*, 33: 146-151.
258. Marschner H. 1986. Mineral nutrition in higher plants. Wd Ltd. The Greystone Press, Antrim, Northern Ireland.
259. Marschner H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. second edition. 889p. London: Academic Press
260. Martenelli JA, Brown JKM, Wolfe MS. 1993. Effects of barley genotype on induced resistance to powdery mildew. *Plant Pathology*, 42 : 195–202.
261. Maurhofer M., Baehler E., Notz R., Martinez V. and Keel C. 2004. Cross-talk between 2,4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol pseudomonads on wheat roots. *Appl. Environ. Microbiology*, 70: 1990-1998.
262. Maurhofer M., Keel C., Schnider U., Voisard C., Haas D., and Défago G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*, 82: 190-195.
263. Mayak S., Tirosh, T., Glick, B.R. 2004. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci*, 166 : 525-530.
264. Mayer A.M. 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67:2318-2331.
265. McGuinness, D. H., P. K. Dehal, and R. J. Pleass. 2003. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol*, 19: 312–319.
266. Mckinney H.H. 1923. Influence of soil temperature and moiture on infection of weat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J. Agric. Res*, 26: 195-218.

267. Mendgen K., Hahn M., Deising H. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 34 : 367–386.
268. Mercado-Blanco J., Rodríguez-Jurado D., Hervás A. and Jiménez-Díaz R.M. 2004. Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control*, 30: 474-486.
269. Mes J.J., Weststeijn E.A., Herlaar F., Lambalk J.M. 1999. Biological and molecular characterization of *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* divides race 1 isolates into separate virulence groups. *Phytopathology*, 89: 156-160.
270. Messiaen C., Blancard D., Rouxel F. et Lafon R. 1991. Les Maladies des plantes maraîchères : *Du labo au terrain*. Editions Quae, Paris, 552 p.
271. Messiaen C.M., Messiaen-Pagotto F. 2010. Le potager familial méditerranéen. Editions Quae, France, 192 p.
272. Meyer, J.M. and Abdallah M.A. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.*, 107: 319-328.
273. Meziane H., Van der Sluis I., Van Loon L.C., Höfte M., Bakker P.A.H.M. 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.*, 6: 177-185.
274. Migula W. 1894. Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe, 1: 235-238.
275. Miller H.S., Browne P., Prigent-Combaret C., Combes-Meynet E, Morrissey J.P., O'Gara F. 2010. *Environmental Microbiology Reports*, 2 (3) : 403-411.
276. Miller M.B. and Bassler B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55,165-199.
277. Mishina T.E., Zeier J. 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 50, (3): 500-513.
278. Mitsuhashi I, Iwai T, Seo S, Yanagawa Y, Kawahigasi H, Hirose S, Ohkawa Y, and Ohashi Y. 2008. Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Mol Genet Genomics*, 279: 415–427.
279. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. The reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science*, 9: 490-498.
280. Mohammadi M, Kazemi H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities insusceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*. 162: 491-498.
281. Molinaro A., Newman M.A.; Lanzetta R., Parrilli M. 2009. The Structures of Lipopolysaccharides from Plant-Associated Gram-Negative Bacteria. *European journal of organic chemistry*, 34: 5887-5896.
282. Montesano M., Brader G., and Palva E.T. 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol.*, 4 (1): 73-79.
283. Moya M.L.G, Aguilar M.I., Blanco R., Kenig A., Gomez J. and Tello J.C., 2004. Fusarium Wilt on Sweet Basil: Cause and Sources in Southeastern Spain. *Phytoparasitica*, 32 (4): 395-401.
284. Moynihan J.A., Morrissey J.P, Coppoolse E.R., Stiekema W.J., O'Gara F., Boyd E.F. 2009. Evolutionary history of the phl gene cluster in the plant-associated bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol.*, 75, (7): 2122- 2131.
285. Müller P, Li X-P, Niyogi KK. 2001. Non-photochemical quenching: a response to excess light energy. *Plant Physiol.*, 125: 1558-1566.
286. Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59 : 651 681.
287. Munns R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Env.*, 16 : 15-24.
288. Munns. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. You have free access to this content *Plant, Cell & Environment*, 25, (2) : 239-250.
289. Murugan M., and Dhandapani N. 2006. Induced systemic resistance activates defense responses to interspecific insect infestations on tomato. *Journal of vegetable science*, 12 (3): 43-62.
290. Muthamilarsan M, Prasad M. 2013. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 38, 433-449.
291. Mysore K.S. and Ryu C.M. 2004. Non host resistance: How much do we know? *Trends in Plant Science*, 9, (2): 97-104.
292. Nakkeeran S., Fernando W.G.D. And Siddiqui Z.A. 2005. Plant growth promotin rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In Siddiqui Z.A. (ed) *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Dordrecht, The Netherlands 313 p.
293. Nimchuk, Z., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R.T., Katagiri, F., and Dangl, J.L. 2000. Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell*, 101 : 353–363.
294. Niranjana R.S., Prasad S.N. and Shekar S.H. 2004. Nove: Proline - An inducer of resistance against pearl millet downy mildew disease caused by *Sclerospora graminicola*. *Phytoparasitica*, 32, (5): 523-527.
295. Niranjana R.S., Shetty H.S. and Reddy M.S. 2005. Chapter 7: Plant growth-promoting rhizobacteria: potential green alternative for plant productivity in IN Siddiqui Z.A. (ed) *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 313 p.
296. Nakano Yoshiyuki, Kozi Asada. 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 22 (5): 867-880.
297. Nürnberger T. and Lipka V. 2005. Non-host resistance in plants: New insights into an old phenomenon. *Molecular plant pathology*, 6 (3): 335-345.
298. Nürnberger T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev.*, 198: 249-266.
299. Oerke EC, Steiner U, Schonbeck F. 1989. Zur Wirksamkeit der induzierten Resistenz unter praktischen Anbaubedingungen. V. Mehltaubefall und Ertrag von Winter- und Sommergerste in Abhängigkeit von der Stickstoffdüngung. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 96 : 140-153.
300. Ohara T., Inoue I., Namiki F., Kunoh H. and Tsuge T., 2004. REN1 is required for development of microconidia and macroconidia, but not of chlamydozoospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics Society of America*, 166 : 113-124.

301. Oldroyd G. E. 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11 252–263 10.1038/nrmicro2990.
302. Ongena M. and Thonart P. 2006. Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: Elicitation and defense responses. In: Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues. 1st ed. Japan: Global Science Books: 447-463.
303. Ongena M., Daayf F., Jacques P., Thonart P., Benhamou N., Paulitz T. C., Bélanger R. R. 2000. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. *Plant Pathology*, 49, (4) : 523-530.
304. Ongena M., Giger A., Jacques P., Dommes J. and Thonart P. 2002. Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *Eur. J. Plant Pathol*, 108: 187-196.
305. Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J.L., Thonart. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9, (4): 1084-1090.
306. Orcutt DM and Nilsen ET. 2000. The physiology of plants under stress: soil and biotic factors.' (John Wiley and Sons, Inc.: New York).
307. Overvoorde, P., Fukaki, H., and Beeckman, T. 2011. Auxin control of root development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001537. doi: 10.1101/cshperspect.a001537.
308. Palleroni N.J. 1993. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64 (3-4): 231-251.
309. Palleroni N.J. 1983. The taxonomy of bacteria. *BioScience*, 33, 370-377.
310. Paré P.W., Zhang H., Aziz M., Xie X., Kim M.S., Shen X. and Zhang J. 2011. Beneficial rhizobacteria induce plant growth: mapping signaling networks in *Arabidopsis*. *Soil Biology*, 23, (2): 403-412.
311. Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24, 255-265.
312. Patten C.L. and Glick B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3795-3801.
313. Pavlo A., Leonid O., Iryna Z., Natalia K., Maria P.A. 2010. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biological Control*, xxx, pp xxx-xxx.
314. Penrose D.M., Moffatt Barbara A., Glick Bernard R. 2001. Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. *Canadian Journal of Microbiology*, 47 (1): 77-80.
315. Percival Glynn C. 2001. Induction of systemic acquired disease resistance in plants: Potential implications for disease management in urban forest. *Journal of Arboriculture*, 7, (4): 181-192.
316. Persello-Cartieaux F., Nussaume L., and Robaglia C. 2003. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* 26: 189-199.
317. Pervent M. et Nacry P. 2008. Dispositif du split-root in vitro pour l'analyse architecturale du système racinaire chez *Arabidopsis thaliana*. *Cah. Techn. INRA*, 65 : 23-30.
318. Phillips S.J., Dudík M., Schapire R.E. 2004. A maximum entropy approach to species distribution modeling. In: *Proceedings of the 21st International Conference on Machine Learning*, ACM Press, New York : 655–662.
319. Pieterse C.M.J and Van Loon L.C. 2007. NPR1: The spider in the web of induced resistance signaling pathway. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 456-464.
320. Pieterse C.M.J. and Van Loon L.C. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Reviews*, 4 (2), 52-58.
321. Pieterse C.M.J., Leon-Reyes A., Van der Ent S., Van Wees S.C.M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5: 308-316.
322. Pieterse C.M.J., Van Pelt J.A., Ton J., Parchmann S., Mueller M.J., Buchala A.J., Meâ Traux J-P And Van Loon L.C. 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57 : 123-134.
323. Pieterse C.M.J., Van Pelt J.A., Van Wees S.C.M., Ton J., Leon-Kloosterziel K. M., Keurentjes J.J.B., Verhagen B.W.M., Marga K., Van der Sluis I., Bakker P.A.H.M and Van Loon L.C. 2001. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 51-61.
324. Pieterse C.M.J., Van Wees S.C.M., Van Pelt J.A., Knoester Marga, Laan Ramon, Gerrits H., Weisbeek P.J., and Van Loon L.C: 1998. A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10: 1571-1580.
325. Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, VanWees SCM and Bakker PAHM. 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 347–375.
326. Pozo M.J., Van der Ent S., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. 2008. Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 180: 511-523.
327. Prell H.H., Day Á, Peter R. 2001. *Plant-fungal pathogen interaction: A classical and molecular view* pages. Springer, Berlin Heidelberg, 1-7.
328. Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 2003. *Microbiologie. De Boeck Supérieur* (2^{ème} édition), Bruxelles, 1164 p.
329. Prince R.W., Cox C.D., and Vasil M.L. 1993. Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: Molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. *J. Bacteriol.* 175, 2589-2598.
330. Raaijmakers J.M., Leeman M., Van Oorschot M.M.P., Van der Sluis I., Schippers B., Bakker P.A.H.M. 1995. Dose–response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathol.* 85: 1075-1081.
331. Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchande T., Prakasam V. and Samiyappan R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20, 1:1-11.
332. Ramamoorthy V., Raguchander T., Samiyappan R. 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Plant and soil*, 239 (1): 55-68.
333. Ramos Solano B., Barriuso Maicas J., Pereyra De La Iglesia M., Domenech J., Gutierrez Manero F. 2008. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology*, 98: 451-457.

334. Ramos Solano B., J. Barriuso Maicas, M.T. Pereyra de la Iglesia, J. Domenech, F.J. Gutiérrez Mañero. 2008. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors *Phytopathology*, 98 : 451–457
335. Ramos-Solano B, Algar EE, García-Villaraco AA, García-Cristobal JJ, García, JA, Gutierrez-Manero FJ. 2010a. Biotic elicitation of isoflavone metabolism with plant growth promoting rhizobacteria in early stages of development in *Glycine max* var. *Osumi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1484-1492.
336. Ramos-Solano B., Lucas García J.A., Garcia-Villaraco A., Algar E., Garcia-Cristobal J., Gutierrez Manero FJ. 2010b. Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. *Plant Soil* 334 (1e2), 189-197.
337. Ran L.X., Liu C.Y., Wu G.J., Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M. 2005. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. *Biological Control*, 32: 111-120.
338. Ravel J. and Cornelis P. 2003. Genomics of pyoverdine mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol*, 11, 195-200.
339. Reddy P.B. and Rao K.S. 2009. Biochemical and PCR-RAPD characterization of *Pseudomonas fluorescens* produced antifungal compounds inhibit the rice fungal pathogens in vitro. *Electronic Journal of Environmental*, 8, (10): 1062-1067.
340. Redly G.A. and Poole K. 2003. Pyoverdine-mediated regulation of FpvA synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of a probable extracytoplasmic-function sigma factor, FpvI. *J. Bacteriol.*, 185: 1261-1265
341. Reitz M., Hoffmann-Hergarten S., Hallmann J.; and Sikora R.A. 2002. Induction of systemic resistance in potato by rhizobacterium *Rhizobium etli* strain G12 is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins and enhanced lignin biosynthesis. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 108, (1) : 11-20.
342. Remans T, Smeets K, Opendakker K, Mathijssen D, Vangronsveld J, Cuypers A. 2008. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta*, 227, (6):1343-9.
343. Rifat H., Safdar A., Ummay A., Rabia K., Iftikhar A. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion. *Ann Microbiol*. 20 p. DOI 10.1007/s13213-010-0117-1.
344. Río Luis A. del , Luisa M. Sandalio, Francisco J. Corpas, José M. Palma, and Juan B. Barroso. 2006. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling *Plant Physiol*, 141(2): 330–335.
345. Robert D., Catesson A.M. 2000. *Biologie végétale II: caractéristiques et stratégie évolutive des plantes*. Editions Doin, Paris, 356 p.
346. Rodríguez H, Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv*. 17:319-339.
347. Rosa A., Castillo R.É, Carmen H., Marc G.É., Christiane G. 2005. Organization of phenylalanine ammonia lyase (PAL), acidic PR-5 and osmotin-like (OSM) defence-response gene families in the potato genome. *Mol Gen Genomics*, 274: 168-179.
348. Rosas S.B., Andrés J.A., Rovera M., Correa N.S. 2006. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, (12): 3502-3505.
349. Rosenberg Charles. 1997. *Signaux symbiotiques chez Rhizobium*. INRA Editions, Paris (FRA). 149-162.
350. Rudrappa T., Biedrzycki M.L., Kunjeti S.G., Donofrio N.M., Czymmek K.J., Paré P.W. and Bais H.P. 2010. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Communicative & Integrative Biology*, 3, (2): 130-138
351. Ruslan Medzhitov, Paula Preston-Hurlburt and Charles A. Janeway, JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 394-397.
352. Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H., Hunt M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8:1809-1819.
353. Ryu C.M, Murphy J.F., Reddy M.S., and Kloepper J.W. 2007. A two-strain mixture of rhizobacteria elicits induction of systemic resistance against *Pseudomonas syringae* and cucumber mosaic virus coupled to promotion of plant growth on *Arabidopsis thaliana*. *J. Microbiol. Biotechnol*, 17, (2): 280-286.
354. Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W. and Paré P.W. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 134: 1017-1026.
355. Saikia R., Singha T., Kumara R., Srivastava J., Srivastava A.K., Singha K. and Arora D.K. 2003. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbiological Research*, 158, (3): 203-213.
356. Saikia R., Srivastava A.K., Singh K., Arora D.K. and Min-Woong L. 2005. Effect of iron availability on induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of chickpea by *Pseudomonas* spp. *Mycobiology*, 33, (1): 35-40.
357. Saikia R.; Singh T., Srivastava A.K., Arora D.K., Kumar R. 2004. Induction of defense Related Enzymes and Pathogenesis Related Proteins in *Pseudomonas fluorescens* treated chickpea in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Mycobiology*, 32, (1): 47-53.
358. Sanchez L., Weidmann S., Arnould C., Rose B.A., Gianinazzi S. and Gianinazzi-Pearson V. 2005. *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* Ttrigger DMI3-dependent activation of genes related to a signal transduction pathway in roots of *Medicago truncatula*1. *Plant Physiol*, 139, (2). <http://www.jstor.org/pss/4281935>.
359. Sanchez L., Weidmann S., Brechenmacher L., Batoux M., Van Tuinen D., Lemanceau P., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. 2004. Common gene expression in *Medicago truncatula* roots in response to *Pseudomonas fluorescens* colonization, mycorrhiza development and nodule formation. *New Phytol*, 161: 855-863.
360. Sanchez-Rangel D, Sanchez-Nieto S, Plasencia J. 2012. Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize beta-1,3-glucanase activities involved in defense response. *Planta*, 235: 965–978.
361. Saravanakumar D., Lavanya N., Muthumeena B., Raguchander T., Suresh S., Samiyappan R. 2008. *Pseudomonas fluorescens* enhances resistance and natural enemy population in rice plants against leafhopper pest *Journal of Applied Entomology*, 132. (6): 469-479
362. Saravanakumar D., Vijayakumar Charles, Kumar N. and Samiyappan R. 2007. PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protection*, 26, (4): 556-565.
363. Sarosh B.R., Sivaramakrishnan S., Shetty H.S. 2005. Elicitation of defense related enzymes and resistance by L-methionine in pearl millet against downy mildew disease caused by *Sclerospora graminicola*. *Plant Physiol. Biochem*, 43 (8): 808–815.
364. Schaedle M., Bassham JA. 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiol*. 59. 1011-1012.

365. Schnider U., Keel C., Blumer C., Troxler J., Défago G., Haas D. 1995. Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J Bacteriol*, 177: 5387-5392.
366. Schuegger R., Ihring A., Gantner S., Bahnweg G., Knappe C., Vogt-G., Hutzler P., Schmid M., Breusegem F.V., EBERL L., Hartmann A., Langebartels C. 2006. Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell and Environment*, 29: 909-918.
367. Schwachtje J, Karojet S, Thormahlen I, Bernholz C, Kunz S, Brouwer S, Schwochow M, Kohl K, Van Dongen JT. 2011. A naturally associated rhizobacterium of *Arabidopsis thaliana* induces a starvation-like transcriptional response while promoting growth. *PLoS One* 6: e29382.
368. Schwessinger B. and Zipfel C. 2008. News from the frontline: Recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 389-395.
369. Scott J.W., G.C. Somodi, J.B. Jones. 1989. Resistance to bacterial spot fruit infection in tomato. *HortScience*, 24 : 825–827.
370. Sendhilve V., Marimuthu T., Samiappan R. 2007. Talc-based formulation of *Pseudomonas fluorescens*-induced defense genes against powdery mildew of grapevine. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 40 (2): 81-89.
371. Shanahan P., Borro A., O'Gara F., and Glennon J.D. 1992a. Isolation, trace enrichment and liquid chromatographic analysis of diacetylphloroglucinol in culture and soil samples using UV and amperometric detection. *J. Chromatogr*, 606: 171-177.
372. Sharma A., Johri B.N., Sharma A.K. and Glick B.R. 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP₃ influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 7: 887-894.
373. Sharma A., Pathak A., Sahgal M., Meyer J.M., Wray V. and Johri B.N. 2007. Molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria that enhance peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities in chile (*Capsicum annum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Archives of Microbiology*, 188 (5): 483-494.
374. Sharma K, Butz AF, Finckh MR. 2010. Effects of host and pathogen genotypes on inducibility of resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 59,1062–1071.
375. Shearer H.L., Wang L., De Long C., Despres C., and Fobert P.R. 2009. NPR1 enhances the DNA binding activity of the *Arabidopsis* bZIP transcription factor TGA71. *Botany*, 87: 561-570.
376. Shetty N.P., Jensen J.D., Knudsen A., Finnie C., Geshi N., Blennow A., Collinge D.B. and Jørgensen H.J.L., 2009. Effects of β -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *J. Exp. Bot*, 60, (15): 4287-4300.
377. Shi, H. & Zhu, J. K. 2002. SOS4, a pyridoxal kinase gene, is required for root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 585–593.
378. Shibuya N., Minami E. 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 59, 223–233.
379. Siddiqui I.A., Haas D., and Heeb S. 2005. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with Activity against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied And Environmental Microbiology*, 71, (9): 5646-5649.
380. Siddiqui Z.A. 2003. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In Siddiqui Z.A., PGPR: Biocontrol and Biofertilization, 2006, Springer, Netherlands, 313 p.
381. Siddiqui I.A., Shahid Shaukat S., Imtiaz Hussain S., Khan A. 2006. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World journal of microbiology & biotechnology*, 22 (6): 641-650.
382. Simeoni L.A., Lindsay W.L. and Baker R. 1987. Critical iron level associated with biological control of *Fusarium* wilt. *Phytopathology*, 77: 1057-1061.
383. Smedegaard-Petersen V, Stolen O. 1981. Effect of energy requiring defense reactions on yield and grain quality in powdery mildew *Erysiphe graminis* sp. *hordei* resistant *Hordeum vulgare* cultivar Sultan. *Phytopathology*, 71 : 396–399.
384. Smedegaard-Petersen, V., Tolstrup, K. 1985. The limiting effect of disease resistance on yield. *Annual Review of Phytopathology*, 23 : 475-490.
385. Snyder W.C., Hansen H.N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*. 27, 64-67.
386. Sobeih W.Y., Dodd I.C., Bacon M.A, Grierson D., Davies W.J. 2004. Long-distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. *Journal of Experimental Botany*, 55: 2353-2363.
387. Soltani A.A. 2010. Plant Growth Promoting Characteristics in Some *Flavobacterium* spp. Isolated from Soils of Iran. *Journal of Agricultural Science*, 2 (4): 106-115.
388. Somers E., Vanderleyden J., and Srinivasan M. 2004, Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet, *Crit. Rev. Microbiol*, 30: 205-240.
389. Song H, et al. 2010 Expression of five *AtHsp90* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals functional differences of *AtHsp90s* under abiotic stresses. *J Plant Physiol*, 167(14):1172-1178
390. Song J. and Wang Z. 2008. Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*SmPAL1*) from *Salvia miltiorrhiza*. *Molecular Biology Reports*, 36 (5): 939-952.
391. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R 2007a. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*, 31: 425–448 .
392. Srivastava, O.P., van Huystee, R.B. 1977. IAA oxidase and polyphenol oxidase activities of peanut peroxidase isoenzymes. *Phytochem*, 16 : 1527–1530.
393. Statgraphics Plus version 5.1. 1992. Reference Manual; Manugistics: Rockville, 387 MD.
394. Stein E., Molitor A., Karl -Heinz K. and Waller F. 2008. Systemic Resistance in *Arabidopsis* Conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiol*, 49, 11: 1747-1751.
395. Steindler L., Bertani I., De Sordi L., Bigirimana J. and Venturi V. 2008. The presence, type and role of *N*-acyl homoserine lactone quorum sensing in fluorescent *Pseudomonas* originally isolated from rice rhizospheres are unpredictable. *FEMS Microbiol Lett*, 288: 102-111.
396. Steinkellner S., Mamerler R. and Vierheilig H. 2008. Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains. *Eur J Plant Pathol*, 122: 395-401.
397. Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B. 1993. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75(8):687-706.

398. Sturz A.V., Christie B.R. 2003. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil & Tillage Research*, 72: 107-123.
399. Suo Y., Leung D.W.M. 2001a. Elevation of extracellular B-1,3-glucanase and chitinase and chitinase activities in rose in response to treatments with acibenzolar-S-methyl and infection by *D. rosae*. *Journal of plant physiology*, 158 : 971-976.
400. Suty L., 2010. La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques Sciences en partage. Editions Quae, Paris, 328 p.
401. Synková H, Schnablová R, Polanská L, Hušák M, Šiffel P, Vácha F, Malbeck J, Macháčková I, Nebesářová J. 2006. Three-dimensional reconstruction of anomalous chloroplasts in transgenic ipt tobacco. *Planta*, 223 (4): 659-671.
402. Szatmari A., Ott P.G., Varga G.J., Besenyei E., Czelleng A., Klement Z., Bozso Z. 2006. Characterisation of basal resistance (BR) by expression patterns of newly isolated representative genes in tobacco. *Plant cell reports*, 25, (7): 728-740.
403. Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, N.K., Yoshida, K., and Okada, K. 1998. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 12719–12723.
404. Tello-Marquina J. and Alabouvette C.C. 1984. Observations sur la persistance dans le sol des microconidies de *Fusarium oxysporum*. *Agronomie*, 4, (9) : 885-890.
405. Terashima I., Hikosaka K. 1995. Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. *Plant cell environment* 18, (10) :1111–1128.
406. Thangavelu K, Sinha R, Mohan RK. 2003. Silkworm Germplasm and their Potential Use. *Proceeding of Mulberry Silkworm Breeders Summit; Hindupur, India*. 14-23.
407. Thangavelu R., Palaniswami A., Doraiswmy S., Velazhahan R. 2003. The effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on induction of defense enzymes and phenolics in banana. *Biologia plantarum*, 46 (1): 107-112.
408. Ton J., Davison S., Van Wees S.C.M., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. 2001. The *Arabidopsis* *ISR1* locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol*, 125: 652-661.
409. Ton J., Van der Ent S., Van Hulten M., Pozo M., Van Oosten V., Van Loon L.C., Mauch-Mani B., Turlings T.C.J., and Pieterse C.M.J. 2009. Priming as a mechanism behind induced resistance against pathogens, insects and abiotic stress. *IOBC/wprs Bull*, 44: 3-13.
410. Ton J., Van Pelt J.A., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. 2002. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 15, 27-34.
411. Tonelli M.L., Furlan A., Taurian T., Castro S., Fabra A. 2011. Peanut priming induced by biocontrol agents. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75, 100-105.
412. Tucci M, Ruocco M, De Masi L, De Palma M, Lorito M. 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12 : 341–354.
413. Tuzun S., Bent E. 2006. Multigenic and induced systemic resistance. Éditeur Birkhäuser, Springer science + Business Medea, inc, 521 p.
414. Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dlncher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J. 1992. Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 645-656.
415. Umamaheswari C., Sankaralingam A., and Nallathambi P. 2009. Induced systemic resistance in watermelon by biocontrol agents against *Alternaria alternata*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42, (12): 1187-1195.
416. Umesha S. 2006. Note: Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. *Phytoparasitica*, 34 (1): 68-71.
417. Uys M.D.R., A.H. Thompson, G. Holz. 1996. Diseases associated with tomato in the main tomato growing of South Africa. *J. S. Afr. Soc. Hort. Sci.*, 6 : 78–81.
418. Van der Ent S., Van Hulten M., Maria J.P., Czechowski T., Udvardi Michael K., Pieterse C.M.J. and Ton J. 2009a. Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytologist*, 183, 419-431.
419. Van der Ent S., Van Wees S.C.M., Pieterse Corné M.J. 2009b. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*, 70: 1581-1588.
420. Van Kan, J.A. Licensed to kill: The lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 2006. 11, 247–253.
421. Van Loon L.C. and Bakker P.A.H.M. 2006. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In Siddiqui Z.A. (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Dordrecht, Netherlands, Springer, 313 p.
422. Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., and Pieterse C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. rev. phytopathol*, 36: 453-483.
423. Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., Van der Heijdt W.H.W, Wendehenne D., and Pugin Alain. 2008. Early Responses of Tobacco Suspension Cells to Rhizobacterial Elicitors of Induced Systemic Resistance. *The American Phytopathological Society*, 21, (12): 1609-1621.
424. Van Peer R., Niemann G.J. and Schippers B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*, 81: 728-734.
425. Van Wees S.C.M., De Swart E.A.M., Van Pelt Johan A., Van Loon L.C., and Pieterse C.M.J. 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 97, (15): 8711-8716.
426. Van Wees S.C.M., Luijendijk M., Smoorenburg I., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. 1999. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology*, 41 (4): 537-549.
427. Van Wees S.C.M., Pieterse C.M.J., Trijssenaar A., Van't Westende Y.A.M., Hartog Femke, and Van Loon L.C. 1997. Differential Induction of Systemic Resistance in *Arabidopsis* by Biocontrol Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10, (6): 716-724.
428. Van Wees S.C.M., Van der Ent S., Pieterse C.M.J. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 443-448.
429. Varma A., Chincholkar S.B., 2007. Microbial siderophores. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 248p.
430. Vasil M.R., and Ochsner U.A. 1999. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: Genetics, biochemistry and virulence. *Mol. Microbiol*, 34: 399-413.

431. Verhagen B.W.M., Glazebrook J., Zhu T., Chang H.S., Van Loon L.C, and Pieterse CM. J. 2004. The Transcriptome of Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, (8): 895-908.
432. Verhagen B.W.M., Trollet-Aziz P., Couderchet M., Höfte M. and Aziz A. 2010. *Pseudomonas spp.* induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *J. Exp. Bot.*, 61, (1): 249-260.
433. Vijayan K.K., Bright Singh I.S., Jayaprakash N.S. Alavandi S.V., Somnath Pai S., Preetha R., Rajan J.J.S., Santiago T.C. 2006. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. *Aquaculture*, 251: 192-200
434. Visca P., Imperi F. and Lamont IL. 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol*, 15; 22-30.
435. Vleeschauwer D.D., Bakker P.A.H.M., Djavaheri Mohammad and Höfte Monica. 2008. *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced 30 systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiology*, 148: 1996-2012.
436. Von Bodman S.B, Bauer W.D and Coplin D.L. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 41: 455-482.
437. Walters Dale R., Jaan Ratsep and Neil D. Havis. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*. 1-18 doi:10.1093/jxb/ert026.
438. Walters DR, Havis ND, Paterson L, Taylor J, Walsh DJ. 2011. Cultivar effects on the expression of induced resistance in spring barley. *Plant Disease*, 95 :595-600.
439. Walters, D. & Heil, M. 2007. Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 71 : 3-17.
440. Weller D.M. 2007. The Nature and Application of Biocontrol Microbes III: *Pseudomonas spp.*, *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology*. 97, (2): 250-256.
441. Weller D.M., Raaijmakers J.M., Gardener B.B Mc Spadden., Thomashow L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, 40: 309-348.
442. Weller D.M., Van Pelt, J. A., Mavrodi, D. V., Pieterse, C.M.J., Bakker P.A.H.M., and Van Loon L.C. 2004. Induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 94, S108 http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=163800.
443. WERNER D.1992. Symbiosis of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.
444. Whipps J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511.
445. Whipps, J.M. 1997. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Adv. Bot. Res.* 26, 1-133.
446. Wiesel L., Newton A.C., Elliott I., Booty D., Gilroy E.M., Birch P.R.J. and Hein I. 2014. Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in plant science*, 5: 1-13.
447. Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., Ausubel F.M. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414: 562-565.
448. Woltz, S.S. and J.P. Jones. 1981. Nutritional requirements of *Fusarium oxysporum*: Basis for a disease control system, 340-349.
449. Worrall D., Holroyd G.H., Moore J.P., Glowacz M., Croft P., Taylor J.E., Paul N.D., Roberts M.R. 2012. Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. *New Phytol*, 193, (3):770-8.
450. Xin X.F., He S.Y. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu Rev Phytopathol*, 51:473-98.
451. Xu G., Magen H., Tarchitzky J., and Kafkafi U. 2000. Advances in chloride nutrition *Advances in Agronomy*. 68, 97-150. of plants.
452. Yamaguchi Y., Pearce G., Ryan C.A. 2006. The cell surface leucine-rich repeat receptor for *AtPep1*, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc. Natl.*
453. Yan Z., Reddy M.S., Ryu C.M., McInroy J.A., Wilson M., and Kloepper J.W. 2002. Induced Systemic Protection Against Tomato Late Blight Elicited by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. 92, (12): 1329-1333.
454. Yedidia I., Benhamou N. & Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol*, 65 : 1061- 1070.
455. Yoshioka H., Bouteau F., and Kawano T. 2008. Discovery of oxidative burst in the field of plant immunity Looking back at the early pioneering works and towards the future development. *Plant Signal Behav*, 3, (3): 153-155.
456. Young N.D. 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol*, 34, 479-501.
457. Zahir Z.A., Arshad M. and Frankenberger W.T. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: perspectives and application in agriculture. *Advances in Agronomy*, 81: 96-168.
458. Zakir Hossain Mohammad, Mohd. Amirul Islam, Most. Nurtaf Khatun, Sheikh Md. Mohsin Ali1, Mele Jesmin. 2016. Pesticidal activities of benzoin thiosemicarbazone and its complexes with Co (II) and Ni(II). *International Journal of Biosciences*, 9 (6): 92-100.
459. Zellerhoff N., Himmelbach A., Dong W., Bieri S., Schaffrath U. and Schweizer. 2010. Nonhost resistance of barley to different fungal pathogens is associated with largely distinct, quantitative transcriptional responses. *Plant Physiology*, 152, 2053-2066.
460. Zhang H., Kim M.S., Krishnamachari V., Payton P., Sun Y., Grimson M., Farag M.A., Ryu C.M., Allen Randy, Melo Itamar S, Paré Paul W. 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226, (4): 839-851.
461. Zhang S. and Klessig D.F. 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science*, 6, (11): 520-527.
462. Zipfel C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 20, (1): 10-16.
463. Zou J., Rodriguez-Zas S., Aldea M., Li M., Zhu J., Gonzalez D.O., Vodkin LO, DeLucia E., Clough SJ.. 2005. Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. *Mol Plant Microbe Interact*, 18, (11): 1161-74.

Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) in the Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt

LAMIA BOUKERMA^{1,2*}, MESSAOUD BENCHABANE², AHMED CHARIF² and LAKHDAR KHELIFI¹

¹Laboratory of National Research in Genetic Resources and Biotechnologies, ENSA (ES1603), El Harrach, Algeria; ²Laboratory of Protection and Valorisation of Agro-Biological Resources, Saad Dahleb University, Blida, Algeria; ³Department of Plant Science, College of Agriculture & Biological Sciences, South Dakota State University, Brookings, USA

*Corresponding author: boukermalamia@gmail.com

Abstract

Boukerma L., Benchabane M., Charif A., Khélli L. (2017): Activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) in the biocontrol of tomato Fusarium wilt. *Plant Protect. Sci.*, 53: 78–84.

The potential of *Pseudomonas fluorescens* PF15 and *Pseudomonas putida* PP27 to protect tomato plants against Fusarium wilt under greenhouse conditions was evaluated. *In vitro* antagonism showed a significant inhibition of the pathogen growth (47%) revealed by PF15. However, PP27 presented a 10% rate of the mycelium inhibition. An *in situ* experiment was conducted with split-root design for induced systemic resistance (ISR) and without split-root design to measure both ISR and antagonistic activities. Fluorescent *Pseudomonas* revealed a delay in the onset of symptoms and slower kinetics of disease progression compared to the pathogen control. McKinney's index, which measures the severity of the disease, was reduced by 37–72%, and the levels of infection (incidence) by 7–36%.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens* PF15; *Pseudomonas putida* PP27; *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*; Induced Systemic Resistance

Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hans, is one of the most prevalent and damaging diseases of tomato, causing considerable losses (RAMALAH *et al.* 2015). The fungus invades plant vascular tissues and induces severe wilting of the foliage by blocking xylem transport and impeding the movement of water. Controlling the vascular wilt pathogen is difficult for several reasons; the pathogens live deep in the interior of their host plants, many vascular wilt pathogens are soil-borne and produce persistent resting structures that are able to survive for long periods of time in the absence of host plants (SUÁREZ-ESTRELLA *et al.* 2007; Ji *et al.* 2008; YADITA & THOMMA 2013). There are not any efficient chemical treatments that exist to cure infected plants. Management with chemical fungicides causes serious environmental problems and they are toxic to non-target organisms as well (RAMALAH *et al.* 2015). Elicitation of plant's defence

by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) has received increasing attention in recent years. *Pseudomonas* spp. known as PGPRs have been shown to trigger systemic resistance in plants, often referred to as induced systemic resistance (ISR) (VAN LOON *et al.* 1998; PIETERSE *et al.* 2000, 2014; BAKKER *et al.* 2007). ISR improves the plant's defence mechanisms, is not specific and can protect plants against a broad spectrum of pathogens (VAN PEER *et al.* 1991; PIETERSE *et al.* 2000, 2014). Induced systemic resistance is based on the recognition between specific elicitors of rhizobacteria and receptors (VAN LOON *et al.* 2008). Elicitors of induced resistance can be either components of the bacterial cell surface or metabolites excreted by PGPRs (VAN DER ENT *et al.* 2009). ISR reduces the sensitivity of plants to pathogens and is phenotypically similar to systemic acquired resistance (SAR) (VAN LOON *et al.* 1998; VAN WEES *et al.* 1999). Simultaneous activation of

SAR and ISR provides enhanced defensive capacity compared to each single resistance.

Priming is a common feature of systemic resistance elicited by rhizobacteria that increases the responsiveness of the plant's immune system and allows it to more effectively express its own defence reactions (BECKERS & CONRATH 2007). Priming for defence may combine the advantages of enhanced disease protection and low costs. Induced resistance can entail costs due to the allocation of resources of defensive products (VAN HULTEN *et al.* 2006).

The aim of this study was to evaluate the ability of two PGPR strains and their combination to protect tomato plants against *Fusarium wilt* by induced systemic resistance. For this purpose, two experimental designs were carried out; firstly, the split-root design where the biocontrol agents (PGPRs) with the pathogen were applied at the root level and kept physically separated. Secondly, a non-split-root experiment design was used to compare the antagonistic activity that ensures contact between the PGPR strains and the pathogen.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms and inoculum preparation. *Pseudomonas fluorescens* PF15 and *Pseudomonas putida* PP27 were used for induced systemic resistance and growth assays. PF15 and PP27 are Algerian PGPR strains and were provided by the Laboratory of Protection and Agro-Resources Valorisation in Algeria. They were isolated from the rhizosphere of tomato plants; their ability to release DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) and siderophores had been proved in previous studies (BENCHABANE *et al.* 2000; BOUKERMA 2012). The PGPR strains also increased the total protein and proline in tomato plants (BOUKERMA 2012). PF15 and PP27 were grown overnight at 28°C in King B medium. Bacterial cells were collected and resuspended in 10 mM MgSO₄ and adjusted to a concentration of 10⁸ CFU/ml with the spectrophotometer (Shimadzu). The absorbance was calculated: A₆₀₀ = 1 corresponding to 5 × 10⁸ CFU/ml, then the concentration of the bacterial inocula was adjusted and delivered to the seedlings (VIJAYAN *et al.* 2006). The inoculation was performed 3 days before the pathogen challenge application.

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* MUC1.43876 strain (FOI) provided by the Mycethèque of the Catholic University of Louvain, Belgium was used for challenge inoculation. The fungal suspension was prepared

first by growing FOI on PDA medium (potato dextrose agar, ingredients are: 200 g potato, 20 g dextrose, 15 g agar, 1000 ml distilled water) (JOHNSON & BOORIS 1983) and incubating it at 25°C for 7 days. Afterwards, the mycelium was scraped off the plates into a liquid nutrient medium (potato dextrose) and grown at 25°C for 8 days. The final suspension was calibrated with sterile 10 mM MgSO₄ to a concentration of 10⁶ conidia/ml with a Malassez cell by counting the conidia (DE LAPEYRE *et al.* 2008).

Antagonism in vitro. Antagonistic activity against FOI was studied on three nutrient media: PDA (potato dextrose agar), medium favourable for the development of FOI, King B – medium favourable for the development of *Pseudomonas* spp., and mixed medium consisting of equal parts of the two media (King B+PDA). Four spots of bacterial culture (10⁶ CFU/ml) were spread equidistantly on the plates (28 mm from the centre). A mycelial agar plug of 5 mm in diameter from a 7 day-old culture of FOI grown on PDA medium was placed in the centre of the plate. Control plates that had not been inoculated with bacteria were also prepared. After 7 days of incubation at 25°C, the inhibition percentage of fungal growth was measured as the ratio between the diameter of pathogen growth inhibition and the diameter of FOI growth (alone) (BENCHABANE *et al.* 2000).

Experimental design. The induction of systemic resistance was evaluated in the tomato *Solanum lycopersicum* L. plant (cv. Marmande), susceptible to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Certified seed was provided by the Technical Institute of Agriculture and Industry in Algeria. The disinfection was carried out by soaking the tomato seeds in 1% sodium hypochlorite (NaClO) for 10 min, and then rinsing them three times with sterile distilled water. The experiment was arranged in three randomised blocks, with each block composed of 14 treatments of 10 plants per block (30 plants per treatment). The seeds were sown on peat (2/3) mixed with sterile soil (1/3); the seedlings were cultivated in a glass greenhouse (28°C). The plants were watered regularly and supplied with Hoagland's solution once a week. The experiments were repeated twice.

The experiments were done in two designs: split-root and non-split-root. The split-root system was used for the assay of induced systemic resistance and involved the division of the root system into two equal parts, and growth in two separate compartments as described by VAN PIER (1991) and VAN LOON *et al.* (1998). Bacterial strains were applied in one side and FOI in the other. Seven treatments were defined in the split-root sys-

doi: 10.17221/178/2015-PP5

tem, T⁻: healthy control, treated with sterile 10 mM MgSO₄ in both sides; T⁺: pathogen control, plants inoculated with FOL in both sides; T1, T2, and T3: plants inoculated with PF15, PP27 or their combination, respectively, in one side and challenged with FOL in the other side; T4 and T5: plants inoculated with PF15 or PP27, respectively, in both sides. The same treatments were defined in a non-split-root design; the pathogen and biocontrol agents were inoculated together and at the same time.

Evaluations. Disease evaluations began when plants were 6 weeks old and extended up to 12 weeks ($n = 30$). To estimate the disease progression, it has been based on the scale adapted for Fusarium wilt of herbaceous plants as defined by FIKLY *et al.* (1995) and BENCHABANE *et al.* (2000). The rating scale contains 5 levels of symptoms: (0) no symptoms, (1) unilateral yellowing, (2) generalised yellowing, (3) unilateral wilting, longitudinal and unilateral discoloration of the stem, (4) wilting widespread, (5) dead. Two disease evaluations were calculated: the disease incidence (infection level) and McKinney's index (severity) (McKINNEY 1923; MANIKANDAN *et al.* 2010).

For chlorophyll quantification, leaf samples were collected two weeks after the pathogen inoculation (5 leaves, 3 replicates for each treatment). The assay was performed following the methodology described by ARNON (1949): 0.5 g of leaf powder were mixed with 5 ml of acetone (80%), after centrifugation at 4000 rpm for 5 min, extracts were filtered and absorbance was measured at 649 and 665 nm wavelengths. Total chlorophyll content (chlorophyll a and b) was calculated and expressed as $\mu\text{mol/g}$ leaf weight. The chlorophyll index was expressed as the ratio between the total chlorophyll content in the stressed treatment divided by the total chlorophyll content in the control (KANAWAPEE *et al.* 2012).

At the end of the experiment, the plants were harvested, the aerial parts were separated from the roots, fresh and dry weights were determined.

Data analysis. One-way analysis of variance was carried out to evaluate bacterial effects. When differences were significant, the multiple range test and the Kruskal-Wallis test were performed with the Statgraphics plus 5.1 (1992) for Windows software.

RESULTS

Antagonism in vitro. *Pseudomonas fluorescens* PF15 showed the highest inhibition of FOL growth

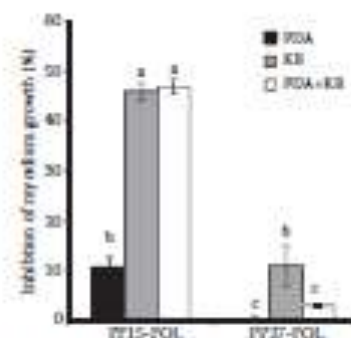


Figure 1. Antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* PF15 and *Pseudomonas putida* PP27 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL)

PDA – potato dextrose agar medium; KB – King B medium; growth inhibition was expressed as the level of reduction of the FOL mycelium growth relative to the control (not inoculated with PF15 or PP27); bars indicate standard errors and different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

(47%) in the King B and mixed (PDA+King B) media. However, *Pseudomonas putida* PP27 revealed a low reduction of mycelium growth on King B medium (10%) compared to PF15 (Figure 1).

The effect of PGPRs on tomato wilt disease. Plants treated with fluorescent *Pseudomonas* and challenged with the pathogen show a delay in the onset of symptoms and slower kinetics of disease progression in split-root and non-split-root designs compared to the pathogen control; a rapid evolution was observed mainly on the earliest days of the disease development (Figure 2). Despite the progression of disease incidence, the severity of Fusarium wilt was less increased. After 41 days of challenging, plants inoculated with PF15 and PP27 showed a reduction of McKinney's index (severity) by up to 72%; however, 36% of the diseased plants (plants that expressed at least one symptom on the rating scale) were observed (Figure 2).

All treatments showed a similar rate of disease suppression; nevertheless, treatments made in the split-root design presented the best bioprotection compared to those without split roots. Fluorescent *Pseudomonas* reduced significantly the Fusarium wilt symptoms and revealed lower classes of symptoms than the pathogen control (Figure 3). Plants in the non-split-root design showed symptoms of unilateral wilting while plants in the split-root system revealed generalised yellowing compared to the pathogen control where all plants died (Figure 3).

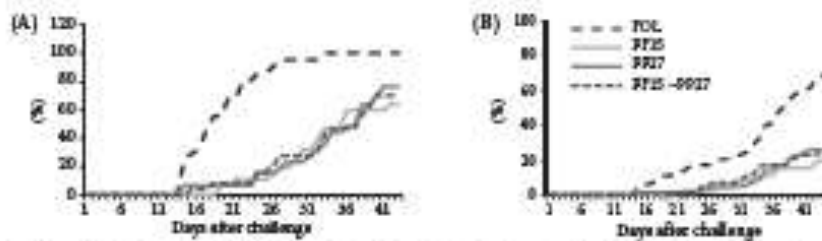


Figure 2. Disease incidence (A) and McKinney's index (B) of Fusarium wilt in tomato plants grown in a split-root design. Plants treated with PGPR strains *Pseudomonas fluorescens* PF15, *Pseudomonas putida* PF27 or their combination and challenged with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL); data are means of 30 replicates for each treatment; protection of tomato plants is expressed as a reduction of the intensity of Fusarium wilt evolution relative to uninoculated plants, during 41 days of the disease following being under greenhouse conditions

Chlorophyll content. The ratio between stressed plants and healthy control showed an increase of chlorophyll pigments in plants treated with PF15, PF27 or their combination. However, the control presented a low value of chlorophyll index (Figure 4).

Growth enhancement. The ability of fluorescent *Pseudomonas* to enhance tomato growth as measured by shoot fresh and dry weight was evaluated (Figure 5). PF15 and PF27 applied alone strongly improved shoot dry and fresh weight. However, challenged plants showed growth levels similar to the healthy control. PF27 showed the best enhancement of tomato growth in the split-root design.

DISCUSSION

The results presented in this paper describe the abilities of the biocontrol activity of the two strains PF15 and PF27 against Fusarium wilt. *Pseudomonas fluorescens*

PF15 showed the best inhibition of mycelium growth in the King B medium (the *in vitro* assay). This medium is deficient in iron that promotes pyoverdine synthesis by fluorescent *Pseudomonas* for chelating ferric ions, causing a reduction of its availability to the pathogen (EYQUEN *et al.* 2000). These results suggest that the main mechanism of the PF15 strain is siderophore production in the medium poor in ferric ions (King B), but on the mixed medium and PDA, cumulative actions (antibiosis, parasitism) can be the origin of the antagonistic effect. However, the PF27 strain revealed a suppression of pathogen growth only on the King B medium, which explains that the main mechanism expressed *in vitro* of this strain is siderophore production.

Plants treated with fluorescent *Pseudomonas* (PF15, PF27 or their combination) showed the late onset of symptoms, lesser rating scale and significant bioprotection against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL). The specific resistance of plants is expressed as all or nothing (resistance/sensitiv-

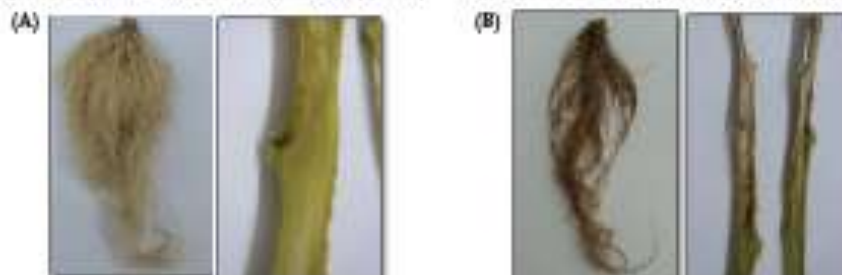


Figure 3. Symptoms of Fusarium wilt on tomato plants treated with PGPR strains and challenged with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) compared to the pathogen control: (A) Symptoms of Fusarium wilt on tomato plants treated with *P. fluorescens* PF15 and challenged with FOL. The severity of Fusarium wilt is less developed as shown in the above figures; the root and vascular tissues maintained in good health and shape; (B) Symptoms of Fusarium wilt for the inoculated untreated control presented by the pathogen control. Total destruction of the roots and vascular tissues was observed which was the cause of the rapid yellowing and wilting of leaves

doi: 10.17221/178/2015-PPS

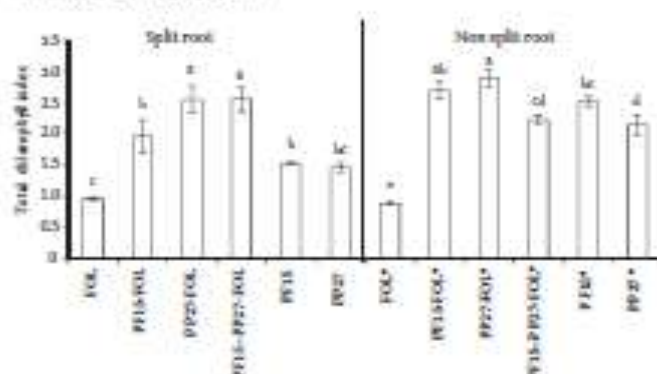


Figure 4. Total chlorophyll index expresses the ratio between stressed tomato plants (plants treated with *Pseudomonas fluorescens* PF15, *Pseudomonas putida* PF27 or their combination and challenged with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) and healthy control

Bars indicate standard errors and different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

ity), while the partial or quantitative resistance is marked by modulations in the kinetics and intensity of the disease development (YOUNG 1996). The split-root system provided no physical contact between pathogen and PGPRs and promoted the interaction of each microorganism when either pseudomonads or FOL were applied to the root. This allowed observing the ability of *P. fluorescens* PF15 and *P. putida* PF27 to induce systemic resistance and it is the only mechanism that can explain disease suppression. In this context, similar observations have already been recorded by several studies (ONGENA *et al.* 2000; VERHAGEN *et al.* 2010).

Challenged plants can express several defence mechanisms: the production of reactive oxygen species (YOSHIOKA *et al.* 2008), antimicrobial compounds, lytic enzymes, and pathogenesis-related (PR) proteins (VAN DER ENT *et al.* 2009). Several studies confirm that the prior application of fluorescent *Pseudomonas* strengthens the cell wall, which limits the invasion of pathogens in plant tissues (BENHAMOU *et al.* 2000).

The protection level conferred by such strains was not statistically different from their combination. This result can be explained by the lack of compatibility

between the two bacterial strains. However, it has been suggested that the combination of PGPRs could be more effective than their individual application (SARAVANAKUMAR *et al.* 2008). ISR depends on the bacterium-host interaction, *P. fluorescens* WCS374r triggered ISR in radish but cannot prime *Arabidopsis*. It has been shown that *P. putida* WCS358r induced systemic resistance in *Arabidopsis* but not in radish, which shows that the ability of pseudomonads to trigger systemic resistance depends on the plant genotypes. In *Arabidopsis*, ISR expression varies among ecotypes; Landsberg erecta and Columbia are susceptible to *P. fluorescens* WCS417r; however, RLD and Wassilewskija are not (VAN WEES *et al.* 1997).

Disease suppression in the non-split-root design may be due to ISR and/or antagonistic actions of *Pseudomonas*. The antagonism is a competition for nutrients and space. Antagonistic PGPRs act on pathogens by inhibiting germination and/or sporulation and/or by interfering with pathogenicity elements (HAAS & DÉFAGO 2005). Fluorescent *Pseudomonas* synthesise various lytic enzymes, β -1,3-glucanase and β -1,4-glucanases and lipases, which causes the cell wall lysis of the pathogen (DENTON 2007).

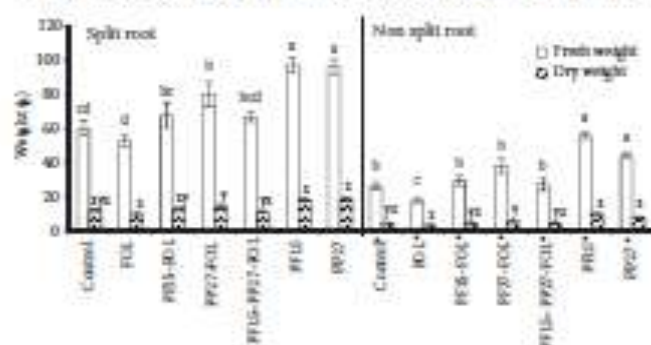


Figure 5. Fresh and dry weight of shoots of tomato plants treated with *Pseudomonas fluorescens* PF15, *Pseudomonas putida* PF27 or their combination and challenged with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL)

Bars indicate standard errors and different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) in fresh weight (a–d) and dry weight (a–c)

Pseudomonas fluorescens PF15 and *Pseudomonas putida* PP27 enhanced tomato growth significantly and allowed challenged plants to maintain a similar growth level as the healthy control, which can decrease immunity costs. Immunity costs are high for individuals, leading to decreased resources available for fitness. Negative correlations between growth rate and resistance to disease represent a long-known phenomenon (SMEDGAARD-PETERSEN & TOLSTRUP 1985). It is generally understood that induced resistance evolved to save energy under pathogen or insect-free conditions, although costs still arise when defences are activated following the attack (WALTERS & HEIL 2007). Induced systemic resistance could be associated with growth enhancement or decrease, depending on the actions of applied strains and the response of the plant host.

Challenged plants showed symptoms on a scale between 2 and 3 (wilting leaves), and total chlorophyll content was higher compared with control plants (pathogen and healthy control). This reveals the positive effect of applied PGPRs on plant physiology regardless of the development of the disease. Fluorescent *Pseudomonas* strains can increase the total chlorophyll content in plants (FARHAN *et al.* 2010). The ability of *Pseudomonas* sp. to enhance the total chlorophyll level in plants can be related to their supply of some nutrients such as nitrogen and phosphorus (HAMEED & FARHAN 2007).

The results presented in this paper showed the ability of *P. fluorescens* PF15 and *P. putida* PP27 to protect tomato against *Fusarium* wilt. Disease suppression was due to the induction of resistance and/or the antagonistic effect in the host plant.

Acknowledgements. The authors would like to express their gratitude to the Mycothèque Catholic University of Louvain in Belgium for providing the *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* MUCL 43876 strain. I. BOUKERMA wishes to thank Prof M. BENCHABANE from the Laboratory of Protection and Agro-Resources Valorisation in Algeria, for the provision of the PGPR strains.

References

- Araon D.I. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1–15.
- Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J., van Loon L.C. (2007): Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97: 249–249.
- Beckers G.J.M., Conrath U. (2007): Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 425–431.
- Benchabane M., Bakour R., Toua D., Bouchkrab A. (2000): Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens*-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. *EPPO Bulletin*, 30: 248–246.
- Benhamou N., Gagne S., Quere D.J., Debhi L. (2000): Bacterial mediated induced resistance in cucumber: Beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 90: 45–56.
- Boukerma I. (2012): Effet des PGPR (*Pseudomonas* spp. *fluorescens*) sur le biocontrôle et l'induction de la résistance systémique (IRS) chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire. [Thèse de Magister.] Saad Dahleb University, Algeria.
- Denton B. (2007): Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. *Basic Biotechnology*, 3: 1–5.
- De Lapeyre H.L., Chillet M., Chilin-Charles Y. (2008): Measurement of fungicide efficacy on post-harvest diseases: wound anthracnose, quiescent anthracnose, crown rot. *Fruits*, 63: 305–306.
- Eyquem A., Alouf J., Montagnier L. (2000): *Traité de microbiologie clinique: deuxième mise à jour et compléments*. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Italy.
- Farhan H.N., Abdullah H.H., Hameed A.T. (2010): The biological activity of bacterial vaccine of *Pseudomonas putida*2 and *Pseudomonas fluorescens*1 isolates to protect sesame crop (*Sesamum indicum*) from *Fusarium* fungi under field conditions. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1: 809–811.
- Fielly M.B., Cornell J.C., Morelock T.E. (1995): Vegetative compatibility, pathogenicity, and virulence diversity of *Fusarium oxysporum* recovered from spinach. *Plant Disease*, 79: 990–993.
- Haas D., Dérigo G. (2005): Ecological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Review of Microbiology*, 3: 307–319.
- Hameed A.T., Farhan H.N. (2007): Effect of *Pseudomonas aureofaciens* and *Pseudomonasputida* on growth of sorghum biocontrol and protect them from infection of *Rhizoctonia solani* fungi. *Al-Anbar University Journal for Pure Sciences*, 1: 8–16.
- Ji X., Lu G., Gai Y., Zheng C., Ma Z. (2008): Ecological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. *FEMS Microbiology Ecology*, 65: 565–578.
- Johnston A., Booth C. (1983): *Plant Pathologist's Pocket-book*. 2nd Ed. Kew, Commonwealth Mycological Institute.

doi: 10.17221/178/2015-PPS

- Kanawapee N, Sanitchon J, Lantorn W, Thiravakulpisit P. (2012): Evaluation of salt tolerance at the seedling stage in rice genotypes by growth performance, ion accumulation, proline and chlorophyll content. *Plant Soil*, 358: 235–249.
- Marikandan B, Saravananthar D, Rajendran L, Raguchander T, Saniyappan R. (2010): Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf0 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*, 54: 83–89.
- McKinney H.H. (1923): Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26: 195–218.
- Mishra R.K., Prakash O., Alam M., Iqbal A.D. (2010): Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the productivity of *Paspalum grassuoides* L. Herit. *Recent Research in Science and Technology*, 2: 53–57.
- Ongena M., Daayf F., Jacques P., Thonart P., Benhamou N., Paulitz T.C., Bélanger R.R. (2000): Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. *Plant Pathology*, 49: 528–530.
- Pieters C.M.J., Van Pelt J.A., Ton J., Parchmann S., Mueller M.J., Barchala A.J., Mich T.J.P., Van Loon L.C. (2000): Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57: 123–134.
- Pieters C.M.J., Zamiruddin C., Borensen R.L., Waller D.M., Van Wees S.C.M., Bakker P.A.H.M. (2014): Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 347–75.
- Ramasiah A.K., Ganampalli B., Kumar H. (2015): *In vitro* antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5: 22–27.
- Saravananthar D., Lavanya N., Matharamba R., Raguchander T., Suresh S., Saniyappan R. (2008): *Pseudomonas fluorescens* enhances resistance and natural enemy population in rice plants against leafhopper pest. *Journal of Applied Entomology*, 132: 469–479.
- Smedegaard-Petersen V., Tolstrup K. (1985): The limiting effect of disease resistance on yield. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 475–490.
- Suárez-Estrella F., Vargas-García, López C.M.J., Capel C., Moreno J. (2007): Antagonistic activity of bacteria and fungi from botanical compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop Protection*, 26: 46–53.
- Van der Ent S., van Hulzen M., Pico M.J., Cochrane T., Uddvardi M.K., Pieterse C.M.J., Ton J. (2009): Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytologist*, 183: 419–431.
- van Hulzen M., Pico M., van Loon L.C., Pieterse C.M.J., Ton J. (2008): Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *PNAS*, 105: 5602–5607.
- Van Loon L.C., Bakker P.A., Van der Heijdt W.H., Wendlandt D., Pugin A. (2008): Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 1609–1621.
- Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J. (1998): Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453–483.
- Van Peer R., Niemann G.J., Schippers B. (1991): Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS47c. *Phytopathology*, 81: 728–734.
- Van Wees S.C.M., Luijendijk M., Smootenberg L., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. (1999): Rhizobacteria mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atrop* upon challenge. *Plant Molecular Biology*, 41: 537–549.
- Van Wees S.C.M., Pieterse C.M.J., Trijssenaar A., Van't Woudede Y.A., Hartog F., Van Loon L.C. (1997): Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10: 716–724.
- Verhagen B.W.M., Tronel-Aziz E., Couderech M., Hübs M., Aziz A. (2010): *Pseudomonas* spp. induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 61: 249–260.
- Vijayan K.K., Bright S.J.S., Jayaprakash N.S., Alavandi S.V., Sornath P.S., Pruthi R., Rajan J.J.S., Santiago Y.C. (2006): A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. *Aquaculture*, 251: 192–200.
- Walton D., Heil M. (2007): Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71: 3–17.
- Yadeta K.A., Thomma B.P.H.J. (2013): The xylem as battle ground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 4: 1–9.
- Yoshida H., Boucias F., Kawano T. (2008): Discovery of oxidative burst in the field of plant immunity: Looking back at the early pioneering works and towards the future development. *Plant Signaling & Behavior*, 3: 153–155.
- Young N.D. (1996): QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 479–501.

Received: 2015–12–04

Accepted after corrections: 2016–08–10

Published online: 2017–03–17