

EFFETS DE LA BACTÉRIISATION PAR *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ET *RHIZOBIUM FABAE* SUR LA STIMULATION DE LA NODULATION ET DE LA CROISSANCE DE LA FÈVE (*VICIA FABAE* L. VAR. HISTAL)

OUSERIR Samira^{1*}, CHENNAOUI Nabila¹ et BENCHABANE Messaoud¹

1. Laboratoire de Protection et Valorisation des Ressources Agrobiologiques (LPVRAB), Département des Biotechnologies, Faculté SNV, Université Blida1, Blida, BP 270 09000, Algérie.

Reçu le 12/03/2018, Révisé le 29/05/2018, Accepté le 03/06/2018

Résumé

Description du sujet : Etude de la stimulation induite par la combinaison de *Pseudomonas fluorescens* et *Rhizobium fabae* sur la fève sous serre et en plein champ.

Objectifs : Evaluation de la nodulation par *R. fabae*, coinoculé avec *P. fluorescens* et ses conséquences sur la phytostimulation de la fève.

Méthodes : Des inoculas rhizobactériens, séparés et en mixture, ont été appliqués sur des plants de fève pour comparer leurs activités en plein champ et sous serre. La compétence rhizosphérique des souches de *Pseudomonas fluorescens*, la croissance, la nodulation et la teneur en azote des plants de fève ont été évaluées.

Résultats : Les rhizobactéries induisent une phytostimulation et améliorent la nodulation. Les meilleures performances ont été enregistrées en plein champ avec les coinoculations (P64-R1 et P64-R2), en induisant des gains plus élevés en nombre de nodules (120 %), en azote total (80 %), et en matières sèches et fraîches allant de 55.17 % à 92.29 %. *P. fluorescens* colonise efficacement (10^{11} CFU/g de sol) les rhizosphères des trois plantes testées (blé dur, tomate et fève).

Conclusion : Les coinoculations *R. fabae* R1 et R2 avec *P. fluorescens* P64 semblent les plus performantes en plein champ. La bactérisation combinée semble favorable à l'exercice des divers mécanismes d'action spécifique en induisant de meilleures performances en coinoculation.

Mots-clés : *Pseudomonas fluorescens*; *Rhizobium fabae*; coinoculation; nodulation; phytostimulation; fève.

BACTERISATION EFFECTS BY *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* AND *RHIZOBIUM FABAE* ON NODULATION STIMULATION AND GROWTH OF BEAN (*VICIA FABAE* L. VAR. HISTAL).

Abstract

Description of subject: The study of the stimulation induced by the combination of *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium fabae* on bean plants under greenhouse and in the field.

Objectives: Evaluation of the nodulation by *R. fabae* coinoculated with *Pseudomonas fluorescens*, and its consequences on the phytostimulation of bean.

Methods: Rhizobacteria inocula, separated and in a mixture were applied with bean plants, to compare their activities in the field and under greenhouse. Rhizospheric competence of *Pseudomonas fluorescens* strains, growth, nodulation and nitrogen content of bean plants were evaluated.

Results: rhizobacteria induced a phytostimulation and the improvement of the nodulation. The best performances were recorded in the field with the coinoculations (P64-R1 and P64-R2), inducing higher gains in number of nodules (120 %), total nitrogen (80 %), and dry and fresh matter ranging from 55.17 % to 92.29 %. *P. fluorescens* effectively colonise (10^{11} UFC / g of soil) the rhizosphere of the three plants tested (durum wheat, tomato and bean).

Conclusion: *R. fabae* R1 et R2 and *P. fluorescens* P64 coinoculations seem to be the most successful in the field. The combined bacterisation seems favourable to the exercise of the various mechanisms of action specific, by inducing better performances in situation of coinoculation.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*; *Rhizobium fabae*; coinoculation; nodulation; phytostimulation; bean.

*Auteur correspondant: OUSERIR Samira, E-mail : samiraagro84@gmail.com.

INTRODUCTION

L'agriculture moderne intensive s'est basée depuis des décennies sur l'application de grandes quantités d'intrants chimiques (pesticides et fertilisants), pour atteindre des performances de plus en plus revues à la hausse. En plus des méfaits néfastes vérifiés de ces produits chimiques, actuellement ils sont considérés comme des principaux polluants de l'environnement ayant engendrés la détérioration des propriétés biologiques des sols et l'accumulation de résidus chimiques dans les produits agricoles récoltables [1]. Parmi les alternatives proposées pour remédier à cette situation, l'exploitation et la valorisation de ressources biologiques dans les systèmes de gestion agricoles. L'utilisation des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), particulièrement dans des conditions défavorables et stressantes, peut conférer de nombreux avantages aux plantes [2]. Les *Pseudomonas spp.* fluorescents, considérées comme PGPRs non symbiotiques, ont été largement étudiées et expérimentées, surtout par rapport à leurs performances dans la phytostimulation de la croissance de nombreuses plantes [3, 4, 5], à leur capacité de colonisation racinaire, à la synthèse de phytohormones [6], à la solubilisation des phosphates [7], à la production d'enzymes et de métabolites, ainsi qu'au biocontrôle de divers agents phytopathogènes [8, 9]. Les Rhizobiums sont des PGPRs symbiotiques [10], connues pour leur aptitude à former des nodules racinaires en interaction avec des légumineuses pour la fixation de l'azote atmosphérique [11].

La symbiose légumineuse-*Rhizobium* est d'une grande importance agroécologique [12]. Cependant, des contraintes, particulièrement celles associées aux facteurs pédoclimatiques, peuvent réduire ou limiter les effets bénéfiques attendus de cette symbiose rhizobienne [13]. Plusieurs études ont rapporté que l'utilisation simultanée de ces deux types de PGPRs (symbiotiques et non symbiotiques) procure des effets plus stimulants de la croissance des plantes, de la nodulation, de la fixation d'azote, de l'activité nitrogénase et de l'assimilation de l'azote et du phosphore [14, 15].

Les effets phytobénéfiques affectant certaines fonctions physiologiques, telles que la réduction du taux d'éthylène [16], la survie des bactéries rhizobiennes dans le sol, l'élargissement du système racinaire suite à la production d'hormones de croissance et donc l'augmentation du nombre de sites potentiels de colonisation bactérienne [17]. L'effet bénéfique dû à la bactérisation pourrait être associé à la bonne colonisation rhizosphérique et à l'efficacité de la compétition des bactéries introduites, même en présence de la microflore indigène [18, 19]. En effet, l'utilisation de souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents aptes à se maintenir et à se développer sur le système racinaire, s'accompagne d'effets bénéfiques significatifs chez les plantes inoculées [20]. Dans ce travail, une étude sur la compétence rhizosphérique a été réalisée avec trois espèces végétales : blé dur (*Triticum durum* var. waha), tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Heinz 1370) et la fève (*Vicia faba* L. var. Hista), afin d'évaluer les potentialités d'adaptation et de colonisation rhizosphérique de trois souches de *Pseudomonas fluorescens*. L'objectif étant d'étudier les effets de la coinoculation de ces rhizobactéries avec *Rhizobium fabae* sur la croissance et la nodulation chez la fève (*Vicia faba* L. var. Hista). Considérant que les conditions de champs sont moins contrôlées, plus stressantes et défavorables, une étude comparative a été expérimentée par rapport aux conditions contrôlées sous serre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souches bactériennes

Les expérimentations ont été réalisées en utilisant des souches de *Pseudomonas fluorescens*, et de *Rhizobium fabae* (Tableau 1). L'inoculum des souches de *Pseudomonas* (purifiées et conservées à 4°C), a été obtenu après incubation de 24 à 36 heures à 25°C sur milieu King B [21], celui des souches de *Rhizobium*, a été préparé à partir de cultures bactériennes de 4 jours à 25°C sur milieu PDAE (potato dextrose agar + extrait de levure). Les suspensions bactériennes de *Pseudomonas* et de *Rhizobium* ont été préparées avec de l'eau distillée stérile, pour obtenir des concentrations de 10⁸ CFU/ml.

Tableau 1 : Souches rhizobactériennes

Souches bactériennes	Plante hôte	Origine	Référence
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHAO	Tabac	Suisse	[22]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> S20	Palmier dattier,	Algérie	[23, 5]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P64	Abricotier		
<i>Rhizobium fabae</i> R1 et R2	Fève	Algérie	[24]

2. Matériel végétal et sol

Les graines de fève utilisées dans l'étude de la phytostimulation de la croissance végétale, et les graines de blé dur et de tomate, en plus de la fève, utilisées dans l'étude de la compétence rhizosphérique, ont été désinfectées par trempage dans l'hypochlorite de sodium (6°, 20 min), puis rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile. Le sol utilisé provient d'une parcelle nue, non cultivée depuis au moins 20 ans (pH = 6,7, K 0,63%, Na 2,63%, capacité d'échange cationique 12,5 meq/100g de sol, phosphore assimilable 189.33 ppm, teneur en matière organique 1.89%) [25]. Le sol recueilli de la parcelle a été séché, tamisé puis désinfecté par autoclavage (deux autoclavages de 30 minutes à 120°C et à 24 heures d'intervalle).

3. Compétence rhizosphérique

L'étude porte sur la mise en évidence de l'effet de la plante sur les aptitudes des souches de *Pseudomonas* (P64, CHAO et S20) à coloniser la rhizosphère, en interaction avec trois espèces végétales, le blé dur, la tomate et la fève. L'essai a été conduit dans des microcosmes conçus selon la description de Latour *et al.* [26]. Les graines semées sont bactérisées par les inoculas de *Pseudomonas* (10^8 CFU/g de sol), selon les traitements étudiés, puis déposés dans un phytotron à 25°C pour 30 jours à une photopériode de 16 heures. L'essai a été mis en place selon un dispositif en randomisation totale de neuf traitements avec 12 répétitions: P64-Blé, P64-Tomate, P64-Fève, CHAO-Blé, CHAO-Tomate, CHAO-Fève, S20-Blé, S20-Tomate et S20-Fève. Les dénombrements bactériens ont été réalisés après 15 et 30 jours du semi. Le sol récupéré des microcosmes est mis en suspension dans 90ml d'eau distillée stérile, après homogénéisation pendant 5mn, 1ml de contenu est dilué dans 9ml d'eau distillé. Les isolements pour le dénombrement sont effectués avec les dilutions 10^{-5} à 10^{-8} en trois répétitions.

0,1ml de chaque dilution est ensemencé sur milieu King B, puis incubé à 25°C pendant 24 à 48 heures.

4. Nodulation et phytostimulation de la croissance

4.1. Sous serre

Le sol désinfecté a été mélangé avec la tourbe stérile (1/3 de tourbe, 2/3 de sol) et réparti dans des pots de 2000 ml. Les graines de fève préalablement mises à germer (durant 3 jours à 27°C), ont été bactérisées avec les souches S20, CHAO et P64 dans la tourbe stérile, imbibée de l'inoculum à appliquer ($2.5 \cdot 10^8$ CFU /g). L'inoculation avec R1 et R2 a été effectuée trois jours après le semis, juste après l'apparition des poils absorbants, afin d'assurer une bonne adhésion des bactéries sur les racines [23, 24].

4.2. Plein champ

L'essai a été conduit sur la même parcelle nue, décrite dans matériel végétal. Au moment du semis, les graines de fève ont été enrobées avec la tourbe imbibée par l'inoculum des souches S20, CHAO ou P64. Les inoculations avec R1 ou R2 ont été réalisées 10 jours après le semis. Les essais, sous serre et en plein champ, ont été conduits selon un dispositif en blocs aléatoires complets en trois répétitions pour les douze traitements étudiés: témoin non inoculé, traitements à inoculation simple (R1, R2, S20, CHAO, P64), traitements à coinoculation (S20-R1, S20-R2, CHAO-R1, CHAO-R2, P64-R1 et P64-R2), à raison de 15 répétitions pour chaque traitement.

4.3. Évaluation de la phytostimulation

Après 50 jours des opérations de bactérisation, cinq plants prélevés au hasard, de chaque essai et de chaque traitement, où les deux parties aérienne et racinaire sont séparées et pesées immédiatement pour déterminer le poids frais, puis desséchées à 80°C pendant 72 heures jusqu'au poids sec constant.

Le nombre de nodules, a été compté après un rinçage soigné de la partie racinaire de trois plants sélectionnés aléatoirement de chaque traitement. La teneur en matière azotée totale de la partie aérienne, pour 100g de matière sèche, de cinq échantillons, est mesurée par la méthode de Kjeldahl [27]. Les valeurs de ces paramètres sont exprimées en taux de gains (%) par rapport à leurs témoins relatifs.

5. Analyses statistiques

Pour la phytostimulation de la croissance, les résultats des pourcentages ont été comparés par le test de Student ($\alpha=5\%$), test de comparaison des proportions. Les paramètres de phytostimulation et les résultats des dénombrements bactériens ont subi une analyse de la variance et de la comparaison des moyennes selon le test Newman-Keuls au seuil de risque d'erreur $\alpha = 5\%$ [28].

RÉSULTATS

1. Compétence rhizosphérique

Le dénombrement bactérien dans tous les microcosmes montrent une évolution significative des populations bactériennes des trois souches inoculées (P64, CHAO et S20), par rapport aux apports initiaux (10^8 CFU /g de sol), notamment après 15 jours du semis (10^9 à 10^{11} CFU/g de sol). Les niveaux de colonisation les plus élevés (10^{11} CFU/g de sol) sont enregistrés dans les interactions P64-Fève, S20-Tomate et CHAO-Tomate. Les densités bactériennes, enregistrées après 30 jours, montrent une légère diminution pour la plupart des interactions étudiées, à l'exemple de P64-Fève et CHAO-Tomate, où les niveaux sont passés, respectivement, de $1,22 \times 10^{11}$ à $6,27 \times 10^{10}$ CFU/g de sol et de $1,10 \times 10^{11}$ à $5,73 \times 10^{10}$ CFU/g de sol (Fig. 1).

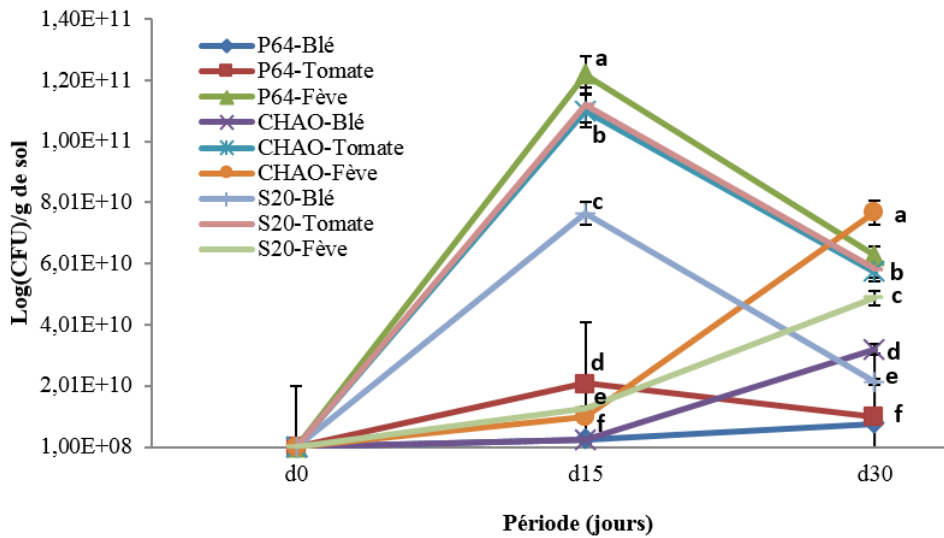


Figure 1 : Evolution des populations bactériennes en fonction du temps dans les microcosmes des trois plantes

2. Nodulation et phytostimulation de la croissance

2.1. Nombre de nodules et teneur en matière azotée totale

Le nombre de nodules produit, sur les plants de fève, par les traitements sous serre est supérieur, comparé à celui produit en plein champ et par rapport aux témoins (R1 et R2). Les coinoculations de *Rhizobium fabae* (R1) avec les souches de *Pseudomonas fluorescens* (S20, P64)

en plein champ, ont amélioré significativement la nodulation, comparée à l'inoculation uniquement avec R1 ou R2. Le gain en nombre de nodules le plus élevé, au champ, a été observé chez les plants de fève coinoculés avec P64-R1 (128.94%). Même si l'effet de cette combinaison (P64-R1) a procuré des gains chez les plans conduits sous serre (27.44%), néanmoins il y a une régression par rapport aux conditions de plein champ (Tableau 2, Fig. 2).

Tableau 2 : Gains (%) en nodulation des plants sous serre et en plein champ

	R1		R2		S20-R1		S20-R2		CHAO-R1		CHAO-R2		P64-R1		P64-R2	
	Serre	Champ	Serre	Champ	Serre	Champ	Serre	Champ	Serre	Champ	Serre	Champ	Serre	Champ	Serre	Champ
Nombre de nodules par plant	64.67 bc ± 5.35*	22.13 f ± 3.65	91.67 a ± 4.39	35.80 ef ± 4.26	67.09 bc ± 6.75	29.27 f ± 3.18	83.02 ab ± 4.75	40.13 e ± 2.90	62.59 c ± 6.22	26.20 f ± 3.15	77.24 b ± 6.78	32.20 ef ± 4.85	82.42 ab ± 4.90	50.60 d ± 3.60	90.80 a ± 3.33	43.80 e ± 3.15
Gain (%)					3.74 d ± 1.97	32.26b ± 8.45	- ± 4.03	12.09 c ± 4.03	- ± 4.68	18.39 bc ± 4.68	- ± 4.68	- ± 4.68	27.44 b ± 7.14	128.64 a ± 6.44	- ± 6.44	22.34 bc ± 5.11

Pseudomonas fluorescens (S20, CHAO et P64) and *Rhizobium fabae* (R1 et R2).
 Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différences significatives à α= 5%.
 (-) : pas de gain (sans effet sur la nodulation).
 * : écart-type entre les répétitions.



Figure 2 : Nodules racinaires des plants de fève bactérisés par la combinaison P64-R1.

L'effet de la souche P64 a été, également, constaté sur la teneur de la biomasse aérienne en matière azotée. La combinaison P64-R1 a montré une augmentation significative (82.47%) en plein champ, alors que la teneur maximale en azote enregistrée sous serre a été obtenue par l'application combinée P64-R2 (37.53%), par rapport aux témoins respectifs R1 ou R2 (Fig. 3).

2.2. Paramètres de phytostimulation

La coinoculation des souches de *Rhizobium* et de *Pseudomonas* a engendré le gain en poids frais, le plus élevé,

chez les pousses par rapport à l'inoculation séparée avec ces mêmes souches et au témoin non inoculé, selon la combinaison spécifique *Pseudomonas-Rhizobium*. En plein champ, l'interaction P64-R2 a engendré un gain significativement supérieur (92.29%), comparé à R2 (27,13%) et à P64 (39,83%). De même, cette combinaison a induit le gain en poids frais le plus élevé sous serre (14.52%), mais qui reste toujours inférieur aux gains obtenus en plein champ. Une tendance similaire pour le poids sec des pousses observé avec P64-R2 en plein champ (53,17%) et sous serre (44,70%) par rapport aux autres traitements (Tableau 3).

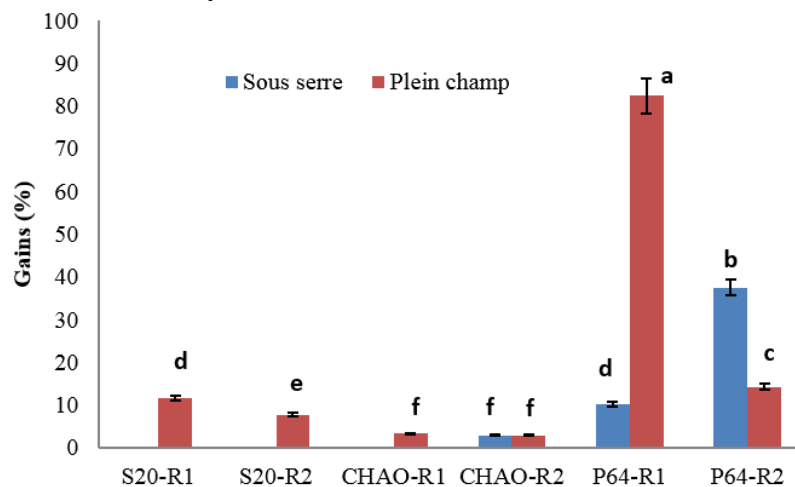


Figure 3 : Gains obtenus en matière azotée des interactions entre les souches de *Pseudomonas fluorescens* (S20, CHAO et P64) et les souches de *Rhizobium fabae* (R1 et R2).

Tableau 3 : Gains (%) en paramètres de croissance des plants sous serre et en plein champ

Traitements		Pousses		Racines	
		Poids frais (%)	Poids sec (%)	Poids frais (%)	Poids sec (%)
R1	Sous serre	04.91 ± 0.24*m	20.13 ± 1.00 e	-	231.17 ± 9.24 b
	Plein champs	35.43 ± 1.40 f	02.71 ± 0.13 j	14.28 ± 0.71 g	-
R2	Sous serre	05.07 ± 0.25 m	22.18 ± 1.10 e	-	234.21 ± 9.36 b
	Plein champs	27.13 ± 1.35 g	34.74 ± 1.73 d	29.72 ± 1.48 e	-
S20	Sous serre	06.32 ± 0.31 l	18.08 ± 0.90 f	-	47.36 ± 2.36 g
	Plein champs	10.89 ± 0.54 k	11.17 ± 0.75 h	35.52 ± 1.42 d	10.43±0.89 i
CHAO	Sous serre	01.69 ± 0.08 n	22.86 ± 1.11 e	-	89.47 ± 4.47 e
	Plein champs	23.10 ± 1.15 h	48.03 ± 1.92 b	41.31 ± 2.06 c	06.77 ± 0.33 j
P64	Sous serre	03.39 ± 0.16 m	15.69 ± 0.78 g	-	128.94 ± 5.15 d
	Plein champs	39.83 ± 1.99 e	43.08 ± 1.72 c	43.24 ± 2.16 c	05.08 ± 0.25 k
S20-R1	Sous serre	09.21 ± 0.46 k	18.77 ± 0.75 f	-	134.21 ± 5.36 d
	Plein champs	17.08 ± 0.85 i	12.38 ± 0.61 h	-	-
S20-R2	Sous serre	-	06.48 ± 0.25 i	18.08 ± 0.90 f	65.78 ± 3.28 f
	Plein champs	35.37 ± 1.41 f	51.35 ± 2.05 a	27.41 ± 1.09 e	-
CHAO-R1	Sous serre	06.05 ± 0.18 l	19.45 ± 1.97 e	-	160.52±6.42 c
	Plein champs	56.97 ± 1.13 c	52.87 ± 1.05 a	10.81 ± 0.54 h	-
CHAO-R2	Sous serre	-	10.23 ± 0.40 h	-	155.26 ± 6.21 c
	Plein champs	64.01 ± 3.20 b	31.72 ± 0.95 d	41.69 ± 1.66 c	7.21 ± 0.51 j
P64-R1	Sous serre	03.87 ± 0.19 m	22.86 ± 1.14 e	-	276.31 ± 11.05 a
	Plein champs	51.62 ± 2.58 d	19.93 ± 1.95 e	66.04 ± 3.30 b	37.28±1.86 h
P64-R2	Sous serre	14.52 ± 0.73 j	44.70 ± 2.23 c	27.12 ± 1.35 e	247.36 ± 9.89 b
	Plein champs	92.29 ± 4.61 a	53.17 ± 2.65 a	73.35 ± 3.66 a	9.63±0.92 i

Pseudomonas fluorescens (S20, CHAO et P64) and *Rhizobium fabae* (R1 et R2).
 Les valeurs suivies de la même lettre ne presentent pas de différences significatives à α= 5%.
 (-) : pas de gain (sans effet sur la phytostimulation)
 * : écart- type entre les répétitions

En termes de poids frais des racines, les traitements sous serre n’ont pas montré de différences importantes, où le maximum a été induit par P64-R2 (27.12%). Un gain en biomasse racinaire plus élevée a été enregistré en plein champ, suite à l’inoculation avec *Pseudomonas* (S20, CHAO et P64), par rapport aux souches de *Rhizobium*, R1 ou R2, seules, qui augmente significativement avec la coinoculation P64-R2 (73,35%) (Fig. 4, Tableau 3).

Le gain en poids sec des racines s’est amélioré chez tous les plants inoculés sous serre, la valeur la plus élevée étant observée avec la combinaison P64-R1 (276,31%), comparativement aux traitements appliqués en plein champ, qui n’ont pas enregistré de gains significatifs par rapport aux témoins non inoculés (Tableau 3).

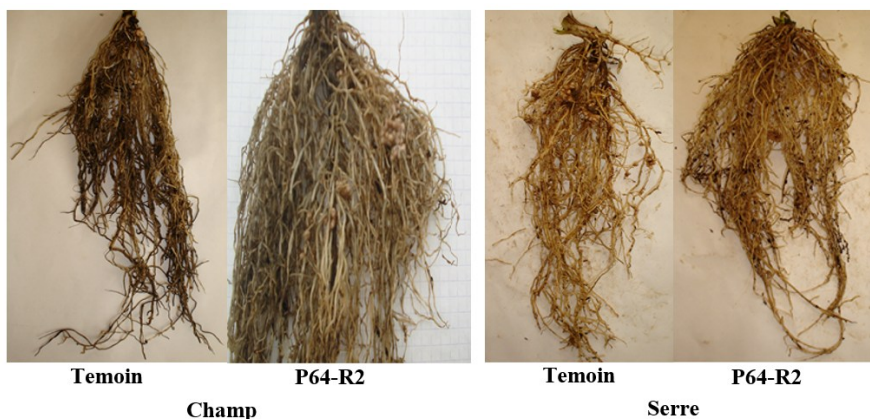


Figure 4 : Développement racinaire des plants de fève bactérisés par la combinaison P64-R2

DISCUSSION

L'étude des effets bénéfiques des souches de *Pseudomonas fluorescens* a mis en évidence leurs potentialités dans la stimulation de croissance végétale et de nodulation en interaction avec les souches de *Rhizobium fabae*. Les niveaux de colonisation racinaire obtenus, avec les plants de blé dur, de tomate ou de fève, expriment une compétence rhizosphérique notable chez les souches de *Pseudomonas fluorescens* (P64, CHAO et S20), bien que leurs origines initiales d'isolement soient autres que ces plantes, qui sont respectivement l'abricotier, le tabac et le palmier dattier. Après 15 jours de leur introduction, les densités bactériennes maximales ont été atteintes, montrant ainsi une adaptation rhizosphérique relative. La richesse de ce dernier milieu en éléments nutritifs influence la vitesse de la division cellulaire et par conséquent la survie bactérienne [29]. Après 30 jours, même si les densités bactériennes ont légèrement diminué chez la plupart des populations introduites, les densités bactériennes restent élevées comparativement aux densités initiales (10^8 CFU/ml). Donc, les trois souches de *Pseudomonas fluorescens*, quel que soit la plante, ont montré des niveaux de colonisation rhizosphérique supérieur à 10^8 CFU/ml. Il est rapporté que de nombreuses souches de *Pseudomonas* spp. présentent un bon potentiel d'adaptation et de colonisation rhizosphérique [30, 20], additionné à leur capacité de métaboliser une large gamme d'exsudats racinaires [31].

Par rapport à l'activité des souches *Rhizobium fabae* R1 et R2, la présence de souches de *Pseudomonas fluorescens* a induit une augmentation appréciable en nombre de nodules et en fixation d'azote, dans les deux essais (sous serre et champ). Dans ces essais de coinoculation, la souche P64 apparaît plus performante en stimulant davantage ces processus chez la fève. L'efficacité de la combinaison entre ces deux groupes rhizobactériens a été mentionnée, en plus de la fève, chez le pois chiche (*Cicer arietinum*) [32], le maïs (*Zea mays*) [33] et le haricot (*Phaseolus vulgaris*) [34, 35].

De même, Stajkovic *et al.* [36] ont montré que la coinoculation du haricot avec des souches de *Rhizobium* et de PGPR a influencé positivement le nombre de nodules (76,67 à 106,67 nodules /plant) comparativement à l'inoculation avec *Rhizobium* seul (54 nodules/plant).

La coinoculation peut engendrer une nodulation précoce, une augmentation du nombre de nodules et une amélioration générale du développement racinaire. Le nombre de nodules racinaires est fortement corrélé avec le rendement de plusieurs espèces légumineuses [37]. Dans nos expériences, sous serre et en plein champ, les poids frais et secs des biomasses aérienne et racinaire sont nettement améliorés avec les coinoculations (P64-R1, P64-R2) par rapport aux témoins. Dans d'autres travaux, la coinoculation avec des espèces rhizobiennes et autres PGPR a significativement amélioré le poids sec et frais des pousses et des racines du haricot [35], des plantules de soja (*Glycine max*) et de pois chiche, cultivé au champ et sous serre [38]. Ainsi, l'inoculation des graines de chou (*Brassica oleracea*) avec des PGPR a augmenté le poids frais et sec des pousses, respectivement, de 6 à 51%, et de 13 à 10%. De même, les poids frais et secs des racines ont été améliorés, respectivement, de 27 à 12% et de 12 à 37% [39].

La présence de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans les zones rhizosphériques, où des *Rhizobiums* exercent leurs activités nodulantes sur des légumineuses, stimule le nombre de nodules, la fixation de l'azote et le développement des biomasses aérienne et racinaire. Cette stimulation peut être expliquée par les aptitudes des souches de *Pseudomonas* dans la solubilisation des phosphates, en augmentant la teneur en phosphore dans le sol tout en améliorant la nodulation et la fixation d'azote. D'après Bashir *et al.* [40], la disponibilité en phosphore augmente le nombre et la taille des nodules et la quantité d'azote assimilée par unité de poids des nodules, augmentant de ce fait le pourcentage d'azote dans la partie récoltée de la légumineuse hôte, avec une amélioration de la densité des Rhizobia dans le sol entourant la racine [41].

Vessey [14] et Salantur *et al.* [42] suggèrent que la sécrétion bactérienne de substances favorisant la croissance des plantes pourrait être responsable des effets bénéfiques des PGPR.

Les *Pseudomonas* spp fluorescents sont considérés parmi les PGPRs producteurs d'AIA (Acide indole 3-acétique) [43] et de cytokinines, responsables de la division cellulaire et du développement racinaire [44]. L'inégalité de la nodulation peut être attribuée à la capacité des PGPRs à produire de l'AIA, car son rôle consiste à réguler la formation des nodules dans les légumineuses, en raison de la suppression des agents pathogènes [45] ou de la mobilisation d'éléments nutritifs [46].

Des changements dans l'expression génique des plantes inoculées par des PGPRs avec un gène fonctionnel de l'ACC désaminase (1-aminocyclopropane-1-Acide carboxylique), peuvent être associés à une plus grande croissance, une meilleure division cellulaire et une régulation négative des gènes impliqués dans la réponse au stress induit par l'éthylène. Plusieurs études ont observé l'inhibition du processus de nodulation ou de diminution du nombre de nodules par l'éthylène sur plusieurs légumineuses [47, 48]. *Pseudomonas fluorescens* peut abaisser les niveaux d'éthylène dans la racine grâce à l'enzyme ACC désaminase, précurseur de l'éthylène, qui réduit l'association racine-molécule ACC, tout en favorisant l'élongation racinaire [49, 48]. Dans cette étude les gains, en nodulation et en matière azotée, obtenus suite à la bactérisation avec la souche CHAO sont moins importants, comparés aux gains obtenus avec les souches P64 et S20. La souche CHAO, considérée comme souche de référence, produit des métabolites certes bénéfiques, comme les acides organiques et les hormones de croissance [50], mais elle est incapable d'utiliser le précurseur d'éthylène (ACC), donc dépourvue d'activité ACC désaminase [51]. Dans nos travaux précédents [24, 52], il a été enregistré des cas d'inhibition de la croissance de la fève par la souche CHAO, comparée aux souches P64 et S20.

L'excrétion des cellulases par les souches de *Pseudomonas* et leur action subséquente sur les racines des légumineuses pourraient faciliter la pénétration rapide des Rhizobiums, conduisant à une augmentation de la nodulation et de la fixation d'azote, ce qui a été observé sur diverses légumineuses comme la luzerne

(*Medicago sativa*) [53], le haricot [54], le pois (*Pisum sativum*) [55] et le soja [56].

Les résultats de nos expériences montrent que les effets bénéfiques de la coinoculation sont mieux perceptibles dans le champ par rapport à la serre.

Les gains obtenus en nombre de nodules et en azote total, en poids frais et sec des pousses et en poids frais des racines sont plus importants en plein champ. Le gain en poids sec des racines est significativement supérieur sous serre, ceci peut être expliqué par l'amélioration de la matière sèche suite au nombre élevé de nodules produit par rapport au champ.

L'inoculation de plantes avec des souches de *Pseudomonas fluorescens* a eu un effet plus stimulant sur leur croissance dans un sol non stérile. Abbass et Okon [57] ont présumé que l'AIA et d'autres phytohormones étaient responsables d'une augmentation de la croissance du canola, de la tomate et du blé (*Triticum turgidum*) dans un sol non stérile inoculé avec des souches PGPR. Les auxines produites par ces rhizobactéries peuvent influencer la croissance des plantes, y compris le développement racinaire qui améliore l'absorption d'éléments nutritifs, en augmentant de ce fait la croissance végétale [58]. Généralement, les microorganismes isolés de la rhizosphère et du rhizoplan de diverses cultures ont révélé plus d'aptitudes de production d'auxine que ceux provenant de sols sans racines [59]. L'inoculation de sols naturels avec des isolats de PGPR a stimulé d'avantage la production d'auxine, ceci peut expliquer que ces rhizobactéries ont eu une capacité plus concurrentielle en présence d'une microflore indigène, activant plus leurs mécanismes de phytostimulation [60].

CONCLUSION

Par rapport aux applications des souches *Rhizobium fabae*, R1 et R2, leur association avec des souches de *Pseudomonas fluorescens* (S20, CHAO et P64) a induit plus d'effets phytobénéfiques. Le potentiel phytostimulateur en croissance est meilleur avec la combinaison de PGPRs symbiotiques et non symbiotiques. L'impact de cette association est mieux perceptible dans les conditions de plein champ par rapport aux essais sous serre, soulignant l'efficacité de ces interactions rhizobiennes, qui est plus accentuée en conditions naturelles plus stressantes aux populations bactériennes.

La coexistence de ces deux groupes rhizobactériens, dans la rhizosphère de la fève, semble mieux stimuler les effets bénéfiques recherchés sur les plants, notamment en nodulation, en fixation d'azote et en phytostimulation des biomasses fraîches et sèches. Comme ces genres bactériens se caractérisent par des mécanismes interactifs différents, dans le sol et avec les plantes, il devient nécessaire de mieux comprendre les aspects communicatifs, notamment ceux ayant des déterminismes biochimiques et moléculaires entre les groupes de PGPR (symbiotiques et non symbiotiques), qui sont impliquées dans les interactions plante hôte-rhizobactérie. Cette situation complémentaire ou synergétique peut être valorisée, notamment en conditions défavorables par la sélection de souches douées de potentialités stables, reproductibles et adaptées aux différentes conditions telluriques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Ahemad M., Khan M.S., Zaidi A. & Wani P.A. (2009). Remediation of herbicides contaminated soil using microbes. In: Khan M.S., Zaidi A. & Musarrat J. (ed.), Microbes in sustainable agriculture. Nova Science Publishers Inc, New York, pp. 261–284.
- [2]. Nadeem S.M., Zahir Z.A., Naveed M. & Arshad M. (2010). Microbial ACC-deaminase: prospects and applications for inducing salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci*, 29: 360-393.
- [3]. Kloepper J.W. & Schroth M.N. (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogen Bacteria. INRA, Gilbert-Clarey, Tours, France, 2 : 879-882.
- [4]. Latour X., Corberand T., Laguerre G. & Allard F. (1996). The composition of fluorescent *Pseudomonas* populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied and environmental Microbiology*, 62 : 2449-2456.
- [5]. Benchabane M. (2005). Caractérisation des effets d'antagonisme microbienne et de promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Thèse Doctorat d'état, FSB-UTHB, Alger, Algérie, 235 p.
- [6]. Ahmad E., Khan M.S. & Zaidi A. (2013). ACC deaminase producing *Pseudomonas putida* strain PSE3 and *Rhizobium leguminosarum* strain RP2 in synergism improves growth, nodulation and yield of pea grown in alluvial soils. *Symbiosis*, 61: 93–104.
- [7]. Hussein K.A. & Joo J.H. (2015). Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58: 847-855.
- [8]. Kloepper J.W., Lifshitz R. & Zablutowicz R.M. (1989). Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7 : 39-44.
- [9]. Siddiqui I.A., Shaikat S.S., Sheikh I.H. & 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 and Biotechnology*, 6 : 641–650.
- [10]. Ziaf K., Latif U., Amjad M., Shabir M.Z., Asghar W., Ahmed S., Ahmad I., Jahangir M.M. & Anwar W. (2016). Combined use of microbial and synthetic amendments can improve radish (*Raphanus sativus*) yield. *J Environ Agric Sci*, 6: 10–15.
- [11]. Lindström K. & Martinez-Romero M. (2005). International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium* Minutes of the meeting. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55: 1383–1383.
- [12]. Naveed M., Mehboob I., Hussain M.B. & Zahir Z.A. (2015). Perspectives of rhizobial inoculation for sustainable crop production. In: Plant microbes symbiosis: applied facets. Springer, pp. 209–239.
- [13]. Sánchez-Pardo B., Carpena R.O. & Zornoza P. (2013). Cadmium in white lupin nodules: impact on nitrogen and carbon metabolism. *J Plant Physiol*, 170: 265–271.
- [14]. Vessey J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255 : 571-586.
- [15]. Tariq M., Hameed S., Yasmeeen T. & Ali A. (2012). Non-rhizobial bacteria for improved nodulation and grain yield of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *Af J Biotechnol*, 11 : 15012–15019.
- [16]. Shaharoon B., Arshad M. & Zahir Z.A. (2006). Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Lett Appl Microbiol*, 42 : 155–159.
- [17]. Barea J.M., Pozo M.J., Azcon R. & Azcon-Aguilar C. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 417 : 1761-1778.
- [18]. Weller D.M. (1988). Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology*, 26 : 379 - 407.

- [19]. Ghirardi S., Dessaint F., Mazurier S., Corberand T. & Raaijmakers J.M. (2012). Identification of traits shared by rhizosphere-competent strains of fluorescent *Pseudomonads*. *Microb Ecol*, 64: 725–737.
- [20]. Hernández-León R., Rojas-Solís D., Contreras-Pérez M., Orozco-Mosqueda M. del. C., Macías-Rodríguez L.I. & Reyes-de la Cruz H. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol Control*, 81: 83–92.
- [21]. King E.O., Wark M.K. & Raney D.E. (1954). Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and chemical medicine*, 44 : 301-307.
- [22]. Youard Z.A., Mislin G.L.A., Majcherczyk P.A., Schalk I.A. & Reimann C. (2007). *Pseudomonas fluorescens* CHA0 Produces Enantio-pyochelin, the Optical Antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* Siderophore Pyochelin. *J Biol Chem*, 49 : 35546-35553.
- [23]. Benchabane M., Bakour R., Toua D. & Boutekrabi A. (2000). Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. Bulletin OEPPL/EPPO, Bulletin, 30 : 243 - 246.
- [24]. Chennaoui N. (2008). Actions des rhizobactéries bénéfiques sur l'amélioration de la stimulation de la croissance des plantes : Importance de la compétence rhizosphérique chez les *Pseudomonas* pp. fluorescents. Thèse Magister. Spécialité : Amélioration des productions végétales. USD, Blida, Algérie, 161 p.
- [25]. Boukerma L. (2012). Effets des PGPR (*Pseudomonas* spp. fluorescent) sur le biocontrol et l'induction de la résistance systémique (irs) chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire. Thèse Magister en Biotechnologies végétales. Option : Biotechnologie Végétales. ENSA, Alger, Algérie, 140 p.
- [26]. Latour X., Philippot L., Corberand T. & Lemanceau P. (1999). The establishment of an introduced community of fluorescent pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. *FEMS Microbiol Ecol*, 30 : 163-170.
- [27]. Kjeldahl J. (1983). A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22 : 366-382.
- [28]. Dagenelie P. (1975). *Théories et méthodes statistiques. Les méthodes de l'interférence statistique*. Les presses agronomiques de Gem blouse.1975, pp. 463.
- [29]. Davet P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. Collection Mieux Comprendre. INRA Edition, Paris, 383p.
- [30]. Haas D. & Keel C. (2003). Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* sp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol*, 41: 117–153.
- [31]. Chin-A-Woeng T.F., Bloemberg G.V., Mulders I.H., Dekkers L.C. & Lugtenberg B.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.
- [32]. Hamaoui B., Abbadi J.M., Burdman S., Rashid A., Sarig S. & Okon Y. (2001). Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. *Agron*, 21: 553–560.
- [33]. Kozdroja J., Trevors J.T. & van Elsland J.D. (2004). Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem*, 36 : 1775–1784.
- [34]. Satveer K. & Veena K. (2016). Evaluation of synergistic potential of plant growth promoting rhizobacteria with *Rhizobium* in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Journal of Applied and Natural Science*, 8 (2): 995 – 998.
- [35]. Korir H., Mungai N.W., Thuita M., Hamba Y. & Masso C. (2017). Co-inoculation Effect of Rhizobia and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Common Bean Growth in a Low Phosphorus Soil. *Front. Plant Sci*, 8:141.
- [36]. Stajkovic O., Delić D., Jošić D., Kuzmanović D., Rasulić N. & Knežević-Vukčević J. (2011). Improvement of common bean growth by coinoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. *Rom. Biotech Lett*, 16 (1) : 5919–5926.
- [37]. Dhama N. & Prasad B. (2009). Increase in root nodulation and crop yield of soybean by native Bradyrhizobium japonicum strains. *J Plant Sci*, 6: 1–3.
- [38]. Verma J.P., Yadav J. & Tiwari K.N. (2012). Enhancement of nodulation and yield of chickpea by co-inoculation of indigenous mesorhizobium spp. and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Eastern Uttar Pradesh. *Commun. Soil Sci. Plant Anal*, 43 : 605–621.

- [39]. Yildirim E., Turan M., Ekinçi M., Dursun A., Gunes A. & Donmez M. (2015). Growth and mineral content of cabbage seedlings in response to nitrogen fixing rhizobacteria treatment. *Rom Biotechnol Lett*, 20(6): 10929–10935.
- [40]. Bashir K., Ali S. & Umair A. (2011). Effect of different phosphorus levels on xylem sap components and their correlation with growth variables of mash bean. *Sarhad J Agric*, 27 : 1–6.
- [41]. Bhatia S., Maheshwari D.K., Dubey R.C., Arora D.S., Bajpai V.K. & Kang S.C. (2008). Beneficial effects of Fluorescent Pseudomonads on seed germination, growth promotion, and suppression of charcoal rot in groundnut (*Arachis hypogea* L.). *J Microbiol Biotechnol*, 18 (9) : 1578–1583.
- [42]. Salantur A., Ozturk A. & Akten S. (2006). Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. *Plant Soil Environ*, 52 : 111–118.
- [43]. Dey R., Pal K.K., Bhatt D.M. & Chauhan S.M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol Res*, 159 : 371–394.
- [44]. Arshad M. & Frankenberger W.T. (1993). Microbial production of plant growth regulators. In: Metting FB (Eds.), Applications in agricultural and environmental management. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 307–347.
- [45]. Mahmoud A.L.E. & Abd- Alla M.H. (2001). Siderophore production by some microorganisms and their effect on Bradyrhizobium – mungbean Symbiosis. *Int J Agric Biol*, 3: 157-62.
- [46]. Ahemad M. & Khan M.S. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* strain PS1 enhances growth parameters of green gram (*Vigna radiata* L.Wilczek) in insecticide-stressed soils. *J Pest Sci*, 84: 123-31.
- [47]. Xie Z.P., Staehelin C., Wiemken A. & Boller T. (1996). Ethylene responsiveness of soybean cultivars characterized by leaf senescence, chitinase induction and nodulation. *J Plant Physiol*, 149 : 690–694.
- [48]. Okazaki S., Nukui N., Sugawara M. & Minamisawa K. (2004). Rhizobial strategies to enhance symbiotic interactions: Rhizobitoxine and 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate deaminase. *Microbes environ*, 19 (2) : 99-111.
- [49]. Glick B.R., Karaturovic D.M. & Newell P.C. (1995). A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting Pseudomonads. *Can J Microbiol*, 40 : 533-536.
- [50]. Pal K.K., Tilak K.V.B.R., Saxena A.K., Dey R. & Singh C.S. (2001). Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res*, 156 : 209-223.
- [51]. Wang C., Knill E., Glick B.R. & Defago G. (2000). Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO and its gac A derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities. *Can J Microbiol*, 46 : 898-907.
- [52]. Ouserir S. (2009). Etude des effets de la coinoculation des rhizobactéries (*Pseudomonas* spp. fluorescents et *Rhizobium* spp.) sur la phytostimulation et la nodulation chez la fève. Thèse Magister. Spécialité : Amélioration des productions végétales. USD, Blida, Algérie, 139 p.
- [53]. Knight T.J. & Langston-Unkefer P.J. (1988). Enhancement of symbiotic dinitrogen fixation by a toxin-releasing plant pathogen. *Science*, 241 : 951–954.
- [54]. Grimes H.D. & Mount M.S. (1984). Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biol Biochem*, 16: 27–30.
- [55]. Bolton H.Jr., Elliott L.F., Turco R.F & Kennedy A.C. (1990). Rhizoplane colonization of pea seedlings by *Rhizobium leguminosarum* and a deleterious root colonizing *Pseudomonas* sp. and effects on plant growth. *Plant Soil*, 123 : 121–124.
- [56]. Nishijima F., Evans W.R. & Vesper S.J. (1988). Enhanced nodulation of soybean by *Bradyrhizobium* in the presence of *Pseudomonas fluorescens*. *Plant Soil*, 111 : 149–150.
- [57]. Abbass Z. & Okon Y. (1993). Plant growth promotion by *Azotobacter paspali* in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem*, 25 : 1075-1083.
- [58]. Vikram A. (2007). Efficacy of phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols on growth and yield parameters of sorghum. *Res J Microbiol*, 2 : 550-559.
- [59]. Arshad M. & Frankenberger W.T.Jr. (1998). Plant growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Advances in Agronomy*, 62 : 146–151.
- [60]. Khalid A., Arshad M. & Zahir Z.A. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Applied Microbiol*, 29 : 473-480.