REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE VEGETALE ET D'ECOLOGIE

T H E S E

pour obtenir le grade de DOCTEUR 3ème cycle LMD

Discipline : Biotechnologie et génomique végétales

N° de série : ……

N° d'ordre : ……..

Présenté et soutenue publiquement par

BENMATI Mahbouba

Le 11 MAI 2014

Thème

PGPR, paranodules, stimulation de la croissance et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : Aspects moléculaires et génétiques

JURY

Président de jury :	YKHLEF N.	*Professeur à l'université Constantine1, Algérie.*
Directeur de thèse :	DJEKOUN A.	*Professeur à l'université Constantine 1, Algérie.*
Examinateurs :	BEDDIAR A.	*Professeur à l'université Badji M. de Annaba, Algérie.*
	GHERBI H.	*Docteur (CR1) à l'IRD Montpellier, France.*
	HAFSI M.	*Professeur à l'université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie.*
	HAMIDECHI A.	*Professeur à l'université Constantine 1, Algérie.*

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail :

A mon Père

Qui a œuvré pendant des années à notre bien être et qui a
Consenti de bien lourds efforts pour nous permettre de mener
à bien nos études. Je tiens à lui témoigner
ma profonde affection

A ma Mère

Son soutien tout au long de mes études
sa bienveillance et ses conseils ont été très précieux, je tiens à lui témoigner
ma profonde affection et reconnaissance

A mon époux Rafik

Je ne saurai lui témoigner assez ma gratitude, d'un soutien
indéfectible, il a su trouver les mots pour m'aider et me
soutenir.

A mes Frères et ma Sœur

A qui je témoigne ma profonde affection, toujours présent, ils
m`ont toujours assisté et cru en moi

A mes amies : Adra, Amina, Farah

Qui m`ont toujours entouré et soutenu.

A tous les miens

REMERCIEMENTS

J’exprime toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse DJEKOUN Abdelhamid qui a assuré le suivi scientifique de ce travail de thèse et a su me diriger avec son expérience et ses précieux conseils. Je lui témoigne toute ma gratitude pour sa disponibilité, ses encouragements.

Je tiens à remercier le professeur YKHLEF Nadia pour avoir accepté de juger ce travail et pour l’insigne honneur qu’elle me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse. Quelle trouve ici le témoignage de ma haute considération. Je remercie également Docteur GHERBI Hassen d’avoir bien voulu être examinateur de mon travail de thèse, ainsi que les professeurs BEDDIAR Arifa, HAFSI Miloud, et HAMIDECHI Abdelhafid pour avoir accepté de juger ce travail. Je leur assure mon dévouement et mon profond respect.

Je tiens à remercier également Professeur LEBRUN Michel pour m’avoir accueilli au sein du laboratoire LSTM (Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes) ainsi que LEROUX Christine pour la bienveillante attention avec laquelle elle ma reçu et ses précieux conseils.

Mes vifs remerciements vont aussi à Mr BELBEKRI Nadir qui m’a beaucoup conseillé, qui a suivi l’expérimentation et qui m’a facilité le travail au laboratoire. Je remercie beaucoup Melle BOULDJEDJ Ryma et Mouellef Adra pour leur aident précieuse lors de mes manipulations.

Une pensée toute particulière à tous mes amis(e) de Montpellier : Tasnime, Imen, Souhir, Amadou, Oualid, Candide, Mariana, Hala, Driss, Elvira, Iulia.

Je remercie les stagiaires qui ont passé du temps au laboratoire et que j`ai eu plaisir à suivre. Je pense tout particulièrement à Amina, Anissa, Rym et Rima.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce modeste travail puisse être achevé.

Résumé

L`utilisation des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) comme une approche biologique semble être la solution prometteuse afin d`améliorer la production de blé dur (*Triticum durum* Desf.) en Algérie. Des recherches récentes ont prouvé que l'utilisation des PGPR comme inoculant constitue une alternative biologique soutenable pour la production végétale.

La caractérisation des souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère de blé dur à partir de plusieurs régions dans l'Est Algérien (Ain El bey Constantine, El Khroub-Constantine (zone A), El Khroub-Constantine (zone B), El Khroub-Constantine (El Baraouia zone1), El Khroub-Constantine (El Baraouia zone2), Mila, Souk Ahrass, Setif, Batna et Tebessa) a été effectué pour déterminer leurs propriétés morphologiques et physiologiques. Tous les isolats, a l`exception de ceux isolés des régions de Mila, Batna et Ain El Bey(Constantine), ont montré une croissance significative peu importe la composition du milieu en carbone et les conditions de culture en température et pH. En outre, il a été constaté que la plupart des isolats présente une bonne tolérance aux concentrations élevées de NaCl (700mM), contrairement à d`autres.

Ces souches ont été également testées pour leurs effets PGPR par des études biochimiques. Les résultats obtenus montrent clairement que ces isolats appartiennent au genre *Azospirillum,* pour confirmer ces résultats une étude moléculaire a été effectuée afin de séquencer le gène 16S rDNA. L'arbre phylogénétique obtenu regroupe 6 souches dans le même groupe proche d'*Azospirillum brasilense*.

Notre étude a consisté ensuite à mettre en évidence les effets de l'inoculation de blé dur avec *Azospirillum brasilense* dans des conditions contrôlé sous serre. Les résultats obtenus montrent l'importance d'*A.brasilense* dans la formation des paranodules et dans la croissance de la partie racinaire et la partie aérienne de blé dur.

Par la suite, l'inoculation de blé dur avec l'actinomycète *Frankia CcI3* a permis de montrer ces effets bénéfiques sur la croissance racinaire ainsi que sur la formation des paranodules considérés comme sièges de la fixation d'azote atmosphérique.

D'autres études sur deux variétés de blé dur (GTA/DUR et WAHA) en présence d`un déficit hydrique (12% de CC) ont montré également la capacité des PGPR (*Azospirillum brasilense*, *Bacillus sp*. et *Frankia CcI3*) a restaurer leur croissance.

Mots clés : PGPR, Blé dur, *Azospirillum brasilense, Frankia CcI3,* Paranodules, Déficit hydrique

SOMMAIRE

Index des figures……. vi
Index des tableaux……... vii
Abréviation……. viii

Introduction…… 09
Partie bibliographique…….. 12
1. Les céréales : le blé……... 13
1.1. La culture de blé dur (*Triticum durum* Desf.)…… 13
1.2. Botanique…….. 13
1.3. Le blé en Algérie…….. 13
1.4. Les Problèmes de production…… 15
1.5. Les Solutions pour améliorer la production de blé……. 16
2. Stimulation de la croissance des plantes par les PGPR…… . 16
2.1. Les PGPR……. 17
2.2. Quelques bactéries PGPR……..... 22
2.3. Mode d'action des PGPR……. 24
2.4. Les effets phytobénéfiques directs d'Azospirillum……. 25
2.5. Les effets phytobénéfiques indirects d'Azospirillum…… 28
2.6. L'interaction fonctionnelle entre Azospirillum et les racines de la plante…….. 31
3. Méthodes d'études des interactions dans la rhizosphère…… 34
3.1. Le partenaire Végétal…… 34
3.2. Etude de la diversité des microorganismes rhizosphériques……..... 35
3.3. Visualisation des interactions rhizosphériques……... 38
3.4. Techniques de microscopie et interactions rhizosphériques……... 38
4. L'importance des PGPR dans l'acquisition des plantes d'une tolérance aux stress biotique et abiotique…… 39
4.1. Le rôle des bactéries dans la tolérance des plantes aux stress…… 39
4.2. Tolérance aux stress abiotiques induite par des bactéries bénéfiques……. ……. 40
4.3. Résistance aux pathogènes induite par des bactéries bénéfiques (Bio-contrôle)…… 41
4.4. Modes de vie interchangeables et concepts insuffisants…… 42
4.5. L'activité ACC désaminase……..... 43
4.6. Les perspectives d'avenir……..... 44
5. Les biofertilisants : rôle et production……. 45
5.1. Biofertilisants…… 45
5.2. Quelques rhizobactéries utilisées comme biofertilisant…… 45
5.3. Autre microorganisme considéré comme biofertilisant……... 46
5.4. Les différents supports…….. 46
5.5. L'encapsulation des rhizobactéries……..... 48
5.6. Commercialisation des biofertilisants……. 50

Objectif de travail…… 51

Partie expérimentale…… 54
Matériels et méthodes……55
Résultats……69

CHAPITRE I: Phenotypic and molecular characterization of Plant growth promoting Rhizobacteria isolated from the rhizosphere of wheat (Triticum durum Desf.) in Algeria

1. Problématique……. 71
2. Publication et Principaux résultats…… 72

CHAPITRE II: Effect of 2, 4-Dichlorophenoxyacetate on the formation of paranodules root in durum wheat (Triticum durum Desf.) inoculated with Azospirillum brasilense isolated in rhizosphere of wheat in Algeria

1. Problématique……. 86
2. Publication et Principaux résultats…… 87

CHAPITRE III: Study of root para-nodules formation in wheat (Triticum durum Desf.) inoculated with Frankia strain CcI3 and treated with 2,4-dichlorophenoxyacetat (2,4-D)

1. Problématique……. 96
2. Publication et Principaux résultats…… 104

CHAPITRE IV : Effet de l'inoculation de blé dur (Triticum durum Desf.) avec les PGPR (Azospirillum brasilense, Bacillus sp. et Frankia CcI3) et tolérance au déficit hydrique

1. Problématique……. 110
2. Résultats et Discussion……..... 111
3. Conclusion……. 132

Discussion Générale et Perspectives…… 134

CHAPITRE V : Valorisation de travail de thèse ; initiation à la production des biofertilisants

1. Problématique…… 140
2. Matériels et méthodes…… 141
3. Résultats et discussion…… 142
4. Conclusion……. 144

Références Bibliographiques…… 147

Annexe…….. 165

INDEX DES FIGURES

Numéro

Figure 1 : Les mécanismes d'action des rhizobactéries.
Figure 2 : Les différents Rôle des PGPR.
Figure 3 : L'inoculation avec l'Azospirillum stimule la croissance des racines de maïs
Figure 4 : Le système immunitaire des plantes en interaction avec des microbes.
Figure 5 : La structure chimique de l`ACC.
Figure 6: Le mécanisme de réduction du taux élevé d`éthylène by ACC+ produit par les bactéries.
Figure 7 : Les principaux supports utilisés pour l'inoculation de rhizobactéries dans le sol : la tourbe (A), le talc (B), l'argile (C) et la vermiculite (D).
Figure 08 : Courbe étalon du dosage de la proline.
Figure 09 : Courbe étalon du dosage des sucres solubles.
Figure. 10 : Variation de la teneur relative en eau des plantes témoins et plantes inoculées (A.brasilense, Bacillus.sp et Frankia CcI3) de blé dur (GTA/DUR, WAHA) sous condition de stress hydrique
Figure 11 : Variation de Résistance stomatique des plantes témoins et plantes inoculées (A.brasilense, Bacillus.sp et Frankia CcI3) de blé dur (GTA/DUR, WAHA) sous condition de stress hydrique.
Figure 12 : Variation de la teneur en proline des plantes témoins et plantes inoculées (A.brasilense, Bacillus.sp et Frankia CcI3) de blé dur (GTA/DUR, WAHA) sous condition de stress hydrique.
Figure 13 : Variation de la fluorescence chlorophyllienne des plantes témoins et plantes inoculées (A.brasilense, Bacillus.sp et Frankia CcI3) de blé dur (GTA/DUR, WAHA) sous condition de stress hydrique.
Figure 14 : Variation de la chlorophylle totale des plantes témoins et plantes inoculées (A.brasilense, Bacillus.sp et Frankia CcI3) de blé dur (GTA/DUR, WAHA) sous condition de stress hydrique.
Figure 15 : Variation de la teneur en sucre soluble des plantes témoins et plantes inoculées (A.brasilense, Bacillus.sp et Frankia CcI3) de blé dur (GTA/DUR, WAHA) sous condition de stress hydrique.
Figure 16 : La longueur racinaire chez le blé dur (Triticum durum Desf)
Figure 17 : Effet de l'ACC désaminase sur la longueur racinaire de blé dur (Triticum durum Desf)
Figure 18 : Profil électrophorétique SDS-PAGE des protéines totales des feuilles de blé dur (GTA) sous condition de stress hydrique
Figure 19 : Profil électrophorétique SDS-PAGE des protéines totales des feuilles de blé dur (WAHA) sous condition de stress hydrique
Figure 20 : Profil électrophorétique SDS-PAGE des protéines totales des racines de blé dur (GTA) sous condition de stress hydrique
Figure 21 : Profil électrophorétique SDS-PAGE des protéines totales des racines de blé dur (WAHA) sous condition de stress hydrique
Figure 22 : L'efficacité des deux substrats pour la conservation des rhizobactéries

INDEX DES TABLEAUX

Numéro

Tableau 1 : La famille des Gaminés

Tableau 2 : Surface, production et importation des céréales en Algérie de septembre 2003 jusqu'en mai 2012

Tableau 3 : Quelques bactéries endophytes associatives

Tableau 4: L'augmentation de la croissance des plantes et la protection aux maladies par les rhizobactéries

Tableau 5 : Les moyennes des variables de la teneur relative en eau et leurs groupes homogènes

Tableau 6 : Les moyennes des variables du potentiel osmotique et leurs groupes homogènes

Tableau 7 : Les moyennes des variables de la résistance stomatique et leurs groupes homogènes

Tableau 8 : Les moyennes des variables de la teneur en proline et leurs groupes homogènes

Tableau 9 : Les moyennes des variables de la Fluorescence chlorophyllienne et leurs groupes homogènes.

Tableau 10 : Les moyennes des variables de la teneur en chlorophylle total et leurs groupes homogènes.

Tableau 11 : Les moyennes des variables de la teneur en sucre soluble et leurs groupes homogènes

Tableau 12 : Les moyennes des variables de la longueur racinaire et leurs groupes homogènes.

Tableau 13: L'ensemble des souches qui ont été utilisées pour ce travail

Tableau 14 : Test d`inoculation sur les deux substrats (Talc et Café) suivit d`un test de viabilité sur le milieu LB

ABREVIATIONS

2,4-D : 2,4-Dichlorophenoxyacetate

ABA : Acid abscissique

ACC : 1-AminoCyclopropane-1-Carboxylate

AIA : Indole-3-Acetique

ARDRA : Amplified Rhisomal DNA Restriction Analysis

CC : Capacité au Champ.

Do : Densité optique.

ITGC : Institut Technique des Grandes Cultures.

IST : Induced Systemic Tolerance

ISR : Induced Systemic Resistance

GFP : Green Florescent Protein

MPa : MegaPascal.

PHB : Poly-Hydroxy-Butyrate

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PM : Poids Moléculaire.

Rs : Résistance stomatique.

SAR: Systemic Acquired Resistance

SDS-PAGE : Sodium Dodécylsulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

WGA : Wheat Germ Agglutinin

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le blé, le riz et le maïs sont les céréales les plus importantes dans le monde entier. Le blé fournit plus de calories et de protéines dans le régime que n'importe quelle autre céréale (Susana *et al*., 2008). En Algérie, le blé est l'une des récoltes les plus importantes, plusieurs hectares sont employés pour sa plantation. Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) est la première céréale cultivée en Algérie elle occupe environ 2 millions d'hectares (Susana *et al*., 2008)

La production de blé en Algérie pour la compagne 2004/2005 a été de l'ordre de 2 600 000 T alors que la demande annuelle dépasse largement 6000 000 T .Selon les derniers chiffres donnés par l'ITGC dans la compagne 2011/2012, la production céréalière s'est établie à 51,3 millions de quintaux dont plus de 58% en blé dur.

La plupart des travaux de recherche effectués sur le blé dur ont eu durant de nombreuses années pour objectif principal l'augmentation de la productivité, une approche basée essentiellement sur les performances agronomiques. Ces dernières années, un intérêt plus croissant a été porté sur les études qui concernent l'amélioration génétique de la tolérance au stress hydrique dans les programmes d'amélioration du blé.

Cependant, la production nationale ne répond pas au besoin de la population étant donné le faible rendement ce qui classe l'Algérie comme l'un des plus importants pays importateurs des céréales. Ceci est dû essentiellement à la dégradation du sol qui représente une menace pour la survie à long terme de la production agricole. En plus, la culture du blé nécessite des apports importants en engrais azotés, ce qui favorise la contamination des nappes souterraines.

Actuellement, plusieurs recherches ont utilisé d`autres méthodes pour améliorer la production de blé, parmi lesquelles une approche basée sur l'utilisation de microorganismes principalement dans des programmes d`amélioration de la production de blé.

Ces rhizobactéries peuvent stimuler le développement du système racinaire ainsi la nodulation et favoriser la nutrition minérale de la plante notamment par la fixation biologique d`azote atmosphérique (Dilfusa et Gisela, 2002). Ces rhizobactéries dites PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) peuvent diminuer les doses d'engrais, d'où l'importance de comprendre l'aptitude des variétés de blé à interagir avec les PGPR et à bénéficier de leurs rôles (Niranjan *et al* ., 2005).

Plusieurs recherches ont montré que les PGPR ont des effets bénéfiques sur les plantes, ces rhizobactéries peuvent procurer à la plante l'azote sous forme d'ammonium par leurs associations avec le blé (Kennedy *et al*. ,2006 ; Ficher *et al.*, 2007). De plus, ces PGPR peuvent aussi synthétiser les hormones de croissances (phytohormones) pour stimuler la croissance de la racine et aussi la plante (Baca et Elmerich, 2007).

De nombreux travaux ont montré que ces rhizobactéries interviennent dans le bio-contrôle de la plante par la diminution des effets délétères des phytopathogènes en synthétisant des antibiotiques spécifiques (Fischer *et al.*, 2009). D'autre part, Arzanech et ces collaborateurs (2011) ont montré l'importance que peuvent jouer des *Azospirillum* spp. dans la tolérance du blé tendre face au stress hydrique, ainsi que leur capacité à augmenter la biomasse et la croissance racinaire.

C'est dans cette optique que le travail de thèse effectué a consisté à caractériser au niveau phénotypique et moléculaire des rhizobactéries pour sélectionner parmi celle-ci la souche la plus prometteuse *(Azospirillum brasilense)* et a l`inoculer au blé dur afin de mesurer leur capacité à agir en tant que PGPR dans le but de répondre aux besoins d'augmentation de production et de tolérance face au déficit hydrique du blé dur.

La synthèse bibliographique de ce manuscrit s'articule autour de cinq points reprenant l'état de l'art et résumant la majorité des connaissances actuelles sur le blé dur, les PGPR et leur interaction :

- Le premier point reprend les données relatives aux céréales : blé dur (*Triticum durum* Desf.);
- Le second point s'intéresse à la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR (Genre *Azospirillum*) ;
- Le troisième point définie les méthodes d'études utilisées pour visualiser les interactions au niveau rhizosphérique sur le plan phénotypique et moléculaire ;
- Le quatrième point quant à lui s`intéresse à l`acquisition des plantes d'une tolérance aux stress biotique et/ou abiotique via l`inoculation par les PGPR ;
- Enfin le cinquième et dernier point concerne la valorisation des travaux de thèse par un essai de production des biofertilisants ceci par l'utilisation des supports de conservation des rhizobactéries.

Ce manuscrit reprend la plupart des données liées au PGPR et leur plantes hôtes. En revanche, certaines parties seront centrées tout particulièrement autours d'*Azospirillum* et le blé dur qui sont au centre des travaux de cette thèse.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les céréales

1.1. La culture de blé dur (*Triticum durum* Desf.)

Les blés cultivés en Algérie se rapportent à deux espèces principales : blé dur (*Triticum durum* Desf.), qui sert à la fabrication des semoules, du couscous et des pâtes alimentaires, et le blé tendre (*Triticum eastivum* L.) dont le grain est utilisé pour la fabrication de la farine et du pain.

1.2. Botanique

1.2.1. Origine

Le blé est l'une des premières espèces cueillies et cultivées par l'homme au proche Orient, il y a environ 10.000 à 15.000 ans avant J.C .Des restes de blé diploïde et tétraploïde ont été découverte sur des sites archéologiques au proche Orient d'après Harlan (1975) et on croix que le blé dur provient des territoires de la Turquie, la Syrie, l'Iraq et l'Iran (Oudjani, 2009).

1.2.2. Classification taxonomique

Le blé appartient à la famille des gaminés, et sa position taxonomique est présentée dans le tableau 1 *(Feillet, 2000).*

Tableau 1 : La famille des Graminées (Feillet, 2000)

	Blé dur	Blé tendre
Famille	Gramineae	Gramineae
Sous-famille	Festucoideae	Festucoideae
Tribu	Triticeae	Triticeae
Sous-tribu	Triticineae	Triticineae
Genre	Triticum	Triticum
Espèce	Triticum durum sp.	Triticum aestivum sp.

1.3. Blé en Algérie

1.3.1. Consommation

Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en développement, particulièrement dans les pays maghrébins, notamment en Algérie.

En Algérie, les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. Effectivement, 54% des apports énergétiques et 62% des apports protéiques journaliers provenaient de ces produits et le blé représentait 88% de ces céréales consommées. L'Algérie se situe ainsi au premier rang mondial pour la consommation de blé (Kellou, 2008).

Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) est la première céréale cultivée en Algérie. Elle occupe environ 2 millions d'hectares.

1.3.2. Production

La production des céréales est très irrégulière, elle est fortement dépendante des conditions climatiques. Cela se traduit d'une année à l'autre par des variations importantes de la superficie agricole utile, de la production et du rendement (Djermoune, 2009). Le blé occupe une place importante dans la production agricole et constitue la nourriture de base pour 35% de la production mondiale. Les quatre pays de l'Afrique du nord, soit l'Algérie, le Maroc, la Tunisie et la Libye, forment le plus grand marché d'importation de blé dur du monde (Mebarkia *et al.,* 2012).

Selon les derniers chiffres donnés par l'ITGC dans la compagne 2011/2012, la production céréalière s'est établie à 51,3 millions de quintaux dont plus de 58% en blé dur (Tableau 2)

Cependant, Les besoins nationaux en matière de céréales sont estimés à 80 millions de quintaux/an, ce qui classe l'Algérie comme l'un des plus importants pays importateurs de céréales.

1.3.3. Rendement

Bien que le calcul des rendements ne prenne en compte que les surfaces récoltées, on le trouve faible et surtout très aléatoire.

Comparativement à la moyenne mondiale, qui est de 29 Qx/Ha pour 2004, le rendement de blé algérien n'est que pour les meilleures années 50 % de la moyenne mondiale. Il est en moyenne de 10,5 Qx/Ha, il est parmi les plus faibles au monde.

1.3.4. Apport en engrais

Les engrais sont des substances, le plus souvent des mélanges d'éléments minéraux, destinées à apporter aux plantes des compléments d'éléments nutritifs, de façon à améliorer leur croissance, et à augmenter le rendement et la qualité des cultures. Selon les données collectées pour la période 1983-91, les engrais les plus utilisés sont l'ammoniac puis les engrais NPK, PK

et DAP sont d'usage aléatoire. Pour des raisons de disponibilité sur le marché et d'autres raisons dont le prix et le transport.

L'engrais azoté reste le plus utilisé, probablement pour son effet instantané et remarquable sur les cultures de céréales et dont l'impact sur la culture est mesurable (visible), à l'inverse des autres engrais dont l'effet sur les cultures n'est pas apparent.

Les besoins de blé en azote varient de 30 à 100 Kg/Ha et cela en fonction de la pluviosité (Service de la gestion des terres et de la nutrition des plantes 2005).

Tableau 2 : Surface, production et importation des céréales en Algérie de septembre 2003 jusqu'en mai 2012 (Bova, 2012)

Saisons (par année)	03/04	04/05	05/06	06/07	07/08	08/09	09/10	10/11	11/12
Surface (en mha)	2,9	3,0	2,6	2,7	2,9	1,5	3,2	3,3	3,1
Production (en mt)	4,3	4,0	3,5	4,0	4,3	1,7	6,1	4,7	4,3
Importation (en mt)	5,9	7,3	7,6	7,5	7,7	8,9	7,5	9,1	9,8

1.4. Problème de production

L'agriculture algérienne est structurellement inapte à satisfaire une demande de blé de plus en plus importante, ce qui a classé l'Algérie en 2008 au quatrième rang au monde des pays importateurs de blé, après l'Europe, le Brésil et l'Egypte.

La faiblesse relative des niveaux de rendement, trouve son explication dans deux raisons principales: l'une climatique et l'autre agronomique.

1.4.1. Problèmes climatiques

L'Algérie présente un climat de type méditerranéen caractérisé par une longue période de sécheresse, et l'irrégularité pluviométrique (Température, la pluviométrie, le vent, l'humidité).

1.4.2 .Problèmes agronomiques

Les problèmes agronomiques sont essentiellement techniques rapportant à une mauvaise préparation du sol avec des outils inadaptés qui ont pour effet de diluer la matière organique et les éléments minéraux. Un autre problème qui est aussi important que le premier c`est la pauvreté du sol (Carence en azote N, en phosphore P et en potassium K), ce qui nécessite l`utilisation des engrais. Cette situation a obligé l'Algérie à se tourner vers les importations afin de combler la faible production.

1.5. Solution pour améliorer la production de blé dur

La production de blé dur en Algérie ne parvient pas à satisfaire la demande des consommateurs en forte augmentation ce qui conduit à des importations régulières.

Il devient donc important de développer différentes méthodes biologiques par l'utilisation des organismes naturels pour améliorer les performances de blé en termes de rendements, de qualité boulangère et de valeur nutritionnelle.

Parmi les solutions utilisées on trouve les souches bactériennes qui sont capables d'augmenter le rendement et d'améliorer la qualité des cultures. On les appelle « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » ou PGPR. Leurs caractères interviennent à plusieurs niveaux du développement végétal (au niveau racinaire et aérien).

L'utilisation des PGPR en agriculture peut permettre de stimuler la croissance des plantes et de contourner leurs pathogènes (Beauchamp, 1993). De plus, en formant des symbioses, les PGPR augmentent la capacité des plantes à se nourrir en développant leur système racinaire.

2. Stimulation de la croissance des plantes par les PGPR

La rhizosphère est le lieu de multiples interactions entre microorganismes et racine, ces interactions étant bénéfiques, nuisibles, ou neutre pour la plante (Bais *et al.*, 2006). Certains microorganismes naturellement présents dans les sols sont bénéfiques pour la plante, ce qui améliore souvent la croissance végétale (Morgan *et al*., 2005). Ces microorganismes phytobénéfiques sont de deux types :

A. Ceux qui établissent une relation de symbiose (association à bénéfices réciproques) véritable avec la plante, avec comme exemples types :

- La symbiose entre certains champignons du sol et la plupart des espèces végétales (Smith et Read, 1997). Elle conduit à une différenciation du partenaire fongique, notamment pour les symbioses endo- et ecto-mycorhizienne. Cette symbiose améliore principalement la nutrition (phosphatée et azotée) de la plante, ainsi que sa capacité à résister au stress (dessiccation du sol, présence de métaux lourds en quantité importante) (Barea *et al*., 2002).

- La symbiose fixatrice d'azote entre l'α-protéobacteria *Rhizobium* (ainsi qu'une grande partie des autres rhizobiacées et quelques β-protéobacteria) en association avec les légumineuses (Long, 1996), ou entre l'actinobactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes (Huguet et *al*., 2005). Cette symbiose implique la formation de structures spécialisées au niveau des racines de la plante (les nodosités- Gage, 2004). Elle améliore de manière très significative la nutrition azotée du partenaire végétal.

B.Ceux qui restent à l'état libre dans le sol, souvent proches ou sur les racines, et parfois localisées à l'intérieur des racines (endophytes) (Gray et Smith, 2005), et qui établissent une relation facultative à bénéfices réciproques appelée coopération ou symbiose associative .Les bactéries PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) font partie de ce type de microorganismes, car elles n'établissent pas une relation de symbiose (mutualiste), mais favorisent la croissance des plantes auxquelles elles sont associées.

2.1. Les PGPR

Les PGPR ou «Plant Growth-Promoting Rhizobacteria » sont des bactérie qui se développent dans la rhizosphère, et qui ont un effet positif sur la plante, pour ces effet on les considère comme rhizobactéries promotrice de la croissance végétale (Dey *et al*., 2004 ; Herman *et al.*, 2008 ; Microrsky, 2008). Ces bactéries sont utilisées en agriculture pour la biofertilisation des sols (Glick, 1995) en fixant l'azote atmosphérique qui pourra être par la suite utilisé par les plantes, améliorant leur croissance lorsque l'azote du sol est limitant.

La fixation biologique de l'azote, joue un rôle majeur dans le cycle de l'azote. Les bactéries fixatrices d'azote possèdent un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, qui assure la réduction de l'azote moléculaire en ammoniaque (Glick, 1995). Ces bactéries présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux. Elles peuvent induire la croissance des plantes par la promotion directe ou indirecte (Verma *et al.,* 2010).

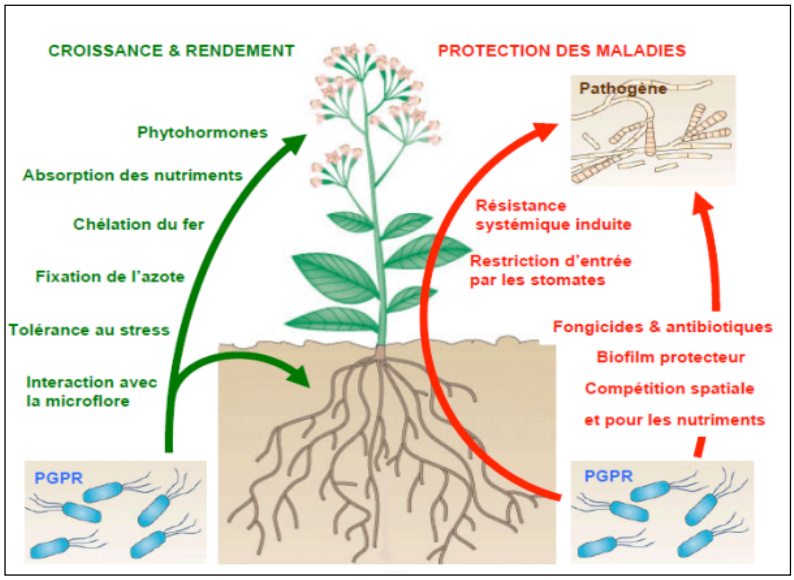


Figure 1 : Les mécanismes d'action des rhizobactéries (Ramos *et al.,* 2009).

Les bactéries PGPR peuvent avoir un impact positif sur les plantes de manière directe ou indirecte (Figure. 1). L'effet phytobénéfiques direct des bactéries PGPR peut correspondre à (i) une augmentation de la qualité de nutriments disponibles (fixation libre de l'azote, solubilisation du phosphate, etc.) (Dobbelaere *et al*., 2003), (ii) une augmentation de la micro-structuration du sol rhizosphérique qui retient alors mieux l'eau ,(iii) une modification de l'équilibre hormonal de la plante (production de phytohormones, désamination du précurseur de l'éthylène, etc.) (Glick *et al*., 1998 ; Dobbelaere *et al*., 2003), et (iv) l'induction d'une réponse systémique chez la plante, de type **ISR** (***I**nduced **S**ystemic **R**esistance*) ou plus rarement **SAR** (***S**ystemic **A**cquired **R**esistance*).

2.1.1. La promotion directe

Ce mécanisme comprend la stimulation bactérienne des phytohormones (auxine ou cytokinine). Cela permet à la plante de développer un système racinaire abondant lui permettant notamment de coloniser une plus grande surface de sol, et améliorer l'état nutritionnel des plantes (Beauchamp, 1993; Kloepper, 1993, Ramos *et al.,* 2009) (Figure 1).

2.1.2. La promotion indirecte

Ce mécanisme repose sur la capacité des PGPR à réduire les effets nocifs pour la plante : la dégradation des xénobiotique dans les sols contaminés par la production des métabolites qui sont toxique aux pathogènes du sol, et l'hydrolyse des molécules libérées par des agents pathogènes par exemple les *Pseudomonas*, qui sont capables de décomposer l'acide fusarique (un composé responsable de la pourriture des racines causée par les champignons) (Ramos *et al*., 2009) (Figure 1).

L'effet phytobénéfiques indirect des bactéries PGPR résulte d'interactions entre PGPR et des pathogènes et/ou parasites de la plante, à l'occasion desquelles les effets négatifs de ces derniers sont diminués (Ramette *et al*., 2006 ; Rezzonico *et al*., 2007). Ces interactions correspondent souvent à de la compétition ou de l'antagonisme (Bally et Elmerich, 2007)

2.1.3. Rôles des PGPR

Certaines souches de PGPR des genres *Pseudomonas, Bacillus, Azospirillum, Rhizobium* ont récemment été décrites pour leur effet direct positif sur la croissance des plantes et l´augmentation du rendement de la culture (Vessey, 2003). Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par divers mécanismes (Figure 2).

A. La fixation d'azote (N_2)

Le sol contient de nombreuses espèces de bactéries pouvant transformer l'azote atmosphérique en ammoniac. Plusieurs de ces microorganismes vivent à la surface des racines des plantes ou même dans les tissus de certains végétaux. L'ammoniac est rapidement transformé en nitrates par les bactéries du sol.

B. La résistance aux pathogènes du sol

Certaines souches de PGPR ont la capacité d´excréter des métabolites actifs contre différentes bactéries et champignons. Certaines de ces molécules sont de véritables antibiotiques, qui jouent un rôle important dans l´inactivation des facteurs de germination du pathogène ou la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines.

C. La croissance racinaire

Certaines bactéries ont la capacité de produire des substances (régulateurs de la croissance végétale) comme l'AIA, les cytokinines et d'autres, ces régulateurs permettent à la plante de développer un système racinaire (Augmentation du diamètre et de la longueur des racines)

Tableau 3 : Quelques bactéries endophytes associatives (Bally et Elmerich, 2007)

Endophyte associative	*Plante hôte*	Organe (s) colonisé(s)	*Référence*
Azospirillum			
A. amazonense	*Saccharum officina*	Racine, tige et feuilles	Magalhaes et *al.*, 1983
A. brasilense	Blé, Sorgho, Maïs	Racine et tige	Tarrand et *al.*, 1978; Baldani et Döbereiner, 1980; Fallik et *al.*, 1996
A. lipoferum	Blé, Sorgho, Maïs	Racine et tige	Tarrand et *al.*, 1978; Baldani et Döbereiner, 1980; Fallik et *al.*, 1996;
A. halopraeference	*Leptochloa fusca*	racine	Reinhold et *al.*, 1987
Azoarcus sp. BH72	Riz (*Oryza sativa* L) *Leptochloa fusca*	Racine	Hurek et *al.*, 1987b; Reinhold-Hurek, 1993; Egener et *al.*, 1999
Bacillus			
B. endophyticus sp.	*Gossypium* sp	Racine	Misaghi et Donndelinger, 1990; Reva et *al.*, 2002
Bacillus sp	Cotonnier, Epinette (*Picea abies*), Raisin, Petits pois	Racine, tige et feuilles	Misaghi et Donndelinger, 1990, Bell et *al.*, 1995; Hallaksela et *al.*, 1991; Huang et *al.*, 1993; Shishido et *al.*, 1999
Beijerinkia *indica*	Canne à sucre	racine	Döbereiner et *al.*, 1972a
Burkholderia			
B. brasilensis	Banane (*Musa* spp.)	Tige	Baldani et *al.*, 1997; Cruz et *al.*, 2001
B. cepacia	*Lupinus luteus, maïs*	Racine, xylème	Barac et *al.*, 2004; Di Cello et *al.*, 1997
Burkholderia sp. (PsJN)	*Vitis vinifera*	Racine, tige et feuille	Compant et *al.*, 2005
B. tropicalis	*Ananas comosus* L.	Tige et fruit	Baldani et al., 1997; Cruz et al., 2001
Gluconacetobacter*			
G. dazotrophicus	Cane à sucre Cafetier	Racine, tige et feuilles	Gillis et *al.*, 1989; James et *al.*, 1994; Reis et *al.*, 1994; Jimenez-Salgado et *al.*, 1997
Herbaspirillum			
H. seropedicae	Cane à sucre, Riz, Sorgho, Banane (*Musa* spp.)	Racine, xylème, feuilles et fruit	Baldani et *al.*, 1986; Boddey et *al.*, 1995; James et *al.*, 1997; Cruz et *al.*, 2001; Weber et *al.*, 1999
H. rubrisubalcans	Banane (*Musa* spp.), et (*Ananas comosus* L.)	Racine, tige, feuille et fruit	Cruz et *al.*, 2001 ; Weber et *al.*, 1999
Pseudomonas *sp PsJN*	*Vitis vinifera*	racine	Bark et *al.*, 2002
Serratia			
Serratia phymuthica	*Cucumis sativa* L	racine	Benhamou et *al.*, 2000
Serratia marcescens	Oriza sativa L.	racine	Gyaneshwar et *al.*, 2001

* *Gluconacetobacter* (syn= *Acetobacter*)

D. L'amélioration de la qualité du sol

Les microorganismes du sol décomposent la matière organique soluble et insoluble et libèrent ensuite des éléments minéraux disponibles pour les plantes**.**

E. Induction de l'immunité

Certaines PGPR peuvent stimuler le système immunitaire des plantes et leur permettre une résistance contre certains virus, les champignons et même les bactéries pathogènes. Le phénomène est désigné ISR (Induced Systemic Resistance) ou résistance systémique induite.

F. Augmentation de la biodisponibilité de certains éléments essentiels

Certaines PGPR produisent des sidérophores permettant la chélation du fer pour être ensuite absorbé par la plante ou une enzyme de type phytase permettant la solubilisation des phosphates.

G. Tolérance aux stress

Certaines PGPR produisent des enzymes ACC désaminase (1-aminocylopropane-1-carboxylate), qui facilitent le développement des plantes en réduisant leur production d'éthylène (Hydrocarbure gazeux incolore). Les PGPR produisant cet enzyme peuvent ainsi soulager la plante de plusieurs stress causés par des infections, l'absorption de métaux lourds, une salinité élevée et même la sécheresse (Macking, 2007).

L'ensemble de ces activités fait des PGPR une alternative biologique et écologique intéressante à considérer par rapport aux différents produits chimiques de synthèse existants.

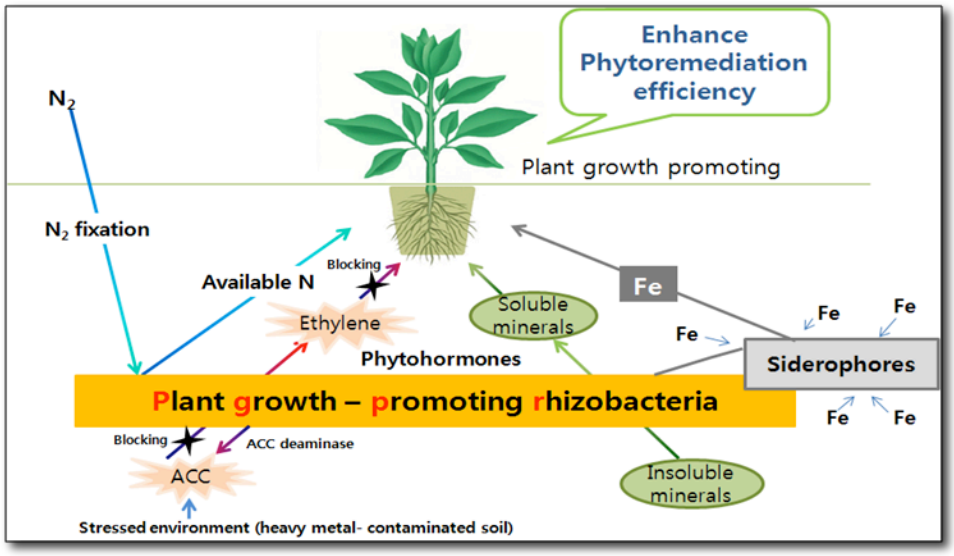


Figure 2 : Les différents Rôle des PGPR (Macking,2007)

2.2. Quelques bactéries PGPR

2.2.1. Les bactéries du genre Azospirillum

Azospirillum est une bactérie mobile, à Gram négatif, appartenant à l'ordre des *Rhodospirillales*, associée avec les racines des monocotylédones, notamment des cultures importantes comme le blé, le maïs et le riz. Plusieurs souches d'*Azospirillum* ont montré des effets bénéfiques sur la croissance des plantes et sur le rendement des cultures, en serre ou dans des essais au champ, sous divers sols et diverses conditions climatiques, et sont donc qualifiées de Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). Elles peuvent établir une symbiose associative avec les céréales (Bashan *et al.,* 2004).

L'association entre *Azospirillum* et la plante produit des changements morphologiques et physiologiques dans les racines. La bactérie produit des hormones de croissance, l'acide indole-3 acétique (AIA), qui favorise l'augmentation de la surface des racines, entrainant une augmentation de l'absorption de l'eau et des minéraux. De plus cette association permet la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (jusqu'à 50 kg de N/ha/ans) ce qui favorise la croissance et le rendement des cultures (Bashan *et al.,* 2004).

Les Azospirillum se fixent à la surface des racines, dans la zone d'élongation, ou au niveau des poils absorbants. Cette fixation implique une synthèse des polysaccharides de la capsule par des lectines (glycoprotéines) de la plante et s'accomplie en deux étapes. Il y a d'abord attachement réversible à la surface de l'hôte par les flagelles, puis ancrage définitif par les exopolysaccharides. *Les Azospirillum* demeurent dans la couche mucilagineuse qui recouvre la surface des racines, ou s'enfoncent dans les assises corticales. Ils possèdent des enzymes pectonilytique qui leurs permettent de pénétrer dans les lamelles moyenne des cellules et de descendre, parfois jusqu'à l'endoderme. Des substances de croissance directement produites par les bactéries, modifient l'aspect du système racinaire (Bashan *et al.,* 2004) (Tableau 3).

2.2.2. Les bactéries du genre Pseudomonas

Les *Pseudomonas* appartiennent au phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, ordre des *Pseudomonales*. Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0,5 µm (Palleroni, 1984).

Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche ou multitriche, elles sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie. Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes, elles sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes (Höfte et de Vos, 2006), ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et par conséquence, leur croissance (Reyes *et al.,* 2004) (Tableau 3).

2.2.3. Les bactéries du genre Rhizobium

Les rhizobiums, ou rhizobia, sont des bactéries aérobies du sol appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* (Sahgal et Johri, 2006).

Ces bactéries sont capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec des plantes de la famille des légumineuses. Cette symbiose se traduit par la formation sur les racines de la plante hôte des nodules (nodosités). Les nodosités sont le lieu d'une activité symbiotique : la plante fournit les substances carbonées aux bactéries, et les bactéries fournissent à la plante les substances azotées synthétisées à partir de l'azote atmosphérique (Downie, 2005). Le processus de la fixation symbiotique d'azote aide la plante à survivre et à rivaliser efficacement sur les sols pauvres en azote.

Akhtar et Siddiqui, (2009) ont montré que l'inoculation par *Rhizobium* sp. entraîne une augmentation dans la croissance, le rendement et le nombre de nodules formé au niveau des racines par rapport aux plantes sans inoculation. En plus de leur activité bénéfique de fixation d'azote avec les légumineuses, les *Rhizobium* peuvent améliorer la nutrition des plantes par la mobilisation du phosphate organiques et inorganiques (Tableau 3).

2.2.4. Les bactéries du genre Bacillus

Les *Bacillus* forment un genre de bactéries à gram positif, appartenant à la famille des bacillacées (*Bacillaceae*), l'ordre des bacillales (*Bacillales*), la classe des bacilles (*Bacilli*). Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables.

C'est le genre le plus abondant dans la rhizosphère, l'activité PGPR de certaines de ces souches a été connue depuis plusieurs années (Probanza *et al*., 2002). Elles sont potentiellement utiles comme agents de lutte biologique (Nagórska *et al*., 2007) et capables de solubiliser le phosphate , produire de l'AIA, séderophore et antifongique (Charest *et al*., 2005). Ces bactéries sont fréquemment retrouvées au voisinage des racines des plantes ou certaines espèces ont un rôle dans la fixation d'azote (Tableau 3).

2.2.5. L'actinomycète Frankia

Le microsymbiote *Frankia* est une bactérie gram-positive filamenteuse, et non un champignon comme le pensaient les microscopistes du XIXe siècle. Il s'agit plus précisément d'un actinomycète en raison de ses caractéristiques morphologiques et biochimique (Duhoux et Nicole, 2004). Contrairement aux bactéries fixatrices d'azote comme les *Rhizobium*, *Frankia* peut fixer l'azote atmosphérique à l'état libre (Pawlowski et Sprent, 2008).Elle a été détectée dans des sols dépourvus de plantes actinorhizienne (Wall, 2000).

En culture liquide, *Frankia* ce différencie en trois sortes de structures : les hyphes végétatifs, les sporanges et les diazovésicules. Les hyphes sont des filaments peu ramifiés de 0,5-2 mm de diamètre. Les diazovésicules et les sporanges sont portés par les hyphes. Les sporanges ont une taille de 10-40 mm, ils contiennent des milliers de spores (Svistoonoff, 2003).

Les plantes susceptibles d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec l'actinomycète du sol *Frankia* sont appelées plantes actinorhizienne, non légumineuses appartenant à 8 familles d'angiospermes (Hocher *et al.,* 2010). La symbiose actinorhizienne est comparable à la symbiose rhizobienne sur un certain nombre de niveaux, notamment dans la fixation de l'azote (Bélanger *et al.,* 2011).

2.3. Mode d'action des PGPR

Diverses souches de PGPR ont été utilisés avec succès pour les inoculations des cultures Celles-ci comprennent les membres bactériens du genre *Azospirillum* (Cassan *et al.*, 2008), *Bacillus* (Jacobsen et *al.,* 2004), *Pseudomonas* (Loper *et al*., 2007), *Rhizobium* (Long, 2001).

Ces bactéries sont connues pour s'associer avec les racines de blé, les graminées tropicales, le maïs, et d'autres céréales (Okon et Hadar, 1987; Lindberg et Granhall, 1984). Les *Azospirillum* spp. ont été identifiés principalement comme bactéries de la rhizosphère, et leur mécanisme de coloniser la rhizosphère a été étudié par divers chercheurs (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000).

L'association entre les plantes et les bactéries bénéfiques montrent une réponse protectrice sous conditions restrictives de l'environnement. Le blé soumis au stress salin a montré une croissance plus forte lorsqu'il est inoculé avec *Azospirillum*, par rapport aux plantes non-inoculées. Cet effet favorable peut être appliqué directement ou indirectement, sur la physiologie des plantes. La production des métabolites microbiens comme les polysaccharides modifie la structure du sol et présente un effet positif sur les plantes cultivées en stress hydrique.

L'inoculation peut favoriser l'allongement de la racine (Dobbelaere *et al*., 1999), le développement des racines latérales et adventives (Creus *et al*., 2005; Molina-Favero *et al*, 2008), les poils absorbants (Hadas et Okon, 1987) et la ramification des poils racinaires (Jain et Patriquin, 1985) (Figure 3). Ces réponses de développement de la morphologie racinaire sont déclenchées par des phytohormones synthétisées par les rhizobactéries.



(A) : Maïs Non inoculé



(B) : Maïs Inoculé

Figure 3 : L'inoculation avec l'Azospirillum stimule la croissance des racines de maïs

(Bally,2006)

2.4. Les effets phytobénéfiques directs d'*Azospirillum*

Cette partie fait la synthèse des connaissances de l'effet PGPR d'*Azospirillum* sur la croissance des plantes. Cette synthèse concerne principalement les effets directs de phytostimulation d'*Azospirillum*.

2.4.1. La fixation biologique de l'azote atmosphérique

Plusieurs genres bactériens ont été décrits comme étant capables de fixer l'azote atmosphérique, dans le sol et également lors de la symbiose associative avec la plante. En conditions de micro-anaérobie, ces bactéries convertissent l'azote atmosphérique en ammoniaque grâce à l'action de la nitrogénase. La nitrogénase est une enzyme complexe formée de deux sous-unités : la dinitrogénase qui est une protéine à fer et à molybdène (NifHDK) et la dinitrogénase réductase qui est une protéine à fer (NifH) et qui transfère les électrons d'un donneur à la nitrogénase (Burris et Roberts, 1993). Chez *Azospirillum*, ces gènes peuvent être soit chromosomiques, soit plasmidiques (Blaha *et al*., 2005).

La plupart des études concourent à démontrer que les niveaux d'azote fixé transférés vers la plante sont très faibles (Rao *et al*., 1998). Ce mécanisme semble moins efficace en comparaison avec la symbiose fixatrice d'azote ayant lieu dans les nodosités (Mylona *et al*.,1995). Ceci peut être imputé aux conditions d'anoxie partielle qui ne sont pas suffisantes pour un fonctionnement optimal de la nitrogénase, dont l'activité est inhibée en présence d'oxygène. Des fusions entre *nif*H et des gènes rapporteurs démontrent toutefois que ce gène est bien exprimé lors de l'association d'*Azospirillum* avec le blé (Vande Broek *et al*.,1993).

Wood *et al*., (2001) suggèrent que l'incapacité de la plante à libérer suffisamment de carbone dans la rhizosphère serait une contrainte importante dans le développement de symbioses associatives efficaces sur le plan de la fixation de l'azote. Cette hypothèse provient de l'observation qu'une addition de malate dans l'association in vitro entre *Azospirillum brasilense* et le blé provoque une augmentation de 48 fois la quantité d'azote fixé transférée au végétal. Des plantes sécrètent plus d'exsudats offrent donc une perspectives d'utilisation des symbioses associatives fixatrices d'azote dans des systèmes agricoles qui seraient plus autonomes vis-à-vis de la nutrition azotée.

2.4.2. La production de composés stimulant la croissance de la plante

La synthèse de substances stimulant la croissance de la plante a souvent été démontrée *in vitro* avec des cultures pures de nombreuses bactéries PGPR, mais également lors de l'association avec la plante. Ces substances correspondent principalement à des phytohormones.

A. Les phytohormones

Les phytohormones synthétisées par les PGPR (auxines, cytokinines, gibbérellines) sont des substances organiques connues pour influencer les processus physiologiques des plantes et agissent à très faibles concentrations. Elles sont chimiquement identiques ou analogues aux hormones synthétisées par les plantes. Etant donné que ces concentrations en signaux hormonaux régulent plusieurs processus physiologiques chez les végétaux, les modifications de concentrations en phytohormones peuvent conduire à des changements importants dans la croissance et le développement de la plante.

Dès 1979, la production par *A. brasilense* d'auxines et de substances similaires aux cytokinines et gibbérillines a été proposée pour expliquer son effet stimulateur sur la plante. Cette hypothèse provient de l'observation que l'apport à la plante d'un mélange d'acide indole-3-acétique (AIA), de kinétine et d'acide gibbérellique (GA_3) était équivalente à l'inoculation de la bactérie en ce qui concerne l'augmentation du nombre de poils absorbants et de racines latérales. Cette hypothèse a également été avancée pour expliquer que des mutants *Nif* exercent toujours un effet phytostimulateurs équivalent aux souches sauvages (Barbieri *et al*., 1986).

B. Les autres composés stimulateurs de la croissance de la plante

La biosynthèse de l'éthylène a été mise en évidence chez plusieurs souches d'*Azospirillum* (Perrig *et al*., 2007). Cette phytohormone gazeuse régule plusieurs processus importants chez les plantes, qui sont présentés dans la partie « 2.4.3. Synthèse d'enzymes pouvant moduler la croissance et le développement de la plante : la diminution de la concentration en éthylène ».

La production d'acide abscissique (ABA) par *Azospirillum* a également été décrite (Perrig *et al*., 2007). Aucun rôle de ces composés dans la stimulation de la croissance de la plante n'a toutefois été rapporté. Ces composés pourraient pourtant avoir un rôle important dans l'effet PGPR.

L'ABA est notamment connu pour induire la fermeture des stomates et pour être transporté dans toute la plante. Sa production par les bactéries rhizosphériques pourrait être extrêmement importante pour la croissance des plantes dans des milieux arides ou semi-arides.

2.4.3. Synthèse d'enzymes pouvant moduler la croissance et le développement de la plante : la diminution de la concentration en éthylène

L'éthylène est un régulateur de la croissance des plantes, connu pour son rôle dans le développement et la sénescence des plantes. En plus de son rôle dans la maturation des fruits, cette phytohormone gazeuse stimule la formation de racines adventives et des poils absorbants, favorise la germination par la levée de dormance des graines, et contrôle certains mécanismes systémiques de défense de la plante vis-à-vis des phytopathogènes (Abeles *et al*., 1992). Cependant, si la concentration en éthylène est trop élevée, l'élongation racinaire est inhibée chez plusieurs plantes (Abeles *et al*., 1992).

Il a été proposé que plusieurs bactéries PGPR puissent stimuler la croissance des plantes en réduisant les taux d'éthylène chez les plantes. Ceci est attribué à l'activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase qui hydrolyse l'ACC, le précurseur immédiat de l'éthylène chez les plantes (Walsh *et al*., 1981). Les produits de cette hydrolyse, l'ammonium et/ou l'α-cétobutyrate, peuvent être utilisés par la bactérie comme source d'azote et/ou de carbone (Klee *et al*., 1991). En consommant une partie de l'ACC végétal, les PGPR $AcdS^+$ diminueraient la synthèse d'éthylène par les racines, ce qui stimulerait la rhizogénèse (Glick *et al*.,1998).

L'activité ACC désaminase est fréquemment rencontrée chez les bactéries du sol ou celles colonisant les racines, y compris chez plusieurs souches d'*Azospirillum lipoferum* (Blaha *et al*., 2006). Le rôle de cette activité, codée par le gène acdS, dans l'effet phytostimulateurs n'est toutefois pas documenté dans le cas d'*Azospirillum*. Il a été démontré que les souches AcdS *A. brasilense* Cd et Ap 245 transformées avec un plasmide portant acdS sous la dépendance du promoteur lac augmentaient significativement la longueur du système racinaire de plants de tomate en comparaison avec les souches sauvages (Glick *et al*.,1998).

2.4.4. Augmentation de la disponibilité en éléments nutritifs et facilitation de la nutrition

Plusieurs expériences suggèrent qu'*Azospirillum* facilite l'accès aux éléments nutritifs nécessaires à la plante (Murty et Ladha, 1988). Il a été démontré que les plantes inoculées avec *Azospirillum* mobilisent les minéraux (K, N et P). Plusieurs explications ont été avancées. Il a été montré que l'inoculation avec *A. brasilense* Cd conduit à une augmentation de l'efflux de protons des racines de plantules de blé à une réduction du potentiel de membrane des cellules racinaires de plantules de soja *via* un signal bactérien restant à déterminer (Bashan *et al*.,1990 ; Bashan et Levanony, 1991).

Cette augmentation de l'efflux hors des cellules des racines provoquerait une acidification de la rhizosphère permettant ainsi une amélioration de la mobilisation de certains minéraux par les plantes. L'amélioration de la nutrition hydrique et minérale pourrait également s'expliquer comme étant la conséquence d'une augmentation du volume racinaire, qui se traduit par son effet négatif d'*Azospirillum* sur la colonisation des racines des plantes par les champignons mycorhiziens à arbuscules (Bashan *et al*.,1990).

2.5. Les effets phytobénéfiques indirects d'*Azospirillum*

Si l'effet d'*Azospirillum* s'explique principalement par des mécanismes directs, cette bactérie est également impliquée dans quelques mécanismes phytobénéfiques indirecte. Ainsi, les bactéries du genre *Azospirillum* pourrait être employées pour lutter contre certains phytopathogènes et phytoparasites.

Au niveau de la compétition, la synthèse de bactériocines et de sederophore a été mise en évidence chez différentes souches d*'Azospirillum* (Tapia-Hernandez *et al*., 2000). Les sederophore produits par une souche d*'A. lipoferum* montrent une activité antimicrobienne contre certaines souches bactériennes (appartenant à *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus* sp.) et fongiques (contre *Rhizoctonia* sp. et *Fusarium oxysporum*) (Tapia-Hernandez *et al*., 2000).

La co-inoculation *d'A. brasilense* Cd et du phytopathogènes *Pseudomonas syringae* pv.tomato (agent responsable de la maladie de la tache bactérienne) entraine une protection des plants de tomates contre la maladie (Bashan et de-Bashan, 2002). Dans ce cas, l'effet d'*Azospirillum* pourrait être dû à l'effet PGPR de la bactérie, et/ou par la compétition entre *Azospirillum* et le pathogène pour l`occupation des mêmes sites de colonisation racinaires. Cette bactérie a également été utilisée efficacement contre *Clavibacter michiganensis*, michiganensis, un autre phytopathogènes de la tomate (Bashan et de-Bashan, 2002).

Au niveau des interactions antagonistes, le traitement par *Azospirillum brasilense* Sp7 des sites de blessure de dicotylédones inhibe le développement de la galle du collet provoquée par *Agrobacterium tumefaciens*.

Les interactions antagonistes d'*Azospirillum* sont également connues vis-à-vis de la phanérogame phytoparasite *Striga hermonthica* (Andrianjaka *et al*., 2007), qui affecte de nombreuses céréales dans la zone inter-tropicale. En effet, plusieurs souches d'*Azospirillum* peuvent inhiber la germination de *Striga hermonthica* favorisant ainsi la croissance de la céréale.

2.5.1. Renforcement de la capacité défensive de la plante

Certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d´une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l´hôte beaucoup plus résistant à l´agression future par des agents pathogènes (virus, nématodes, champignons et bactéries pathogènes).

Ce phénomène a été nommé «résistance systémique induite» (ISR, Induced Systemic Resistance) (Van Loon ,1997).

A. La résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)

Cette résistance est stimulée par certaines souches PGPR. De plus, ces rhizobactéries sont capables de réduire une maladie à travers la stimulation de mécanismes de défense inductibles chez la plante (Van Loon , 1997).

L'induction d´une telle capacité de défense est systémique : le traitement des racines par des PGPR produit des effets protecteurs sur d´autres parties de la plante sans migration des bactéries induisant l'ISR au travers du système vasculaire de la plante ou à travers les tissus (Ramamoorthy *et al.,* 2001)

En effet, la preuve du rôle d'une souche de PGPR en tant qu'inducteur de l'ISR dans la réduction d'une maladie est donc obtenue en garantissant une séparation spatiale de l'agent pathogène et de l'agent inducteur de la résistance, afin d'exclure toute interaction antagoniste directe.

De plus, la colonisation efficace des racines par des PGPR est un événement essentiel pour l'expression optimale de l'activité de bio-contrôle agissant par compétition pour le substrat ou antibiose (Bloemberg et Lugtenberg, 2001), mais aussi pour l'ISR où la population des bactéries sur les racines doit atteindre un niveau de seuil suffisant pour déclencher le phénomène. Chez *Pseudomonas* par exemple, le niveau de seuil doit être au minimum 105 cellules par gramme de racines (Bloemberg et Lugtenberg, 2001).

Cependant, les mécanismes de résistance dans l'ISR atteignent leur efficacité maximale entre 4 à 5 jours après l'application d'un agent induisant, mais le niveau de persistance de la résistance diminue avec le temps. Généralement, l´ISR ne confère pas une protection totale contre l´infection (Harman *et al.,* 2004) et la durabilité de la résistance induite par les PGPR diffère d´une plante à l´autre, mais aussi en fonction de la souche bactérienne utilisée (Ramamoorthy *et al.,* 2001). Par exemple, l´application combinée d´une souche particulière de *Pseudomonas* sur les graines, les racines, le sol et sur les feuilles a augmenté la durabilité de l´ISR chez le riz contre la maladie causée par *Rhizoctonia solani* (Nandakumar *et al.,* 2001).

Les souches inductrices de l´ISR peuvent appartenir aux bactéries Gram positives et plus particulièrement les bacilles comme *Paenibacills polymyxa*, *Bacillus pumilus*, *B. mycoides*, *B. subtilis*, ou aux bactéries Gram négatives surtout le genre *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*) ou des *enterobactériaceae*, comme *Serratia* (*S. marcesens*, *S. plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans* (Van Loon *et al. ,*1998; Ramamoorthy *et al. ,*2001; Bent, 2005).

La résistance systémique induite a été observée d'abord dans beaucoup d'espèces végétales dicotylédones, et plus particulièrement dans les famille des *Cucurbitaceae* (concombre, pastèque) (Ongena *et al. ,*2000 ; Lee *et al,.* 2001) des *Solanaceae* (pomme de terre, tomate et tabac) (Hasky-Günther *et al. ,*1998; Zhang *et al,.* 2002; Meziane *et al.,* 2005) des *Brassicaceae* (Radis, Arabidopsis) (Meziane *et al.,* 2005), des *Fabaceae* (Haricot, Petit pois) et des *Caryophyllaceae* (oeillet) (Van Peer et Schippers, 1992).

Par ailleurs, des travaux plus récents ont montré que l'ISR peut aussi être effective chez certaines plantes monocotylédones telles que le riz, le maïs et la canne à sucre (De Vleesschauwer *et al.,* 2006).

B. La tolérance systémique induite (IST)

Les souches PGPR associée avec les racines des plantes augmentent la productivité et l`immunité des plantes (Kloepper *et al*., 2004). Des travaux récents ont montré que plusieurs souches PGPR peuvent aussi induire la tolérance systémique, qu`on appelle IST (Induced Systemic Tolerance) (van Loon *et al*., 2004).

De plus, ces PGPR pourrait aussi augmenter l`absorption des nutriments des sols, réduisant le besoin d`engrais et prévenir l`accumulation de nitrate et de phosphate dans les sols agricoles. Une réduction de l`utilisation des engrais permettrait de réduire la contamination des eaux de ruissellement par des engrais, et conduit à des économies pour les agriculteurs (Kloepper *et al*., 2004 ; van Loon *et al*., 2004).

Toutefois, de nombreuses recherche ont montré que les PGPR peuvent être utilisé comme éliciteurs de la tolérance au stress abiotique tels que la sécheresse, le sel et la carence ou l`excès de nutriments (van Loon *et al*., 2004).

Actuellement, de nouvelle études sur IST pour la sécheresse, ont rapporté que l`inoculation avec les PGPR *Paenibacillus polymyxa* améliore la tolérance d`*Arabidopsis thaliana* envers le stress. De plus, *Achromobacter piechaudii* ARV8 qui produisent 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, ont conféré l'IST contre le stress pour certaines plantes (Poivre et Tomate) (Meziane *et al.,* 2005).

Sous condition de stress, y compris la sécheresse, l'éthylène, hormone végétale qui régule l'homéostasie endogène de la plante, entraine une réduction dans la croissance des racines et également les plantules. Cependant, la dégradation d'éthylène par l'ACC désaminase bactérien, libère le stress des plantes et confère ainsi une croissance normale aux plantes (Meziane et *al.,* 2005).

Par ailleurs, les rhizobia sont très sensibles au stress hydrique, ce qui entraine une diminution significative de la fixation d'azote face à une faible teneur en eau du sol. Donc, la co-inoculation d'haricot avec (*Phaseolus vulgaris L*.) avec *Rhizobium tropici* et deux souches de *Pseudomonas polymyxa*, a pour résultat une augmentation de la hauteur des plantes, du poids sec et le nombre de nodules former. Donc, l'effet du mélange de deux souches de *P. polymyxa* était bénéfique sur le nombre de nodules, ce qui suggère une synergie d'utilisation d'un mélange de souches (Meziane *et al.,* 2005).

Enfin, les PGPR à IST peuvent aider la croissance des cultures dans des conditions défavorables de l'environnement. Plusieurs études sur les mécanismes par lesquels les PGPR provoquent la tolérance aux facteurs de stress spécifiques devraient améliorer l'utilisation des IST dans l'agriculture en permettant l'optimisation des mélanges microbiens pour la production de déterminants bactériens spécifiques (cytokinines, antioxydants, ACC désaminase).

2.6. L'interaction fonctionnelle entre *Azospirillum* et les racines de la plante

A l'échelle de la croissance annuelle plante, la probabilité pour une bactérie donnée d`établir une interaction avec la plante apparait plutôt faible, étant donné (i) les différences d`échelle entre la bactérie, les racines et le sol, et (ii) l`effectif très élevé des autres microorganismes dans le sol. La détection du végétal par les microorganismes, à distance ou lors d'un contact avec une racine en croissance, constitue l'un des premiers processus clé lors de l`interaction avec la plante.

2.6.1. Molécules signal et Azospirillum

La fonctionnalité d'une bactérie pouvant s'associé aux racines d'une plante dépendra de sa capacité à percevoir, à interagir et à entrer en compétition avec le reste de la communauté microbienne.

En plus de l'apport nutritif que les microorganismes constituent, les rhizodépots ont plusieurs rôles :(i) de chimio-attractant, avec pour conséquence l`attraction de certaines bactéries dans la rhizosphère, et (ii) de molécules signal dans l'initiation de l'interaction bactérienne avec les racines de la plante (Zhu *et al*., 1997).

Plusieurs travaux ont démontré l'existence de signaux d`origine végétale qui vont permettre aux microorganismes du sol de détecter la présence d`une plante. L`exemple type est celui de l'interaction Rhizobium-légumineuses, ou les flavonoïdes libérés par les racines de la plante servent de chimio-attractant pour la bactérie induisent les gènes *nod*.

Le rôle de tels signaux est assez peu documenté dans le cas d'*Azospirillum,* bien que des gènes homologues aux gènes *nod* aient été décrits chez cette bactérie (Vieille et Elmerich, 1990). Il a cependant été démontré que certains flavonoïdes, notamment la niringenine, stimuleraient la colonisation des racines latérales émergentes par *A.brasilense* Sp245.

La lectine de blé (WGA ; *wheat germ agglutinin*) pourrait fonctionner comme une molécule signal dans l`interaction *Azospirillum*-racines du blé. Cette lectine se fixe aux cellules bactériennes, et son ajout dans une culture d`*A. brasilense* Sp245 induit des changements dans son métabolisme, diminuant sa mobilité et stimulant la fixation biologique de l`azote, l'excrétion d'ammonium et la biosynthèse d'AIA .Une stimulation de la fixation d'azote due à la présence de WGA a également été observée chez *A. lipoferum* (Karpati *et al*., 1999).

2.6.2. Mobilité d'Azospirillum

La mobilité d'*Azospirillum* peut augmenter la probabilité de rencontre entre bactérie et plante dans l'environnement sol. De plus, les bactéries se déplaçant activement vers les exsudats de la plante bénéficient d`une large gamme de nutriments provenant des exsudats, leur permettant ainsi de survivre dans la rhizosphère et de la coloniser par la suite.

Lors du processus de colonisation, le déplacement de la bactérie vers la racine dépend à la fois d'une mobilité active de la bactérie et également de mouvements passifs de celle-ci via des agents porteur : eau capillaire dirigée vers la racine par l'absorption racinaire, et microfaune.

Dans le sol, *Azospirillum* se déplace vers la racine suivant des mouvements horizontaux et verticaux jusqu`à 10 cm, ceci a été observées dans la rhizosphère du blé (Bashan et Levanony, 1991).

Plusieurs espèces d'*Azospirillum* (*A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense*, *A. largomobile*) présentent deux types de mobilité. Lors de la croissance en milieu liquide, un unique flagelle polaire est synthétisé ; la synthèse de flagelles latéraux est induite lors de la croissance sur milieu solide (Borisov *et al*., 2007). Le flagelle polaire, impliquer dans les déplacements vers les racines de la plante et intervient également dans l'adhésion aux racines (Croes *et al*., 1993).

Les flagelles latéraux, plus courts et plus fins, sont responsables d`un mouvement sur des milieux visqueux ou solides. Au total, la capacité de déplacement d'*Azospirillum* contribue à la colonisation de la racine (Moens *et al*., 1995).

2.6.3. Localisation sur les racines

Les bactéries du genre *Azospirillum* ne colonisent pas l'ensemble de la racine. Suite à l'inoculation du blé, les cellules d'*A. brasilense* sont localisées dans les zones d'élongation racinaire et d'émergence des racines latérales, qui sont des sites importants d'exsudation, et dans la zone pilifère (Ramos *et al*., 2002).

Plusieurs souches d'*Azospirillum brasilense* et *Azospirillum lipoferum* ont été isolées à partir de la surface des racines de plante ; certaines ont été identifiées comme des bactéries potentiellement endophytes, pouvant pénétrer les tissus racinaires par l'intermédiaire de blessures ou de crevasses du cortex.

De plus, Assmus *et al .,* (1995) ont démontré que la souche *Azospirillum brasilense* Sp245 était capable de coloniser l'intérieur de certaines cellules végétales (poils absorbants).

2.6.4. Adhésion à la racine, colonisation et biofilms racinaires

L'adhésion aux racines des plantes permet à *Azospirillum* d'avoir un meilleur accès aux exsudats racinaires et lui évite d'être déplacée du rhizoplan par des mouvements d'eau. Cette adhésion le long des racines est également bénéfique pour la plante, lui permettant d`avoir accès aux composes excrètes par les bactéries, et générant une barrière physique pouvant limiter la colonisation des racines par des bactéries pathogènes.

L'adhésion d'*Azospirillum* est représentée en deux étapes :

- Dans une étape initiale rapide et réversible, la bactérie s'absorbe aux racines .Durant cette étape, les protéines hydrophobes présentent à la surface cellulaire et les flagelles polaires seraient impliqués (Croes *et al*., 1993).

- Dans la deuxième étape d'encrage et d'attachement d'*Azospirillum* aux racines, les bactéries sont liées d'une façon irréversible aux racines. Cette étape nécessiterait la production par la bactérie de fibrilles de nature inconnue ou d'exo-polysaccharides (De Troch et Vanderleyden, 1996).

De plus, la colonisation racinaire par *Azospirillum* a montré que la bactérie se retrouve sous la forme d'agrégats multicellulaires. Ces derniers, appelés aussi micro-colonies peuvent être considérées comme des biofilms racinaires bactériens.

2.6.5. Etablissement et survie dans la rhizosphère

Azospirillum est retrouvée dans la rhizosphère indépendamment des caractéristiques des sols (Bashan *et al*., 1995). Ces bactéries présentent des caractéristiques physiologiques particulières, comme la formation de cystes, la production de mélanine et de poly-hydroxy-butyrate (PHB), qui peuvent permettre à la bactérie de survivre dans des conditions défavorables.

Les formes cellulaires cystes non mobiles et riche en PHB pourrait permettre une survie de la bactérie dans l`environnement sol étant donné leur résistance à la dessiccation et à la chaleur. La production de PHB ferait partie des mécanismes favorisant l'établissement, la prolifération ainsi que la survie et la compétition dans la rhizosphère en constituant une source de stockage intracellulaire de carbone et d'énergie (Kadouri *et al*., 2007).

3. Méthodes d'études des interactions dans la rhizosphère

3.1. Le partenaire Végétal

La prise en compte du partenaire végétal nécessite en premier lieu une meilleure connaissance de la structure mais aussi de la fonction du système racinaire. Au cours des dernières années, de nombreux progrès dans la connaissance de la biologie racinaire ont été faits grâce aux outils moléculaires et génétiques appliqués à l'étude des systèmes racinaires modèles, comme celui d'*Arabidopsis thaliana*. De nombreuses techniques moléculaires sont notamment disponibles afin de cloner les gènes spécifiquement exprimés dans les racines (Hontzeas *et al*., 2004).

D'autre part, le criblage et 1'identification de la large gamme de composés présents dans les rhizodépots et qui peuvent influencer les microorganismes et la rhizosphère demeure une tâche importante dans l'étude des interactions plante/microorganismes. De plus, les approches étaient dans la plupart du temps basées sur l'obtention d`extraits, suivies du test de leur activité sur des microorganismes.

Par ailleurs, les plantes sont cultivées *in vitro*, l'inconvénient majeur de cette approche traditionnelle est l`impossibilité d`observer les interactions directes entre la racine et les microorganismes. Néanmoins, plusieurs approches s'intéressent désormais à l'étude de la rhizosphère en conditions *in situ* (Hontzeas *et al*., 2004).

3.2. Etude de la diversité des microorganismes rhizosphériques

3.2.1. Les approches phénotypiques

Les approches phénotypiques sont toujours admises comme étape primordiale pour la séparation et l'identification des souches nouvellement isolées. Elles constituent la base pour la description formelle des taxons depuis les espèces et les sous-espèces jusqu'aux genres et familles (Vandamme *et al.,* 1996). Chez les diazotrophes associatives, l'exploitation de leurs caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques voire écologiques était à la base de l'identification des espèces du genre *Burkholderia* (Baldani et Baldani, 2005).

A. La tolérance aux pHs

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

Généralement, les endophytes associatifs et symbiotiques sont des bactéries neutrophiles et basophiles (Rivas *et al.*, 2002). Toutefois, Jordan (1984) a montré que les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* peuvent tolérer des pHs allant de 4.5 à 9. Pour les diazotrophes associatifs, certaines espèces peuvent croître à des pHs acides 5.5 et même à des pHs plus acides comme le cas de *Gluconocetobacter diazotrophicus* qui se montre capable de croître à pH 3 et de fixer l'azote à pH 2.5 (Stephan *et al.*, 1991). Par contre, chez les *Azospirillum* le pH optimal varie entre pH 6 et pH 7, un pH alcalin ou très acide inhibe la croissance.

La tolérance aux pHs pourrait être un paramètre pour distinguer entre les espèces comme c'est le cas de *Burkholderia* avec *B. brasilensis* qui croît à un pH compris entre 4 et 6, et *B. tropica* qui croît à un pH supérieur à 5. Et entre *A. doebereinerae* ayant un pH de croissance de 6-7, mais légèrement supérieur à celui de *A. lipoferum* (5,7-6,8) et inférieur à ceux de *A. halopraeferens* (6,8-8) et *A. amazonense* (5,5-8,5) (Stephan *et al.*, 1991).

B. La tolérance à la salinité

Comme l'acidité, les sols salins constituent un environnement défavorable pour la croissance de la plupart des plantes et de leurs bactéries endophytes. Contrairement à leur plantes hôtes, les endophytes symbiotiques et associatives pouvant tolérés et vivre en présence d'une salinité élevée, soit en culture (Reva *et al.*, 2002) ou dans le sol (Tilak *et al.*, 2005).

L'osmotolérance des bactéries est variable d'une souche à une autre. En général, l'osmotolérance de *Azospirillum* spp augmente dans cet ordre : *A. amazonense*, *A. lipoferum*, *A. brasilense* et *A. halopraeferens* l'optimum de croissance intervient à 200–400mM NaCl (Rivas *et al.*, 2002).

L'adaptation des bactéries aux fortes concentrations en sel est due à leur faculté de synthèse et d'accumulation intracellulaire des solutés compatibles. Ces solutés ont pour rôles d'osmo-régulation et protection des bactéries contre les effets de stress salin. Les principaux solutés rencontrés chez les bactéries sont : les ion K^+, glycine, bétaïne, proline, glutamate, divers glucides et N-acetylglutaminyl-glutamine amide (Boncompagni *et al.*, 1999).

C. La résistance intrinsèque aux antibiotiques

La résistance intrinsèque aux antibiotiques constitue un marqueur très important pour identifier une souche bactérienne, nouvellement introduite dans un sol donné. La tolérance aux antibiotiques varie en fonction de la souche bactérienne, du type d'antibiotique et de sa concentration dans le milieu (Graham, 1963).

3.2.2. Les approches moléculaires

Diverses méthodes génétiques sont, actuellement, utilisées pour identifier et classer les bactéries endophytes symbiotiques et associatives. Chacune permet une classification phylogénétique à un niveau précis allant du genre, espèce, sous-espèce jusqu'à la souche spécifique. Cependant, chaque méthode à ses avantages et ses inconvénients qui se manifestent au niveau de la résolution. Ainsi, une panoplie d'analyse moléculaire des acides nucléiques (ADN et ARN) permet d'évaluer les similarités et les dissemblances entre les bactéries isolées, à des degrés phylogénétiques différents (Vandamme et *al.*, 1996).

La recombinaison de plusieurs techniques permet de révéler à la fois des divergences génétiques au sein des groupes bactériens considérés auparavant comme homogènes, et des relations taxonomiques entre des groupes très éloignés.

A. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction

Le polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP) obtenu, permet de comparer et de classer les individus testés, à partir de l'extrait d'ADN génomique. Cette méthode simple et classique a été utilisée chez les bactéries endophytes symbiotiques, *Rhizobium* (Rivas *et al.*, 2002; Trujillo *et al.*, 2005) et chez les bactéries associatives *Psaudomonas* et *Azospirillum*. La technique RFLP peut être combinée avec l'utilisation de sondes spécifiques marquées, ce qui permet d'augmenter son caractère discriminant (Kuykendall *et al.*, 1992) ou encore couplée avec la technique PCR (Polymerase Chain Reaction).

B. Les méthodes d'amplification génomique

L'amplification d'ADN est l'une des techniques la plus adaptée pour étudier la biodiversité bactérienne (Vandamme *et al.*, 1996). Elle est dotée de caractérisation rapide, simple et nécessitant très peu de matériel biologique. En plus, elle offre la possibilité d'obtenir un grand nombre de copies d'une séquence nucléique cible à partir d'une faible quantité d'ADN. L'ADN amplifié peut être directement séquencé et analysé (Ramos *et al.*, 2003).

Cependant, cette technique est souvent couplée avec l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction (PCR/RFLP). Les données analytiques obtenues à partir des produits d'amplification des régions spécifiques d'un génome et leur digestion par des endonucléases, permettent d'estimer la diversité génétique à un niveau élevé.

La PCR/RFLP des gènes ribosomiques 16S, 23S, 5S et ITS, a été utilisée par plusieurs chercheurs pour estimer la diversité génétique chez les *rhizobium*s (Vandamme *et al.,*2002) et chez les bactéries associatives (Mittal, 2004),*Azospirillum* (Bhavanath Jha *et al* . , 2009).

La PCR/RFLP du gène 16S ADNr, communément appelée ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), est plus utilisée pour évaluer les relations phylogénétiques entre les bactéries (Young et Haukka, 1996).

C. La PCR des séquences répétées

Aussi, une nouvelle technique plus pointue et performante par rapport à la RAPD a vu le jour grâce aux travaux de nombreux auteurs qui ont découvert des familles de séquences inter-géniques. Ces familles contiennent, en plusieurs copies dans le génome de la plupart des bactéries Gram- et quelques Gram+, des séquences répétées inter-géniques courtes et hautement conservées dans l'espèce (Luspki et Weinstok, 1992).

Trois familles des séquences répétées ont été identifiées et largement étudiées, comprenant la séquence répété extra-génétique palindromique (REP) de 35 à 40pb, la séquence inter-génique répétée consensus (ERIC) de 124 à 127pb, et l'élément Box de 154pb contenant trois unité : BoxA, BoxB et BoxC (Versalovic, 1991; 1994).

Les produits de PCR/REP et ERIC, utilisant l'ADN comme matrice et des amorces spécifiques, ont montré, après migration sur gel d'agarose, des bandes très caractéristiques.

Depuis, ces PCR sont considérés comme des méthodes efficaces pour établir l'empreint génomique des bactéries.

3.3. Visualisation des interactions rhizosphériques

La visualisation des interactions rhizosphériques repose principalement sur une approche simple qui consiste à marquer le microorganisme avec une protéine fluorescente exprimée de façon constitutive afin de le suivre *in situ* dans son environnement naturel. Jusqu`à présent l`utilisation de bactéries marquées s'est limitée à l'étude d'une seule souche mais les possibilités de marquages multiples offrent l`opportunité de pouvoir étudier la compétition.

Deux études basées sur ce même principe ont été réalisées. La première a cherché à visualiser une éventuelle compétition lors de la colonisation des racines du riz par deux souches d'*Azospirillum* (*A. irakense* KBC1 et *A. brasilense Sp7*) différemment marquées (Zhu *et al*., 2002). La seconde concerne l'analyse du patron de colonisation deux variantes de phase (variantes de phase I et II) de *Pseudomonas brassicacearum* (Achouak *et al*., 2004).

D'autre part, des gènes marqueurs comme GFP (Green Fluorescent Protein) ou le gène Lac Z, sont largement utilisés en écologie microbienne avec plusieurs exemples d'applications : développement de biocapteurs, maturation des biofilms et dans des études d'interactions plantes-microorganismes (Achouak *et al*., 2004).

3.4. Techniques de microscopie et interactions rhizosphériques

Des techniques de microscopie nouvellement découvertes s`avèrent très prometteuses dans l'étude des interactions plante-bactéries. Parmi celles-ci, la microscopie confocale par spectroscopie de Raman s`avère efficace pour détecter les différences entre cellules bactériennes in vitro mais aussi dans la rhizosphère pour distinguer des cellules d`espèces différentes, sans avoir d'impact sur l'échantillon (Scharder *et al*., 1999).

La microspectrosopie de Raman consiste à focaliser un faisceau de lumière monochromatique (typiquement un faisceau laser) sur l'échantillon et à analyser la lumière diffusée en retour. Cette étude permet alors de caractériser la composition moléculaire, la structure cristalline ainsi que les propriétés électroniques de l`échantillon. Elle permet aussi la détection de molécules particulières sur la surface des racines, en utilisant la spectroscopie infrarouge (Scharder *et al*., 1999).

Par ailleurs, plusieurs méthodes de détection des protéines fluorescentes existent, mais la plus propice pour étudier les interactions plantes-microorganismes et la microscopie confocale a balayage laser (CLSM). Le couplage CLSM et protéine fluorescente permet une analyse en temps réel et dans l`espace de ces interactions, sans préparation des échantillons. Les différentes caractéristiques spectrales des protéines fluorescentes permettent en outre des expériences avec des doubles marquages.

D`autre part, il est possible de réaliser un double marquage dans une même cellule afin de suivre différentes caractéristiques physiologiques. Le couplage CLSM et la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) est souvent utilisée pour identifier et localiser un genre ou une espèce bactérienne dans la rhizosphère (Lee *et al*., 2000). Cependant, cette technique présente l'inconvénient majeur d'être destructive pour l'échantillon (Watt *et al*., 1993).

4. L'importance des PGPR dans l'acquisition des plantes d'une tolérance aux stress biotique et abiotique

En raison de leur nature sensible, les plantes ont depuis toujours été confrontées à différents stress abiotiques et biotiques dans leur environnement immédiat. Par conséquent, la survie des plantes dépend de leur capacité à adapter leur physiologie et notamment leur développement et leur croissance, afin d'atténuer ou même de supprimer les effets du stress. Toutes les plantes sont connues pour percevoir et réagir aux signaux de stress comme la sécheresse, la chaleur, la salinité, les herbivores et les pathogènes (Bartels et Sunkar, 2005).

4.1. Le rôle des bactéries dans la tolérance des plantes aux stress

Même si ce rôle n'est pas évident au premier abord, les plantes cultivées dans le sol sont immergées au milieu d'une multitude de microorganismes. En fait, un gramme de sol contient des milliards de microbes, et de nombreux agents pathogènes microbiens exploitent cette relation étroite a leurs avantages, donnant lieu à des maladies bien connues et la perte de la productivité agricole chaque année.

Cependant, les plantes aussi façonnent leur environnement microbien et peuvent interagir avec divers micro-organismes bénéfiques. Ces interactions peuvent améliorer la croissance des plantes et aident la plante à résister à des conditions de stress biotiques et abiotiques. Les plus connus sont les interactions microbiennes bénéfiques avec les champignons mycorhiziens et les bactéries rhizobium. 80% de toutes les espèces de plantes terrestres forment des relations symbiotiques avec les mycorhizes (Harrison, 2005).

Des associations bénéfiques avec d'autres microorganismes existent à la fois pour diverses espèces bactériennes, généralement appelée PGPB ainsi que de divers champignons, désignées par PGPF (Plant Growth-Promoting Fungi). PGPB et PGPF peuvent stimuler la croissance des plantes et / ou conférer aux plantes une meilleure résistance aux stress biotiques et abiotiques (Lugtenberg et Kamilova 2009). La mise en place de véritables interactions nécessite la reconnaissance mutuelle des réponses à la fois chez les plantes et les microorganismes.

Récemment, il s'est avéré que *Rhizobium* et champignons partagent une voie de signalisation des plantes qui est activée par des facteurs de *rhizobium* et champignons (Oldroyd *et al*., 2009). En outre, cette voie de signalisation semble également être activée par certaines bactéries bénéfiques (PGPR) (Sanchez *et al*., 2005) (Figure 4).

4.2. Tolérance aux stress abiotiques induite par des bactéries bénéfiques

Un certain nombre de bactéries peuvent également favoriser la croissance des plantes et les protéger contre des stress abiotiques, ce qui a donné lieu à une recherche active dans le domaine des bactéries améliorant la croissance végétale. Différentes familles de bactéries, y compris les *Rhizobium, Bacillus, Pseudomonas* et *Burkholderia* peuvent améliorer la croissance des légumineuses et des cultures dans des conditions de stress abiotique (Egamberdieva et Kucharova, 2009).

L'accumulation de la proline chez la plante est provoquée par le stress engendré par la sécheresse. L'amélioration de la tolérance au stress abiotique du maïs lors de la co-inoculation de *Rhizobium* et *Pseudomonas* est accompagnée par une augmentation des niveaux de proline, une diminution des fuites d'électrolytes et par le maintien de la teneur en eau des feuilles (Egamberdieva et Kucharova, 2009).

Les contraintes environnementales peuvent être la cause de la production d'éthylène hormonal chez les plantes, qui se traduit par des réactions d'inhibition de la croissance et du stress. Habituellement, l'éthylène est formé dans les plantes à partir du précurseur acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC).

Certaines bactéries produisent des ACC désaminases, qui dégradent l'ACC, réduisant ainsi la formation d'éthylène dans les plantes. C'est de cette manière qu'*Achromobacter piechaudii* induit une tolérance systémique contre la sécheresse et le sel et favorise la croissance des plantes (Glick, 2007) (Figure 4).

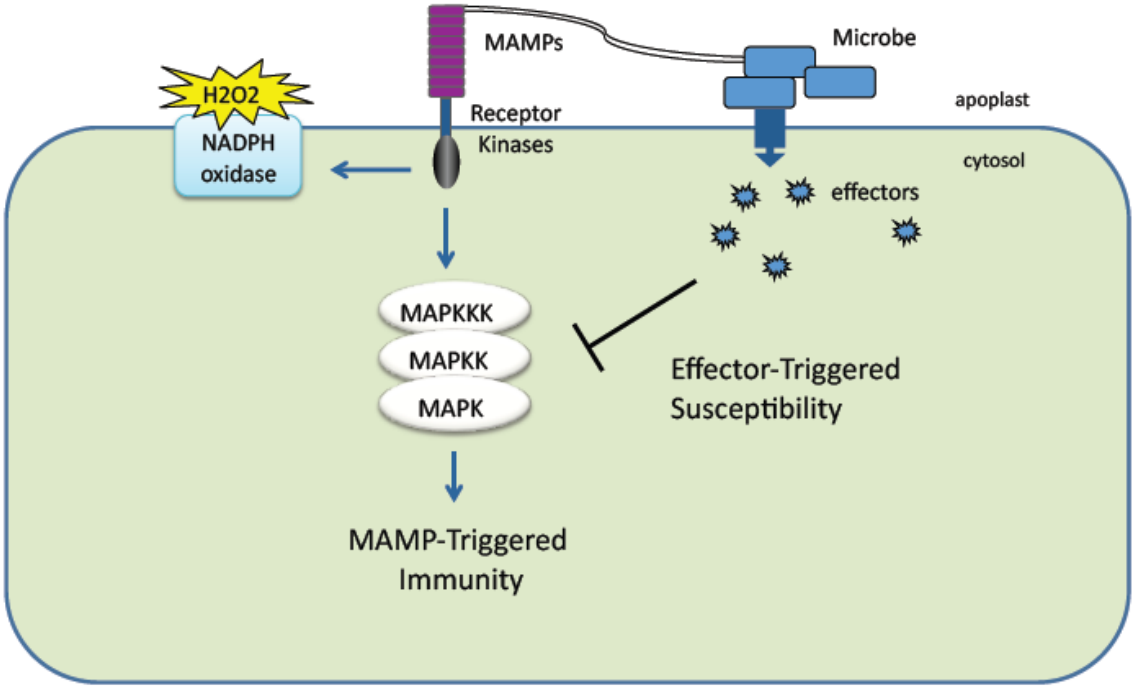


Figure 4 : Le système immunitaire des plantes en interaction avec des microorganismes (Glick, 2007).

Les plantes utilisent des récepteurs immunitaires afin de détecter les microbes et déclencher des réactions de défenses appropriés. Des kinases de récepteurs à la membrane plasmique reconnaissent des molécules microbiennes (MAMP = Microbe-Associated Molecular Pattern) comme les flagelles bactériens et de lancer une série de réactions de défense telles que l'activation des cascades de kinases MAP, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de déclencher l'immunité (MTI = MAMP-triggered immunity). Cette couche de l'immunité est souvent très efficace pour stopper la colonisation de la plupart des microbes pathogènes potentiels. Agents pathogènes et microbes bénéficiaires qui établissent avec succès une interaction avec la plante hôte ont évolué des effecteurs qui sont livrés à la cellule de la plante hôte pour supprimer l'immunité MTI, un processus connu sous le nom ETI (effector-triggered immunity) (Glick, 2007).

4.3. Résistance aux pathogènes induite par des bactéries bénéfiques (Bio-controle)

Les plantes ont la capacité d'acquérir un état de résistance systémique induite (ISR) contre des agents pathogènes après inoculation de bactéries bénéfiques. En association avec les racines des plantes, les bactéries bénéfiques peuvent amorcer le système immunitaire inné et conférer une résistance à un large spectre d'agents pathogènes, avec un impact minimal sur le rendement et la croissance (Van Hulten *et al*., 2006).

Par conséquent, l'amorçage de la résistance systémique induite offre une stratégie intéressante pour permettre aux plantes d'accroître leur résistance aux agressions des pathogènes. Plusieurs bactéries qui colonisent les racines des plantes peuvent aussi protéger les plantes contre les maladies foliaires. Ces familles de bactéries comprennent *Pseudomonas fluorescence, Pseudomonas putida, Bacillus pumilus* et *Serratia marcescens.*

Certaines rhizobactéries peuvent ainsi déclencher la résistance systémique induite. On trouve parmi celles-ci le *Paenibacillus alvei* (Tjamos *et al*., 2005), *Acinetobacter lwoffii* (Trotel-Aziz *et al*. , 2008), *Chryseobacterium balustinum, Azospirillum brasilense* (Ramos Solano *et al.,* 2008), *Curtobacterium sp. oxidans, Arthrobacter* (Barriuso *et al*., 2008), *Stenotrophomonas N6.8* (Domenech *et al*. , 2007), et des *Actinobacteria* endophytiques (Conn *et al*. , 2008). Toutes ces bactéries se sont montrées capables de déclencher la résistance systémique induite lors des essais dans les serres ou dans les champs sur une grande variété d'espèces végétales, y compris le riz, la luzerne, la tomate, et même des arbres (Van Loon, 2007).

4.4. Modes de vie interchangeables et concepts insuffisants

Il y a d'autres preuves qui indiquent que nos concepts de catégorisation actuels entre microbes pathogènes et bénéfiques sont insuffisants. Par exemple, *F. culmorum* a été défini comme un agent pathogène pouvant causer des maladies sur diverses espèces de plantes cultivées. Toutefois, la souche FcRed1 de *F. culmorum* fonctionne également comme un microbe bénéfique et confère la tolérance au sel à son hôte, la graminée *Swallenia alexandrae*, mais les isolats des plantes non-côtières ne possèdent pas cette propriété (Rodriguez et *al*., 2008).

Un autre exemple est *C. protuberata* qui a été défini comme un agent pathogène de plusieurs plantes monocotylédones alors même que l'isolat Cp4666D de *C. protuberata* confère une tolérance à la chaleur et à la sécheresse à sa plante hôte *Dichanthelium lanuginosum* (Rodriguez *et al*., 2008). Même si les espèces *Curvularia* ne sont pas connues pour avoir beaucoup d'hôtes différents, *C. protuberata* de la monocotylédone *D. lanuginosum* confère également la tolérance à la chaleur à la tomate, une plante dicotylédone (Rodriguez et *al*., 2008).

La capacité des pathogènes du genre *Colletotrichum* de pouvoir basculer entre les modes de vie d'agents pathogènes et de microorganismes bénéfiques révèle que nous ne comprenons que très peu la base moléculaire des interactions plantes-microorganismes.

En outre, il existe des preuves que certains microorganismes peuvent être présents dans les plantes sans qu'elles ne manifestent des symptômes de la maladie (Freeman *et al*., 2001).

Il semble donc que selon l'hôte, un certain nombre de microorganismes peuvent osciller entre le rôle d'ami ou pathogène (Bacon et Yates, 2006).

4.5. L'activité ACC désaminase

Les plantes sous stress biotiques et abiotiques libèrent de grandes quantités d'éthylène appelé "éthylène de stress". Le stress hydrique augmente la production d'éthylène, surtout dans le cas ou la sécheresse se développe rapidement (Morgan and Drew, 1997). En plus, le stress provoqué par la sécheresse, les températures élevées peuvent conduire à la production d'éthylène par l'effet de la température sur les enzymes de synthèse de l'éthylène (Morgan and Drew, 1997). Des niveaux élevés de l'éthylène inhibent la fermeture des stomates et augmentent le taux de transpiration par l'inhibition de l'acide abscissique (ABA) et aussi la voie de signalisation (Tanaka *et al*., 2005).

Tamimi et Timko, (2003) ont rapporté que le stress peut également inhiber la fixation d'azote dans les légumineuses en inhibant la formation de nodules et réduit le nombre de cellules de rhizobia au cours des premières étapes de la croissance des plantes.

Les bactéries ACC+ sont un groupe de PGPR qui dégradent l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) qui est le précurseur de l'éthylène. Ces bactéries ont la capacité de réduire les niveaux de l'ACC et de l'éthylène deux à quatre fois. De plus, des études ont montré que les bactéries ACC+ en association avec les racines des plantes, peuvent améliorer la croissance des plantes sous stress abiotique (par exemple, la sécheresse, la salinité, les métaux lourds). La structure chimique de l'ACC est représentée dans la figure 5. (Bashan *et al.,* 2004 ; Ahmed *et al*., 2006).

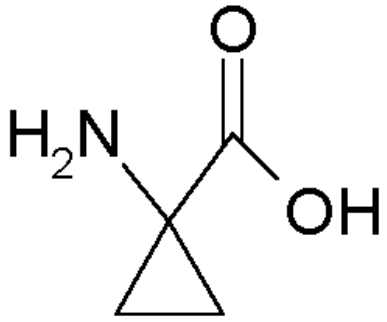


Figure 5 : La structure chimique de l'ACC (Glick *et al*., 2005).

L’enzyme ACC désaminase se trouve à l'intérieur du cytoplasme des cellules bactériennes, et l'ACC produite par les plantes est reprit à l'intérieur des cellules bactériennes et dégradée par l'enzyme ACC-désaminase. L'enzyme ACC désaminase a été trouvée dans différents types de bactéries, telles que les bactéries Gram-négatives, des bactéries Gram-positives, les *Rhizobium*, et les bactéries endophytes (Glick *et al*. 2005) (Figure 6).

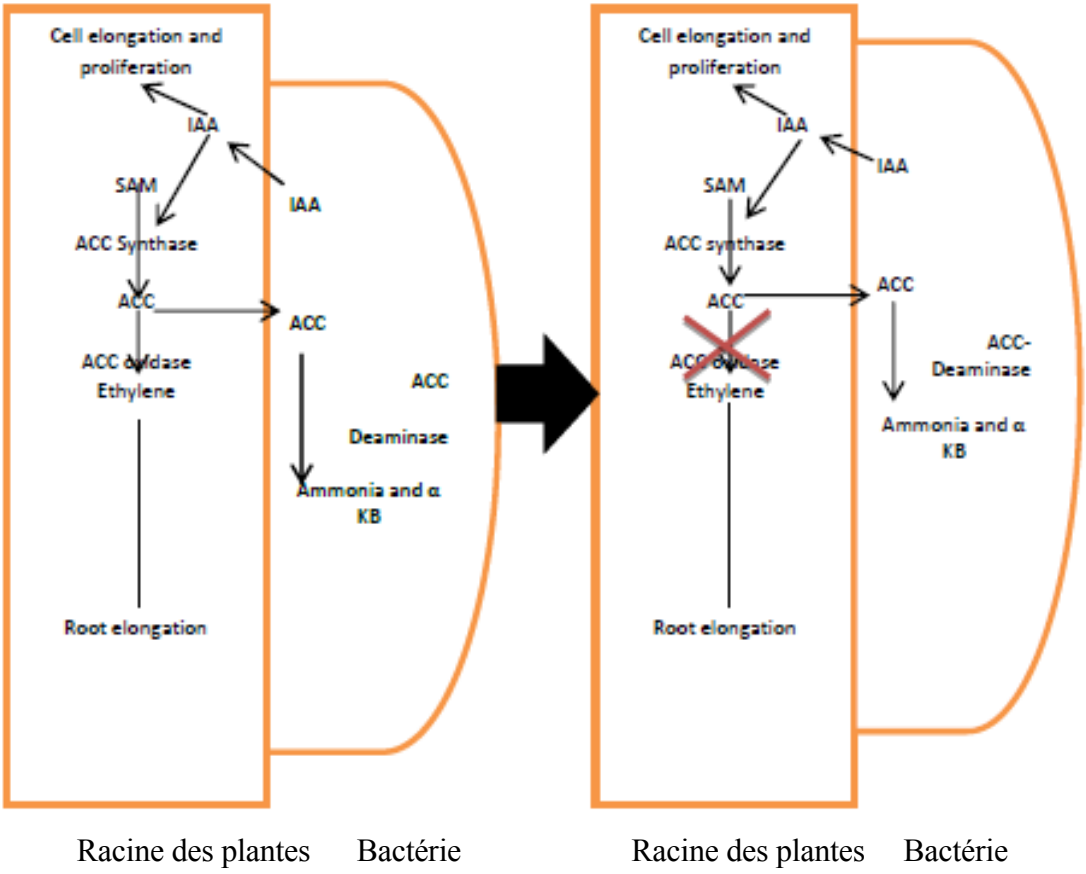


Figure 6 : Le mécanisme de réduction du taux élevé d`éthylène by ACC+ produit par les bactéries (Mayak *et al,.* 2004 ; Nadeem *et al*., 2009).

4.6. Les perspectives d’avenir

Il devient clair que la compréhension de la croissance des plantes et de leur physiologie doit prendre en compte leur association avec leurs partenaires microbiens. A l’heure d’aujourd’hui, nous avons une mauvaise connaissance de l'étendue et de la spécificité des associations existantes entre différentes espèces de plantes et certaines familles de microorganismes. En outre, les preuves actuelles démontrent un niveau de complexité supplémentaire des interactions souche spécifique au sein des espèces, ce qui suggère l'existence de mécanismes d'associations très spécifiques et complexes entre les plantes et les microbes.

Le choix et la sélectivité des associations plantes-microorganismes et des mécanismes moléculaires qui confèrent la tolérance au stresse aux plantes, sont encore très mal connus. Si nous voulons utiliser les microbes d'une manière sûre et durable, nous avons besoin de mieux comprendre la diversité, la distribution, et les activités de différents microbes dans un contexte écologique de diversité au niveau des terrains et au niveau végétal. De l'autre côté, il est évident qu'un nombre de microbes existent déjà dans la nature, ce qui peut être utile pour établir une agriculture durable.

5. Les biofertilisants : rôle et production

5.1. Biofertilisants

Le biofertilisant est défini comme une substance qui contient des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont appliqués aux semences, surfaces des plantes ou dans le sol, colonise la rhizosphère ou à l'intérieur de la plante et favorise ainsi la croissance en augmentant la disponibilité des éléments nutritifs primaires à la plante hôte. Cette définition est basée sur la logique que le terme biofertilisant est une contraction du terme fertilisant biologique « biological fertilizer » (Vessey, 2003).

Par ailleurs, le biofertilisant devrait contenir des organismes vivants qui augmentent la teneur en éléments nutritifs de la plante hôte à travers leur existence permanente en association avec la plante (Vessey, 2003). De plus, le terme biofertilisant ne doit pas être utilisé de manière interchangeable avec les termes suivants : les engrais verts, fumier, cultures intercalaires ou organique complétée d'engrais chimiques (Vessey, 2003).

Cependant, une partie des PGPR ne sont pas considérés comme biofertilisants. Ainsi, Les bactéries qui favorisent la croissance des plantes par le contrôle de l'organisme nuisible sont les biopesticides, mais pas des biofertilisants. Il est intéressant de savoir que certains PGPR favoriser la croissance en agissant à la fois comme biofertilisants et biopesticides (Vessey, 2003).

5.2. Quelques rhizobactéries utilisées comme biofertilisant

Un nombre croissant de recherches et d'études porte sur la gestion du système sol-végétal et micro-organismes. Il s'agit de recherches encouragées et développées dans le cadre de nombreux projets internationaux. Elles ont permis notamment l'identification et la sélection de différents genres de rhizobactéries, telles que l'*Azospirillum* (Krieg et Döbereiner, 1984), *Raoultella* (Van Elsas *et al*., 2007) et *Bacillus* (Siddiqui, 2006).

Le but de ces recherches est de développer des bioengrais sous forme sèche et d'obtenir une concentration bactérienne nécessaire pour améliorer la croissance des plantes.

Le tableau 4 montre l'effet de l'utilisation des rhizobactéries sur l'augmentation de la croissance et de la protection aux maladies chez les plantes.

Tableau 4: L'augmentation de la croissance des plantes et la protection aux maladies par les rhizobactéries (Mauricio, 2010).

Rhizobactéries	*Culture*	*Effet*	*Références*
Pseudomonas fluorescence	*Betterave*	*Meilleure résistance aux maladies*	*Moenne-Loccoz et al.,1999*
Bacillus pumilus	*Tomate*	*Meilleure résistance aux maladies*	*Benhamou et al .,1998*
Bacillus subtilis	*Riz*	*Promotion de la croissance des plantes*	*Vasudevan et al., 2002*
Azospirillum brasilense	*Blé*	*Promotion de la croissance des plantes*	*Kim et al., 2005*
Pseudomonas fluorescence	*Blé*	*Promotion de la croissance des plantes*	*de Freitas et Germida, 1992*

Par exemple, *Pseudomonas* spp. libère dans le sol l'enzyme phytase. Cette enzyme est responsable de la libération du phosphate, tel que l'inositol hexaphosphate. Dans des essais pratiqués au Québec (Canada) en champ ouvert, l'inoculation *Pseudomonas* spp. a généré une augmentation du rendement du champ de maïs étudié. Dans un autre essai, ce même rhizobactérie a permis une augmentation du rendement des cultures de laitue de 18 % (Smith, 1995).

5.3. Autre microorganisme considéré comme biofertilisant

D'autres microorganismes sont considérés également comme biofertilisants qui sont des champignons rhizosphériques tels que les mycorhizes à arbuscules et *Bilaii Penicillium* (Vessey et Heisinger, 2001) sont depuis longtemps connus pour avoir des effets bénéfiques favorisant la croissance des plantes.

5.4. Les différents supports

Les supports d'un bon inoculum sont des substances solides, semi-solides ou liquides qui peuvent contenir un certain nombre de cellules bactériennes durant un temps donné (khavazi et Redjali, 2000). Ces supports augmentent le taux de survie des rhizobactéries en le protégeant contre la dessiccation et la mort de cellules (Nakkeeran *et al*., 2005).

5.4.1. L'inoculum liquide

Les inocula sous forme liquide sont les plus simples à utiliser et les moins coûteux. La préparation de ce type d'inoculum s'effectue en mélangeant les bactéries soit avec un milieu de culture, soit avec une solution spécifique préalablement formulée. Il existe principalement deux façons de traiter les semences pour l'application d'inoculum liquide bactérien. La première façon consiste à mélanger les graines dans l'inoculum liquide et la deuxième à pulvériser l'inoculum sur le sillon des semis (Mauricio, 2010).

5.4.2. L'inoculum sous support (solide)

Les microorganismes peuvent également être introduits dans le sol par l'intermédiaire d'un inoculant solide, dont le composant principal est appelé support. Un bon support doit avoir comme caractéristiques essentielles : la capacité de libérer un grand nombre de cellules viables dans de bonnes conditions physiologiques .Le plus souvent, les supports utilisés dans les formulations solides sont organiques et minéraux. Il s'agit de tourbe, de talc, d'argile et de vermiculite**.** Ils permettent d'améliorer le taux de survie des bactéries (Mauricio, 2010). L'inoculum solide est le plus utilisé pour l'inoculation des légumineuses (Beck *et al*., 1993).

Les différents types de supports les plus souvent utilisés (Figure 7) :

A. Le talc

Le talc est un minéral naturel sa structure chimique est $Mg_3Si_4O_{10}$ $(OH)_2$, provenant des industries adaptées à une large gamme d'applications. Il a un très faible équilibre d'humidité, hydrophobie relative, inertie chimique, et il empêche la formation de ponts hydrates qui permettent des périodes de stockage plus longues (Nakkeeran *et al*., 2005).

B. Le Marc de café

Le marc de café est obtenu à partir des graines du caféier, un arbuste du genre *Coffea*. Composent principalement de Polysaccharide représentent près de 50% du poids du grain de café vert. Il est disponible et peu coûteux.

C. La tourbe

Est formé par la décomposition lente de couches successives de plantes aquatiques et semi aquatiques. La qualité de la tourbe est variable et n'est pas facilement disponible dans le monde entier. Bien que les supports de tourbe ne coûtent pas cher à utiliser, elle recèle beaucoup de contaminants (Nakkeeran *et al*., 2005). Et elle maintient une grande concentration de bactéries viables.

D. La vermiculite

Sa nature non organique fait qu'elle est facilement stérilisable sans risque de production de toxines ou causer de nouveaux changements structuraux. La structure multi-laméllaire de la vermiculite fournit une aération supérieure et de l'espace pour une prolifération microbienne. Ce support possède une grande propriété à couvrir les graines (Graham *et al*., 1987).

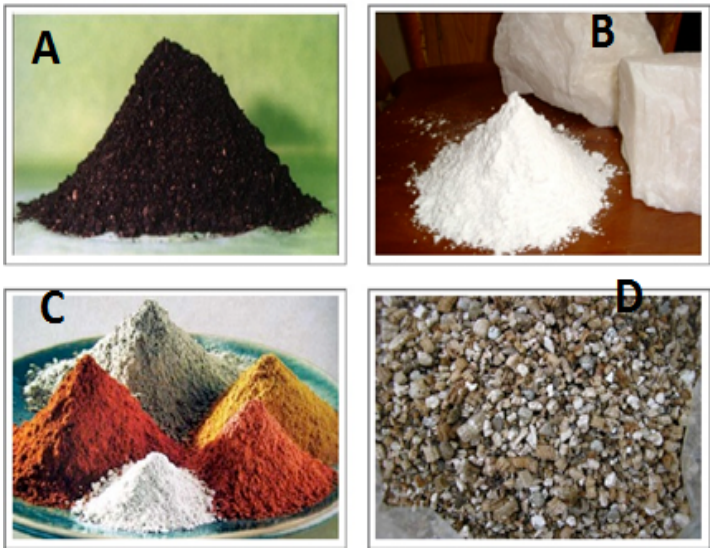


Figure 7 : Les principaux supports utilisés pour l'inoculation de rhizobactéries dans le sol : la tourbe (A), le talc (B), l'argile (C) et la vermiculite (D) (Mauricio, 2010).

5.5. L'encapsulation des rhizobactéries

Au cours des dernières décennies, l'encapsulation des rhizobactéries dans des hydrogels par la méthode de "dripping" a été évaluée. Le polymère qui a été le plus utilisé est l'alginate qui forme des gels dans des conditions douces pour les microorganismes. Ces polymères ont démontré largement leur potentiel en tant que supports bactériens (Bashan, 1998).

Le principe de l'encapsulation des cellules est de protéger les microorganismes vis-à-vis du milieu environnant pour mieux les libérer dans le sol et de façon progressive et prolongée (Paul *et al*., 1993). La vitesse de dégradation du polymère employé dépendra de l'activité biologique des micro-organismes du sol. En règle générale la dégradation du polymère doit se produire lors de la germination des semences.

Les capsules déshydratées sont stockées à température ambiante pendant une longue période. La capsule offre aux bactéries un milieu favorable en diminuant le risque de mortalité et permet une longue conservation (Wang *et al.*, 1999).

Ces inocula peuvent être améliorés avec l'apport de types de nutriments pour les bactéries afin d'améliorés la survie des microorganismes, ce qui est indispensable pour la réussite de l'inoculation de bactéries dans le sol.

5.5.1. Les techniques d'encapsulation

L'encapsulation est utilisée dans un grand nombre d'activités industrielles. Le nombre de travaux de recherche en encapsulation s'est densifié dans l'industrie agricole, en partie pour ce qui est de la réduction de l'emploi d'engrais chimique (Cassidy et *al*., 1996).

L'encapsulation est réalisée généralement en trois étapes :

- La première étape consiste en l'incorporation du principe actif dans la matrice ou le cœur de la capsule peut être liquide ou solide.
- La deuxième étape est une opération mécanique consistant soit à réaliser une dispersion liquide/air ou liquide/liquide (cas d'une matrice liquide), soit à pulvériser une solution sur les particules solides sous agitation mécanique (cas d'une matrice solide).
- La dernière étape consiste en une stabilisation par un procédé chimique de polymérisation, ou par un procédé physico-chimique (gélification, coacervation), ou physique (évaporation, solidification) réalisée sur les gouttelettes ou sur l'enrobage formé durant l'étape précédente.

Les applications potentielles offertes par l'encapsulation ont conduit à l'invention et au développement de nombreuses méthodes et techniques. Cette diversité de méthodes a fini par susciter des classifications complexes souvent incomplètes. Il est souvent très difficile de les différencier par catégories. Il existe ainsi une grande confusion dans les termes. Une même technologie porte des noms variables en fonction du domaine, un même terme pouvant parfois être utilisé pour des technologies différentes. Il y a souvent aussi confusion entre encapsulation et enrobage.

5.5.2. L'intérêt d' encapsuler des rhizobactéries

Selon Bashan *et al.,* (1998; 2002) il existe de nombreux avantages liés à l'encapsulation de rhizobactéries. Ainsi cela permettrait de :

- Réduire la possibilité de contamination des inoculant pendant le stockage, le transport et l'application.
- Produire l'inoculant en grande quantité et le stocker durant une longue période sous la forme de capsules sèches.

- Produire des inocula avec une forme adaptée aux équipements de semoir existant.
- Libérer de manière contrôlée et progressive les cellules dans le sol. De plus, les capsules sont biodégradables et non toxiques.

Cependant, l'encapsulation des rhizobactéries peut présenter un certain nombre d'inconvénients, parmi lesquels :

- La diffusion de l'eau et des gaz est réduite dans la capsule.
- Le procédé d'encapsulation peut entraîner des modifications métaboliques des cellules, notamment dues au stress hydrique engendré par le séchage (Cassidy *et al*., 1996). Ainsi, il peut être nécessaire de répéter l'application des capsules dans le sol pour un effet optimal.

Les chercheurs ont actuellement à leur disposition un éventail de techniques et de matériaux pour immobiliser des cellules qui se sont largement développées durant ces trente dernières années. L'encapsulation constitue certainement à l'heure actuelle la voie la plus prometteuse pour permettre l'inoculation et une protection efficace des rhizobactéries dans les sols.

5.6. Commercialisation des biofertilisants

Actuellement, diverses formulations commerciales de PGPR sont en vente. Des formulations bactériologiques de *Rhizobium spp.* sont disponibles dans plusieurs pays afin de favoriser la nodulation des légumineuses et de diminuer la fertilisation azotée des cultures. La formulation Zea-nit Plus est en vente en Italie. Il s'agit d'un inoculum à base d'*Azospirillum* sp. développé pour inoculer le maïs. De même, la formulation Quantum 4000, à base de *Bacillus subtilis*, est commercialisée aux États-Unis pour lutter contre le *Rhizoctonia solani Kùhn* chez l'arachide, le haricot et le coton .depuis 1985 En Chine, des PGPR qui accroissent les rendements sont utilisées dans plusieurs cultures (Beauchamp,1993).

OBJECTIF DE LA THESE

A l'issue de cette synthèse bibliographique, nous avons pu voir que les PGPR sont des bactéries aux multiples rôles :

D'une part, ces bactéries présentent des avantages classiques, documentées depuis de nombreuses années : fixatrices d`azote par excellence elles sont également impliquées dans la synthèse d`hormones, dans la solubilisation de phosphate et aussi dans la chélation de fer.

Les PGPR se sont avérées être, d`autre part, des bactéries bénéfiques pour de nombreux processus parmi lesquels l'IST et l'ISR.

Cependant, depuis la découverte de ces compétences et de cette implication positive pour attribuer aux plantes la tolérance aux stress environnementaux, plusieurs questions se posent à ce jour quant aux rôles jouées par les PGPR dans l`amélioration de la croissance du blé dur.

Sachant que de nombreuses études décrites précédemment ont placé l`importance des interactions entre les PGPR et les céréales au centre de l'intérêt croissant des chercheurs pour la production de biofertilisants, les interactions entre les PGPR et le blé restent néanmoins les moins étudiées. Ainsi, en ce qui concerne le blé dur aucune étude n`a été réalisée jusque là. Il en va de même pour sa nodulation. D`où la nécessite d'étudier ces interactions pour développer ce secteurs de recherche.

L'ensemble des données nous a conduits, lors de ce travail de thèse, à privilégier cinq axes de recherche :

- Le premier axe de recherche concerne la caractérisation phénotypique et moléculaire de PGPR isolées de différents sols algériens dans le but de les tester d'un point de vue fonctionnel afin d'évaluer leurs effets bénéfiques suite à leur inoculation avec le blé dur.

- Le deuxième axe de recherche vise à caractériser les interactions entre les souches caractérisées d'*Azospirillum brasilense* avec le blé dur pour la formation de paranodules racinaires. Pour cela une série d'expériences a été effectuée pour caractériser la nodulation et le rôle de ces nodules dans la fixation d'azote.

- Le troisième axe reprend la même étude effectuée dans le deuxième axe mais avec l'actinomycète *Frankia CcI3*.

- Le quatrième axe de recherche vise à mettre en évidence le rôle des PGPR avec le blé dur confronté à un déficit hydrique. Différents paramètres sont ciblés parmi lesquels : physiologiques et biochimique, suivi par une électrophorèse SDS PAGE des feuilles et des racines.

- Le dernier axe a pour objectif de valoriser ce travail de thèse par un essai de conservation des rhizobactéries.

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIELS ET METHODES

1. Isolement des souches bactériennes et les conditions de cultures

Les souches bactériennes ont été isolées a partir de la rhizosphère dans plusieurs régions de l'est Algérien (Constantine, Mila, souk Ahrass, Sétif, Batna et Tebessa) dans la période 2010-2011.Le sol collecter et transférer au laboratoire pour l'utiliser dans l'isolement des bactéries.

Le sol a été dilué ensuite inoculer dans des tubes à essai contenant 5 ml du milieu semi solide NFB (Nitrogen Free Medium) enrichi par 0,05 g/l d'extrait de levure. Après 48Heures d'incubation à 30 °C, un voile de bactérie obtenu est transféré dans un milieu solide NFB.

Les colonies sont transférer dans un milieu solide NFB contenant l'extrait de levure, d'autres dans le même milieu mais avec le rouge Congo (milieu sélectif).Puis incuber pour 48 h à 30 °C.

2. Caractérisation morphologique et phénotypique des souches isolées

La caractérisation morphologique (forme et couleur des colonies) et le test de Gram (coloration de Gram) a été déterminé par une observation avec le microscope. D'autres paramètres ont été utilisés pour identifier les isolats (source de carbone et le pH). Les souches isolées ont été mit en croissance dans le milieu NFB puis incuber a différentes températures (27, 32, 40,45 et 50 °C). La croissance des souches a été observée après 72 heures d'incubation.

3. Résistance des bactéries à la salinité

Le milieu NFB est préparé avec différentes concentrations d'NaCl (100, 200, 300, 400, 500,600 et 700 mM). Les isolat sont inoculées séparément dans les différentes concentrations et incuber pendant 48 heures. Le taux de croissance est mesuré par spectrophotomètre à 620 nm.

4. Effets PGPR des souches

4.1. Production d'AIA

Les bactéries sont mises en culture toute une nuit dans le milieu LB liquide à l'obscurité à 30 °C. Les cellules bactériennes sont récupérer par centrifugation à 8000 xg pendant 10 minutes.1 ml du surnagent est mélanger avec 2 ml du réactif Salkowski's, puis incuber à température ambiante à l'obscurité pendant 30 minutes. L'obtention de la couleur rose est un indicateur de production d'AIA.

4.2. Production d'ammonium

Les bactéries isolées ont été testées pour leur capacité à produire l'ammonium dans le peptone water. Une culture fraiche des bactéries est inoculer dans 10 ml de peptone water est incuber pendant 48 à 72 heures à 30 °C. Après incubation 0,5 ml du réactif Nessler's est ajouté a ces tubes. L'apparence de la couleur jaune prouve que le test est positif pour la production d'ammonium.

4.3. La solubilisation du phosphate

La solubilisation est détecter par la formation d'un halos tout au tour des colonies bactériennes dans un milieu contenant le phosphate insoluble, et incuber 5 jours à 30 °C.

5. Caractérisation moléculaire des souches isolées

5.1. Extraction de l'ADN génomique

Cette partie du travail a été réalisée au laboratoire LSTM (Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes) à Montpellier, France.

L'amplification de l'ADNr 16S a été réalisé directement sur une seule colonie en utilisant la procédure suivante ; une colonie prise d'une plaque de gélose avec un cure-dents ou une anse stérile ensuite remise en suspension dans 20 µl d'eau ultra pure stérile et chauffé à 95 °C pendant 10 minutes pour permettre la lyse cellulaire ; 2 µl de cette suspension de cellules lysées a été utilisée pour la réaction en chaine par polymérase (PCR) (Renato et *al* .,1995).

5.2. Amplification des séquences d'ADNr 16S

L'ADN total est amplifié par la réaction de polymérisation en chaine (PCR) dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 2 µl d'ADN dilué au dixième, tampon 5X, DNTPs, Taq polymerase et les amorces 2 µl Forword et 2 µl de primer Reverse. Le couple d'amorces utiliser pour l'amplification sont : Az16S-D (Forword, 5'CCGCGGTAATACGAAGGGGGC), (Reverse, 5'GCCTTCCTCCGGCTTGTCACCGGC). La taille du fragment d'ADNr 16S attendu est 670 paires de bases (pb).

Un témoin négatif, dans lequel l'ADN est remplacé par l'eau pure, est utilisé pour vérifier l'absence de contamination d'ADN.

5.3. Migration sur gel d'agarose et purification des produits d'amplification

Les produits d'amplification obtenu par PCR sont déposés pour migration sur gel d'agarose à 1% (W /V) afin de séparer les fragments d'ADN de différentes tailles. Le Bromure d'éthidium (agent intercalant des bases azotées) est ajouté au gel d'électrophorèse afin de permettre la visualisation sous lampe UV des ADN amplifiés.

La migration sur gel se fait dans une cuve d'électrophorèse contenant du Tampon TAE 0.5 %, sous une tension de 100 volts pendant 45 min. Le marqueur de taille utilisé est le Smart Ladder 1Kb (Eurogentec), permettant de vérifier la taille du fragment amplifié. Les gels d'électrophorèse sont révélés sous une lampe UV et photographiés. Les bandes d'ADN identifiées correspondant à la taille attendue sont découpées au scalpel et récupérées pour en extraire l'ADN. La purification des ADNr 16S amplifiées est réalisée à l'aide d'un kit de purification (extraction du gel) (QIA quick® Gel Extraction Kit, QIAgen. Courtaboeuf, France).

Le dosage de l'ADN purifié est réalisé par spectrophotométrie (Nano Drop ND-1000), une quantité d'ADN minimal (10 ng/µl) est nécessaire pour permettre la réaction de séquençage.

5.4. Analyse des séquences d'ADN obtenus

Le séquençage du produit de PCR purifié est réalisé par Genoscreen. Pour le séquençage, l'amorce Forword : Az16S-D a été défini .A la réception des éléctrophorégrammes, les séquences 16S sont corrigées et les informations sont traitées à l'aide du logiciel Chroma pro. Les séquences issues sont copiées sous format Fasta, pour effectuer une recherche par Blast-N (Logiciel NCBI. Blast), l'interrogation des données en ligne de la banque de gène : GenBank. L'existence de banque d'ADNr 16S très importante et du logiciel d'alignement Blast permet de situer la séquence d'ADN ribosomal inconnue par rapport aux séquences des souches connues provenant de la base de données GenBank. Quatre paramètres d'homologie (Total score, query coverage, E value, max ID) permettent d'estimer et de valider la robustesse des résultats. Les séquences obtenue est comparer avec celles qui existe dans NCBI database, vont servir pour la création d'arbre phylogénique des souches isoler utilisant DocGen Mega 4.

6. Recherche de la présence du gène *nifH*

L'activité nitrogénase, caractéristique des microorganismes fixateurs d'azotes peut être mise en évidence par l'analyse du gène *nif*H, qui est le gène codant pour la dinitrogénase réductase.

6.1. Extraction d'ADN

Une anse de cellules d'*Azospirillum* a été suspendu dans 20 µl d'eau stérile dans des tubes Eppendorf pour préparer l'ADN à la réaction polymérase en chaine(PCR).Les cellules en suspension ont été mis à ébullition dans l'eau pendant 5 min pour la lyse cellulaire. Les débris cellulaires ont été sédimenté par centrifugation à 13,000 rpm pour 1min à température ambiante, et 2 µl du surnageant a été utiliser comme matrice pour la PCR.

6.2. Amplification par une double PCR (Nested PCR)

Le fragment du gène *nifH* a été amplifié par l'utilisation d'une double PCR. La première PCR a été performer avec l'amorce forward : *nif*H (forA) (GCIWTITAYGGNAARGGNGG) et l'amorce reverse : *nif*H (rev) (GCRTAIABNGCCATCATYTC).La seconde PCR (double PCR) a été performer avec l'amorce forward : *nif*H (forB) (GGITGTGAYCCNAAVGCNGA) et le même amorce reverse : *nif*H (rev), selon Widmer et *al.,*(1999).

La première PCR a été réalisé avec 40 cycles et la seconde PCR avec 35 cycles.1µl du produit de la première PCR a été utilisé comme amorce pour la seconde PCR.

Après la dernière étape, la qualité et la quantité de cette amplification sont ensuite vérifiées par migration des produits de la PCR sur un gel d'agarose à 2 %.La taille du fragment attendu est de 370≈380 pb (Widmer et *al*., 1999).

7. Stérilisation, Germination et Inoculation des graines de blé dur

Une variété de blé dur (*Triticum durum* Desf) a été choisi : GTA/DUR. Les graines de blé dur ont été stérilisées d'abord dans l'éthanol 70 % durant 20 secondes, puis émergées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % pendant 20 minutes suivi de plusieurs rinçages par l'eau distillée stérile. Enfin, les graines stériles ont été placées dans des boites de pétri stérile pour germination dans des conditions stérile a l'obscurité durant 48 heures. Après germination, les graines sont inoculées par une suspension bactérienne (souches bactérienne misent en culture dans le milieu LB liquide durant 48 heures d'incubation avec agitation 120 rpm à 30 °C), d'une façon à mettre 1ml pour chaque graine. Des graines non inoculée ont été utilisées comme témoin.

8. Induction des paranodules

Après la phase d'inoculation qui a durée une nuit, les graines ont été placées dans des tubes en verre contenant un mélange stérile (sol, terreau, sable).Une partie de l'essai a été irriguer par une solution nutritif (milieu n-free liquide) stérile. L'autre partie a été irriguée avec la solution nutritif contenant une concentration du 2,4-D (graines inoculées et non inoculées) pour l'obtention des paranodules. L'essai a été placé dans la chambre de culture dans des conditions contrôlé (photopériode 16 heures, température entre 25 et 28 °C, humidité entre 30% et 40%) et suivi pendant 6 semaines (45jours).

9. Détermination de la teneur en azote dans les feuilles de blé dur

Dosage de l'azote total des feuilles a été réalisée en utilisant la méthode Kjeldahl pour le sol et l'analyse des plantes tel que décrite par Sertsu et Bekele (2000). Les Feuilles séchées provenant de chaque pot (plante inoculée et non inoculée, et traitée ou non traitée avec 2,4-D) ont été réduits en poudre à l'aide d'un moulin à café et tamisé à travers tamis de 0,5 mm. À partir de chaque échantillon de 0,2 g a été pesé et soumis à une digestion Kjeldahl pour le dosage de l'azote total.

10. Etude microscopique

Les nodules (ou paranodules) obtenu après inoculation du blé dur avec des souches d'*Azospirillum*, ont été prélevé nettoyer et conservés dans le glycérol (50%).

Ces nodules ont été placés et orienté dans l'agarose à 3 %, une observation à la loupe binoculaire a été réalisée. Les coupes microscopique sont réalisés ou Vibratome avec une épaisseur de 30 µm puis coloré avec Syto 13 (1/1000 dilué) pendant 15 min suivi d'un rinçage à l'eau distillée pendant 15 min. Les coupes colorées ont été montées entre lame et lamelle dans du PBS 10 % glycérol (phosphate Buffer Saline). Une première observation des coupes est réalisée au macroscope (lumière blanche) a fin de détecté les coupes d'intérêt. Puis la microscopie (confocal) pour l'imagerie des coupes.

11. Induction des paranodules par *Frankia* CcI3

Les graines de blé dur de la variété Cirta sont stérilisées avec de l'éthanol 70 % (20 secondes) suivi de 30 minutes dans l'hypochlorite de sodium 30% puis rincées 5 fois avec de l'eau distillées stérile et avec 1 minute d'intervalle (Saatovich 2006). Les graines stérilisées sont ensuite déposées dans des boites de pétri, stérilisées au préalable dans l'étuve à 180 °C pendant

1 heure, tapissées de papier absorbant humidifié avec de l'eau distillée stérile. Les boites de pétri sont mises dans des conditions stériles (chambre de culture) et à l'obscurité pendant 48 heures (phase de germination).

Les graines germées sont transférées, soit dans des bouteilles en plastique (1l), lavées à l'hypochlorite de sodium, contenant la solution hydroponique BD (Broughton & Dillworth), soit dans des bouteilles contenant le sable stériles. Après une semaine de croissance, les plantes sont inoculées avec l'actinomycète *Frankia* CcI3. Des plantes témoins sont utilisées comme contrôles. Ainsi, une concentration de 0,4 mg/l du 2,4-D est additionnée.

Sous une hotte, 20 ml de la suspension de réserve de l'actinomycète *Frankia* CcI3 sont mis dans un tube et centrifugés (4000 rpm, 20 minutes). Le culot est repris dans 5 ml d'eau distillée afin de casser les hyphes de *Frankia*. 15 ml de milieu BAP sont ensuite ensemencés par ces hyphes cassés, puis incubé dans l'étuve à 28 °C pendant 6 à 7 heures sous agitation (120 rpm). Cette dernière est utilisée pour inoculer les plantules.

12. Etude de stress hydrique sous serre

12.1. Préparation de la solution d'inoculation

Les souches PGPR *Azospirillum brasilense*, *Bacillus sp.* et *Frankia CcI3* ont été choisies pour ce travail. Les bactéries misent en culture durant 48 heures dans le milieu LB dans des tubes de 15 ml. Après la phase d'incubation, les souches en cultures ont servi pour inoculer des milieux de culture dans des Erlenmeyers (150 ml) et incubées encore une fois pendant 24h à 30°C avec agitation (120 rpm). La suspension bactérienne récupérée ainsi a été utilisé pour inoculée les graines germé de blé dur.

12.2. Germination et inoculation des graines de blé dur

L'étude porte sur une variété de blé dur introduite : GTA/DUR, et une locale : WAHA. Des graines de blé dur similaire sont sélectionnées, rincées à l'eau distillée, immergées dans de l'éthanol à 70 % pendant 15 secondes puis rincées à nouveau à l'eau distillée stérile.

Les graines sont ensuite immergées dans de l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 15 minutes puis lavées à l'eau distillée stérile 5 fois. Enfin, les graines sont déposées dans des boites de pétri stériles et incubées à l'obscurité à 25 °C pour germination durant 48 h (longueur du coléoptile 3-5mm). Les graines germées sont inoculées avec la suspension bactérienne durant une nuit à l'obscurité. Les graines non inoculées sont utilisées quand à elles comme contrôle.

12.3. Plantation et traitement

L'expérience est basée sur un dispositif comportant un niveau de stress sévère (12% de CC) et une partie est consacrée aux témoins, 12 répétitions sont consacrées pour chaque traitement. Les pots sont remplis par un mélange stérile de 1/3 de sol agricole, 1/3 de terreau et 1/3 de sable. Dans chaque pot, 2 plantes sont repiquées. L'expérience est placée sous serre sous conditions contrôlées de température (24-26°C) et d'humidité 50%. Les pots sont irrigués une fois par semaine avec une solution nutritive selon leur poids à 100% de la capacité au champ. Après 50 jours de plantation, un stress hydrique est appliqué par arrêt total d'irrigation jusqu'à l'obtention du niveau de stress (12% de CC).

12.4. Paramètres étudiés

12.4.1. Paramètres physiologiques

A. La teneur relative en eau (TRE « % »)

La teneur relative en eau des feuilles est déterminée par la méthode décrite par Barrs, (1968). Selon cette méthode, les feuilles sont coupées à la base du limbe, pesées immédiatement pour obtenir leur poids frais (PF), misent ensuite dans des tubes à essai remplis d'eau distillé et placées à l'obscurité dans un endroit frais. Après 24h, les feuilles sont retirées, passées dans un papier buvard pour absorber l'eau de la surface puis pesées de nouveau pour obtenir le poids de la pleine turgescence (PT). Les échantillons sont enfin mis à l'étuve réglée à 80°C pendant 48h et pesés pour déterminer leurs poids sec (PS). La teneur relative en eau est calculée par la formule de Clark et Mac-Caig (1982) :

$$TRE\ (\%) = [(PF\text{-}PS) / (PT\text{-}\ PS)].100$$

B. Mesure de la résistance stomatique (Rs « m2.s/mol »)

La résistance stomatique au niveau des feuilles est mesurée à l'aide d'un Poromètre type Delta Devices MK3. La lecture se fait par l'insertion de la partie médiane de la feuille dans la pince (Herbinger et *al.*, 2002). Les données de la résistance stomatique sont stockées dans l'appareil de mesure et ensuite transférées vers un ordinateur pour leur traitement.

C. *Mesure du taux de chlorophylle totale (TCT« unité de SPAD »)*

Le taux de chlorophylle au niveau des feuilles est mesuré à l'aide d'un chlorophylle-mètre SPAD 502 de Minolta (Nouri, 2002). Celui-ci est utilisé pour évaluer la teneur en azote des feuilles puisque la majeure partie de l'azote est contenue dans la chlorophylle. Les valeurs classiquement retrouvées se situent entre 0 et 50 (unités SPAD). Les valeurs mesurées consiste effectuer trois prises de mesure au niveau de la feuille sur trois différents parties (sommet, milieu, et base). La moyenne des trois valeurs s'affiche sur l'écran à la fin en unité SPAD.

D. *Mesure de la fluorescence chlorophyllienne*

La fluorescence chlorophyllienne est mesurée à l'aide d'un fluorimètre portatif modèle FMS, le Plant Efficiency Analyser (PEA) permettant de mesurer la fluorescence avec une résolution de 10 secondes. Les mesures sont effectuées sur les feuilles attachées.

Les données sont stockées dans l'appareil de mesure et ensuite transférées vers un ordinateur pour leur traitement. La lecture s'effectue de manière à placer la feuille à l'obscurité, des clips sont positionnés au moins 30 mn avant la mesure.

12.4.2. Paramètres biochimiques

A. *Dosage de la proline (Prol « µg/100mg MF »)*

La proline, indicateur de stress, ou acide pyrrolidine 2-carboxylique est l'un des vingt principaux acides aminés qui entrent dans la constitution des protéines. La proline est facilement oxydée par la ninhydrine ou tricetohydrindène. C'est sur cette réaction que se base le protocole de mise en évidence de la proline dans les échantillons foliaires (El Jaafari, 1993). La méthode suivie est celle de Rasio et *al*., (1987). Elle consiste à prendre 100 mg de matière fraîche dans des tubes à essai contenant 2 ml de méthanol à 40%. Le tout est chauffé à 85°C dans un bain-Marie pendant 60mn. (Les tubes sont recouverts de papier aluminium pendant le chauffage pour éviter la volatilisation de l'alcool). Après refroidissement, 1 ml d'extrait est prélevé auquel sont ajoutés :

- ✓ 1 ml d'acide acétique (CH3COOH) ;
- ✓ 25 mg de ninhydrine (C6H6O4) ;
- ✓ 1 ml de mélange contenant :
- ✓ 120 ml d'eau distillée ;
- ✓ 300 ml d'acide acétique ;
- ✓ 80 ml d'acide orthophosphorique (H3PO4.d=1.7).

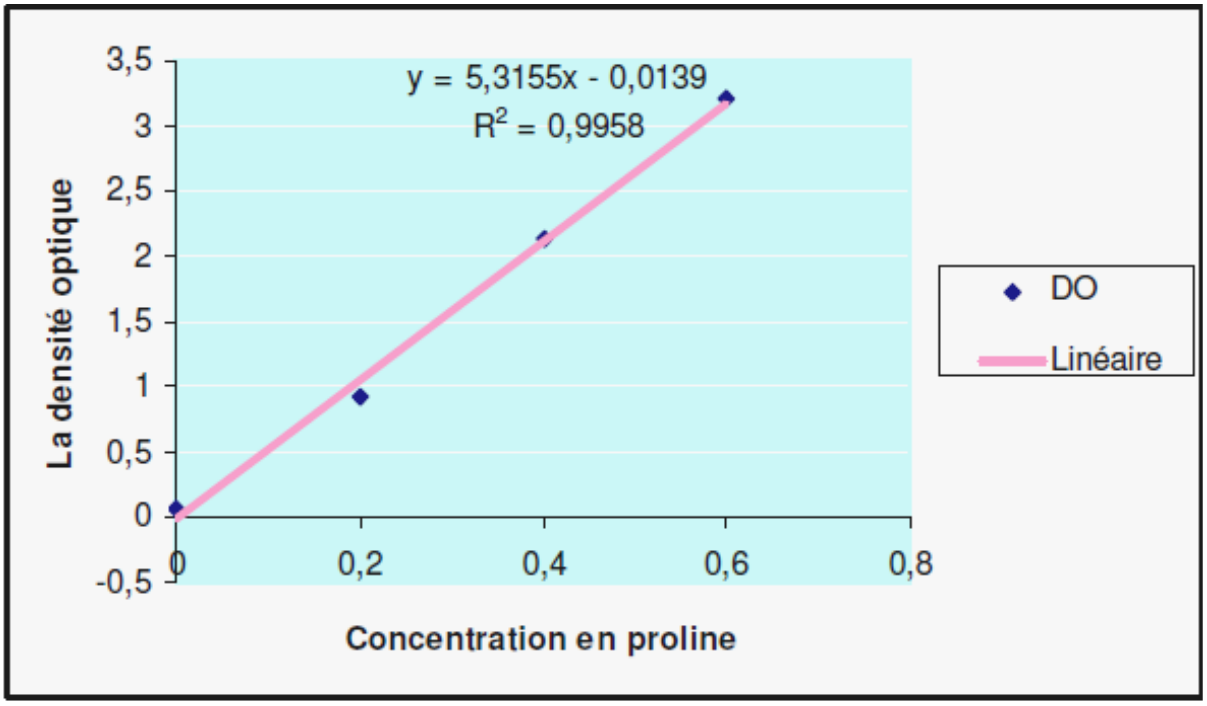


Figure 08 : Courbe étalon du dosage de la proline

La solution obtenue est portée à ébullition pendant 30 mn à 100°C qui commence alors à virer au rouge. Après refroidissement, 5 ml de toluène sont rajoutés à la solution qui est agitée, deux phases se séparent (une phase supérieure à la couleur rouge qui contient la proline et une phase inférieure transparente sans proline). Après avoir éliminé la phase inférieure, la phase supérieure est récupérée est déshydratée par l'ajout d'une spatule de Sulfate de Sodium Na_2So_4 anhydre (pour éliminer l'eau qu'elle contient). La détermination de la densité optique (Do) est effectuée ensuite à l'aide d'un spectrophotomètre (type 20D) sur une longueur d'onde de 528nm. Les valeurs obtenues sont converties en taux de proline par le biais d'une « courbe étalon » (Figure 08), préalablement établie à partir d'une série de solution de concentration en proline connue. Cette courbe est utilisée pour déterminer les teneurs en proline dans les feuilles des plantes.

A. Dosage des sucres solubles (Suc) « µg/100mg MF »)

Les sucres solubles totaux (saccharose, glucose, fructose, leurs dérivés méthyles et les polysaccharides) sont dosés par la méthode au phénol de Dubois et *al*., (1956). Elle consiste à prendre 100 mg de matière fraîche, placées dans des tubes à essais, auxquels sont ajoutés 3 ml d'éthanol à 80% pour faire l'extraction des sucres, le tout est laissé à température ambiante pendant 48h à l'obscurité. Au moment du dosage, les tubes sont placés dans l'étuve à 80°C pour

faire évaporer l'alcool, par la suite, 20ml d'eau distillée sont ajouté à l'extrait dans chaque tube, c'est la solution à analyser.

Dans des tubes à essais propres, 2ml de la solution à analyser sont déposés, auxquels est ajouté 1ml de phénol à 5% (le phénol est dilué dans de l'eau distillée) ; 5ml d'acide sulfurique concentré 96% sont ensuite rajouté rapidement tout en évitant de verser de l'acide contre les parois du tube. Une solution jaune orange à la surface est obtenue alors, qui est passé au vortex pour homogénéiser la couleur de la solution. Les tubes sont laissé tels quels pendant 10 mn et puis placer au bain-Marie pendant 10 à 20mn à une température de 30°C (La couleur de la réaction est stable pendant plusieurs heures). Les mesures d'absorbances sont effectuées à une longueur d'ondes de 485 nm. Enfin des résultats de densités optiques sont rapportés sur une courbe étalon des sucres solubles (exprimer en glucose) (Figure 09).

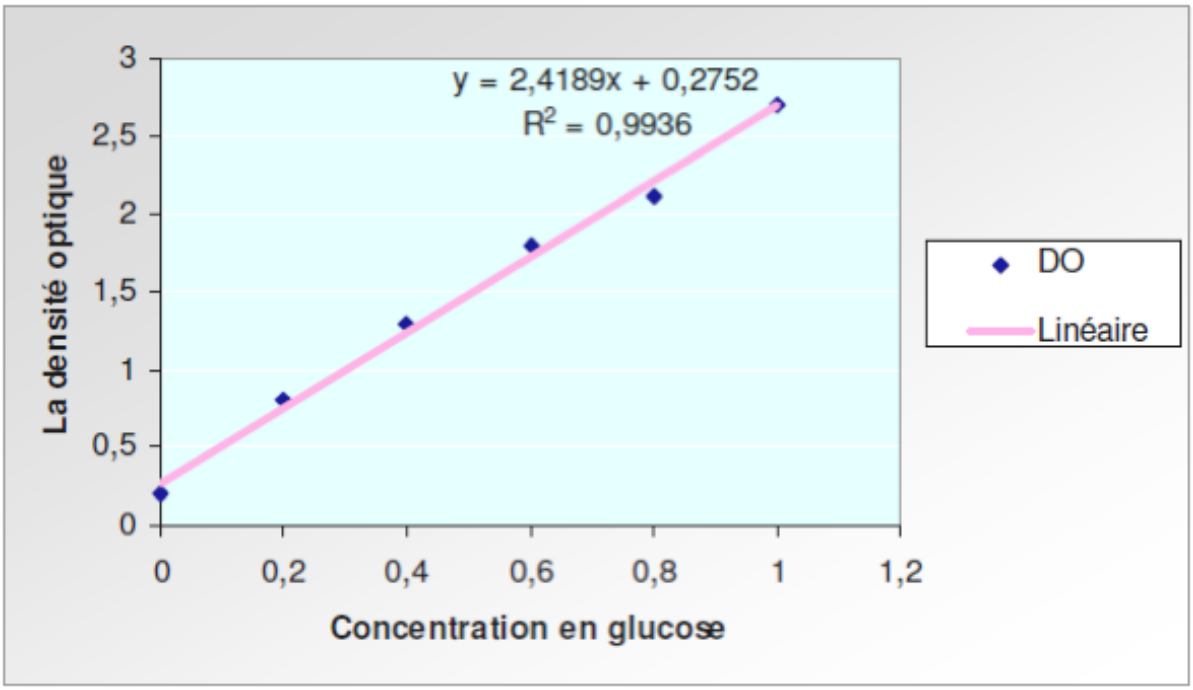


Figure 09 : Courbe étalon du dosage des sucres solubles.

12.5. Evaluation statistique

Une analyse statistique (ANOVA) des données est utilisée pour valoriser les résultats obtenus par l'utilisation du logiciel spécifique Excel Stat 2009. Les groupes homogènes sont donnés par le logiciel Excel Stat 2009 en utilisant le test NEWMAN-KEULS.

12.6. L'analyse des protéines totales par SDS-PAGE

La séparation des protéines présente dans notre étude est faite à l'aide d'un gel SDS-PAGE permettant une séparation des protéines dans le gel selon leur poids moléculaire. La technique d'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de SDS est réalisée selon la méthode de Laemmli, (1970) citée par De Leonardis et *al.*, (2007). Une variante de cette technique consiste à utiliser du SDS (Sodium Dodécylsulfate) qui est un détergent anionique fort. Il a la propriété de défaire la structure spatiale en se fixant sur les protéines et de les charger de la même façon permettant ainsi de les séparer uniquement en fonction de leur masse moléculaire, il donne la charge négative aux protéines (aux chaînes de polypeptides) qui permet la migration des protéines vers l'anode (Dicko, 2006).

Avant de procéder à la dénaturation des protéines avec du SDS, un agent réducteur, le β-mercaptoéthanol est utilisé afin de réduire les ponts désulfures des protéines, rendant ainsi les protéines à l'état monomérique. Par la suite, l'acétone va permettre de précipiter les protéines vers le bas et de solubiliser les molécules organiques comme les acides gras ;…etc.

Cette technique permet de déterminer le poids moléculaire des sous unités formant une protéine ainsi que le degré de purification atteint à chaque étape (Jangpromma et *al*., 2007). Pour réaliser cette technique deux gels sont utilisés : un gel de séparation et un gel de concentration, possédant des concentrations d'acrylamide bien spécifiques suivant les besoins de la séparation (Annexe 05).

12.6.1. Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales des feuilles et des racines du blé dur se fait par la méthode décrite par De Leonardis et *al.*, (2007) comme suit :

- ✓ Broyer à l'aide d'un mortier et d'un pilon 100mg de feuilles et de racines des échantillons témoins et stressés, pesé le jour même dans de l'azote liquide. Ce matériel végétale ainsi préparé peut être stocké à - 20°C (Zukas et Breksa, 2005).
- ✓ Ajouter au broyat 1ml de la solution de précipitation (solution A (Annexe.03)) et homogénéiser dans un tube Eppendorf de 1.5 ml.
- ✓ Laisser reposer pendant 1h à - 20°C.
- ✓ Centrifuger pendant 15mn à 4°C et à 13 000 rpm.
- ✓ Eliminer le surnageant délicatement en renversant le tube (le culot ne doit pas décoller).
- ✓ Laver les culots avec 1ml de la solution de rinçage (solution B (Annexe.03)).

- ✓ Laisser reposer 1h à - 20°C puis éliminé le surnageant délicatement (on peut faire une petite centrifugation si on voit que le culot s'est un peu décollé).
- ✓ Sécher les culots dans un dessiccateur pendant 15 à 30mn à 60°C (il ne faut pas qu'ils soient trop secs). Réduire en poudre les culots (à l'aide d'une baguette en verre).
- ✓ Reprendre la poudre dans un volume de 100µl du tampon de solubilisation *Laemmli buffer* (Annexe.03).
- ✓ Passer au vortex les tubes Eppendorf en mettant 5 min à 100°C, afin de favoriser la dénaturation des protéines.
- ✓ Centrifuger les tubes Eppendorf à 10 000 rpm pendant 10mn à 20°C (température ambiante). Stocker à -20°C.
- ✓ Juste avant les dépôts, décongeler les échantillons, mélanger doucement et centrifuger à 10 000 rpm pendant 10mn à 20°C.

12.6.2. Dépôt des échantillons et migration

Déposer 40 µl d'échantillons par puits à l'aide d'une microseringue. Un puits est réservé pour le marqueur de taille de poids moléculaires connus (Annexe 04). Les cuves sont remplies de tampon de migration (Annexe 04).

Les électrodes de la cuve sont reliées au générateur, une tension électrique de 80 mA est appliquée entre les électrodes (Dicko, 2006). Une fois la migration terminée, il faut attendre jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bord inférieur des plaques (Approximativement 1h à 1h30).

La migration se fait de la plus petite molécule de polypeptide à la plus grande molécule, la vitesse de migration de la dernière molécule est plus faible que la première, et la masse moléculaire est exprimée en KDa.

12.6.3. Révélation des gels

La révélation est faite par coloration et la fixation pendant toute une nuit dans une solution de coloration (Annexe 04). La décoloration est réalisée par plusieurs rinçages à l'eau distillée.

12.6.4. Exploitation des résultats

L'interprétation de ces gels est faite grâce à l'utilisation du logiciel ***Photocapt 8*** qui donne le poids moléculaire en fonction du marqueur de taille (PM). La présence des bandes est codée par « 1 » et leur absence par « 0 ».

13. Détermination de la longueur racinaire

L'élongation racinaire est étudiée par la germination des graines de blé dur en utilisant la méthode décrite par Dey *et al.,* (2004) et Belimov (2002), pour déterminer l'activité ACC désaminase. La surface des graines de blé dur (GTA/DUR) est stérilisée avec l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 15 minutes puis rincer avec trois lavages successifs d'eau distillée stérile. Toutes les graines sont mises en germination à 25°C dans une gélose d'agar (1%) pendant 48h. Les graines germées sont séparées et déposées durant 1h dans 20 ml de culture bactérienne (*Azospirillum brasilense*, *Bacillus sp. et Pseudomonas fluorescence*), préparée préalablement dans le milieu LB et le milieu DPM (*Frankia CcI3*) pendant 48h.

Ainsi, les graines inoculées sont déposées dans des boites de pétri d'une façon à mettre 3 graines par boite. Les boites de pétri sont incubée à l'obscurité à 26 °C, les graines non inoculées sont utilisées comme contrôle. La longueur racinaire des graines est mesurée après 5 jours d'incubation.

RESULTATS

Chapitre 1 : Caractérisations phénotypiques et moléculaires des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes isolée à partir de la rhizosphère de blé dur (*Triticum durum* Desf.) en Algérie.

Ce chapitre constitue la première partie de mon travail de thèse : les caractérisations phénotypiques et moléculaires des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes isolée à partir de la rhizosphère de blé dur (Triticum durum Desf.) en Algérie.

Il concerne la caractérisation des bactéries isolées dans différentes régions en Algérie par des techniques phénotypique et moléculaires dans le but de les attribuer à un genre et une espèce donnée.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de biochimie génétique et biotechnologie végétales (BGGV) au sein de l`équipe de biotechnologie et amélioration des plantes à l'université Constantine 1. La partie moléculaire de ce travail a été réalisée en collaboration avec le laboratoire CIRAD-LSTM (laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes) à Montpellier - France.

Dans cette étude, j`ai effectué l`ensemble des expériences phénotypiques ainsi que les tests concernant les effets PGPR des isolats. J`ai réalisé également les expériences d`inoculation de blé dur avec Azospirillum brasilense, sous serre.

Cette partie a fait l`objet d`une publication dans le journal : African journal of microbiology reseasrch.

1. Problématique

Les travaux de recherche étudiant les relations PGPR / plante ont constitué, et constituent toujours un domaine de recherche actif. Ceux-ci génèrent régulièrement de nouveaux intérêts agronomiques et nutritionnels, ainsi que de nouveaux outils pour la recherche scientifique.

Ces dix dernières années, *Azospirillum brasilense* présenté comme faisant partie des PGPR (Glick and Bashan, 1997) a fait l'objet de plusieurs études. La découverte des interactions entre *Azospirillum brasilense* et la plante hôte a permis d'étudier spécifiquement le rôle de celui-ci au niveau racinaire et aérien. Cependant, peu d'études n'ont décrit le rôle de cette bactérie chez le blé dur, une céréale pourtant importante du point de vue agronomique et nutritionnel.

Certaines études ont également démontré la capacité des PGPR à fixer l`azote atmosphérique et à améliorer la production de blé dur. Ainsi, *Azospirillum brasilense* semblerait également présenter chez les céréales, sur la base de certaines données préliminaires, plusieurs rôles bénéfiques mais a été très peu étudié dans le cas du blé (Renato *et al.*, 1995).

Cette partie de la thèse va s'attacher à identifier les isolats des rhizobactéries à partir de différents sols pour les caractériser phénotypiquement. Cette caractérisation consiste à déterminer la couleur des colonies, leur nature (Gram positif ou négatif), leurs pH optimum et enfin leur capacité à survivre à des températures extrêmes ou à des milieux salins.

S'en suit une caractérisation moléculaire de ces souches bactériennes basée sur le gène 16S rDNA pour les classer selon un genre et une espèce connue, de plus l'étude de la présence du gène nif a pour rôle de montrer si ces souches ont la capacité de fixer l'azote.

2. Publication et principaux résultats

Phenotypic and molecular characterization of Plant growth promoting Rhizobacteria isolated from the rhizosphere of wheat (*Triticum durum* Desf.) in Algeria

Cette publication présente les données relatives aux caractérisations phénotypiques et moléculaires des PGPR isolées en Algérie. Ces rhizobactéries ont démontré leur capacité à favoriser la croissance des plantes.

La caractérisation phénotypique des rhizobactéries a été réalisée par plusieurs approches : la coloration de Gram qui a révélé que ces rhizobactéries sont tous à Gram négatif, puis on a fait croitre ses souches dans plusieurs milieux de culture avec des concentrations différentes de NaCl et on a montré que la plupart de ces bactéries possèdent la capacité de croitre dans des milieux salins avec des concentrations élevée (700 mM NaCl). Ensuite on a mis en culture ses souches dans des milieux à différent pH, ainsi un pH optimal de 6.8 a été démontré. Une étude avec plusieurs sucres utilisés comme source de carbone a été effectuée pour voir la possibilité de croissance de ses souches avec la plupart de ses sucres et donc on a remarqué que ses souches isolées possèdent une sélectivité pour les la majorité des sucres.

L'étude des propriétés PGPR, montre que des rhizobactéries se comportent comme des PGPR. De façon intéressante, ces bactéries peuvent synthétiser l'AIA et l'ammonium mais également solubiliser le phosphate. Ces propriétés confèrent donc la caractéristique de PGPR à ces rhizobactéries.

La technique du 16S rDNA utilisée a permis une identification moléculaire de ces bactéries à travers la révélation des gels qui montrent que ces souches ont toutes un 16S rDNA de 680 pb qui correspond au genre *Azospirillum.* Par la suite, le séquençage de ces souches a pu confirmer que ces rhizobactéries sont bien des *Azospirillum brasilense* avec un taux d'identité de 98 à 100%.

Enfin, nous avons testé l'efficacité d'*Azospirillum brasilense* sur la croissance du blé dur et ceci par leur inoculation sous conditions contrôlé, celle-ci a montré une augmentation de la croissance racinaire et aérienne accompagnée d'une fixation biologique de l'azote atmosphérique mesuré par la méthode Kjeldahl.

academicJournals

Vol. 7(23), pp. 2893-2904, 4 June, 2013
DOI: 10.5897/AJMR12.2028
ISSN 1996-0808 ©2013 Academic Journals
http://www.academicjournals.org/AJMR

African Journal of Microbiology Research

Full Length Research Paper

Phenotypic and molecular characterization of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from the rhizosphere of wheat (*Triticum durum* Desf.) in Algeria

Benmati Mahbouba[1,2]*, Le Roux Christine[3], Belbekri Nadir[1,2], Ykhlef Nadia[1,2] and Djekoun Abdelhamid[1,2]

[1]Université Constantine1, Faculté des sciences de la nature et de la vie. Constantine Algérie.
[2]Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologie Végétales, équipe biotechnologie végétales, Constantine 25000, Algérie.
[3]CIRAD, UMR LSTM, F-34398 Montpellier Cedex 5, France.

Accepted 10 May, 2013

Several strains were isolated from rhizosphere of wheat in Eastern Algeria. All the 10 strains (Azo4, Azo5, Azo6, Azo7, Azo8, Azo10, S1, S2, S3 and S9) were identified; based also on the characteristics which are not only morphological, characteristics such as shape but physiological ones: optimal temperature, pH optimum and NaCl tolerance. These isolates were screened *in vitro* for their growth promoting traits like production of indole acetic acid (IAA), ammonia (NH_3) and solubilize phosphate. The bacterial strains have an optimum growth pH equal to 6.8; in a broad temperature range (28 and 37°C). The molecular identification was done by simple PCR to amplification for 16S rDNA gene using primers AZ16S-D. Some strains (Azo4, Azo5, Azo6, Azo7, Azo8 and Azo10) have high identity with genus *Azospirillum* which indicates that these isolates belong to the *Azospirillum* genus, specially to species of *Azospirillum brasilense* A nested PCR approach performed with degenerate primers was used to amplify *nif*H gene fragments from the bulk DNA. The amplification product bands at the expected *nif*H gene fragment size are about 370 bp. Some isolates (S1, S2, S3, Azo4, Azo5, Azo6, S9 and Azo10) were considered by the nitrogen-fixing gene *nif*H detection of their genome. We managed to highlight the contribution between *A. brasilense* and durum wheat with inoculation experiments performed under greenhouse conditions showed that all *A. brasilense* (six strains) have a good report for growth of roots and plants and improve the production of durum wheat (*Triticum durum* var: GTA). These data demonstrate the importance of the test especially in programs to improve the quality of wheat in Algeria.

Key words: Rhizobacteria, indole acetic acid, ammonia, 16S rDNA, *Azospirillum brasilense, nif*H.

INTRODUCTION

Durum wheat is produced in many arid and semi arid regions of the world (Bogole et al., 2011); in Algeria, durum wheat has been extensively cultivated for many centuries; the species encountered a large diversification

*Corresponding author. E-mail: benmati.m@gmail.com. Tel: +213)561 22 68 10.

Abbreviation: PGPR, Plant growth promoting rhizobacteria, **PCR,** polymerase chain reaction, **LB,** medium Luria bertani; **bp,** base pairs; **IAA,** indole-3-acetic acid.

implied by the great diversity of climates that led to great genetic diversity of the species (Boudour et al., 2011). The term PGPR "plant growth promoting rhizobacteria" was first used by Joseph W. Kloepper in the late 1970s and has become commonly used in scientific literature (Vessey, 2003). It has been shown that PGPR were applied to the various cultures to promote growth, the emergence of seeds and to increase crop yields, and some have been commercialized (Dey et al., 2004; Herman et al., 2008; Minorsky, 2008). These rhizobacteria can improve the host by promoting the growth by biocontrol of plants diseases and sustainable agriculture. PGPR activity has been reported for strains belonging to several genera, such as *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* and *Bacillus* (Kloepper, 1993; Glick and Bashan, 1997). Several mechanisms have been proposed to explain how PGPR stimulate plant growth. These can be classified as direct or indirect mechanisms (Verma et al., 2010).

A direct mechanism occurs when metabolites or compounds synthesized by the bacteria were supplied to the plant such as phytohormones, or when bacteria facilitate the absorption of plant nutrients in the environment such as nitrogen. In the case of the indirect mechanism, bacteria protect plants against fungal pathogens of the soil or harmful bacteria (Kloepper, 1993; Glick, 1995; Lugtenberg et al., 2004). The immediate response to inoculation with PGPR in rhizosphere varies among bacteria, plant species, soil type, inoculum density and environmental conditions (Okan et al., 1997). Bacteria of the genus *Azospirillum* are Gram-negative and have different ways to fix nitrogen through partnerships with non-leguminous plants (cereals and grasses) from different geographical origins (Renato et al., 1995). *Azospirillum* strains that can be used as biofertilizers provide plants with nitrogen, help with phosphate solubilization production of phytohormones such as auxin, and regulate substances or sederophore (Bashan et al., 2004). The genus *Azospirillum* is characterized as a Gram negative, aerobic, nitrogen-fixing, and rod-shaped a-proteobacterium. *Azospirillum* species (spp.) have been isolated from rhizosphere soils and the roots of various plants around the world (Shime et al., 2011). Some strains of *Azospirillum* are reported as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) that can increase crop growth and yield (Okon and Labandera-Gonzalez, 1994; Okon and Vanderleyden, 1997).

A total of 15 species have been described in the genus *Azospirillum*: *A. amazonense* (Falk et al., 1985), *A. brasilense* (Helsel et al., 2006), *A. canadense* (Mehnaz et al., 2007a), *A. doebereinerae* (Eckert et al., 2001), *A. halopraeferens* (Reinhold et al., 1987), *A. irakense* (Khammas et al., 1989), *A. largimobile* (Ben Dekhil et al., 1997), *A. lipoferum* (Tarrand et al., 1978), *A. melinis* (Peng et al., 2006), *A. oryzae* (Xie and Yokota, 2005), *A. palatum* (Zhou et al., 2009), *A. picis* (Lin et al., 2009), *A.* were mainly isolated from soil and commonly in association with grasses and cereals (Kirchhof et al., 1997). However, the isolation of *Azospirillum* from plants and rhizosphere depends on the methods used in the laboratory and requires the use of selective media and morpho-physiological tests (Tarrand et al., 1978) (based for example on cell morphology, colony color, and the ability of nitrogen fixation); hence the diversity of isolates can be obtained (Han and New, 1998).

The advantage of the recent sequencing and DNA finger printing technology has facilitated the detection and identification of target microbes in the process of isolation in selective media and therefore reduced the morpho-physiological tests (Stead et al., 2000). The use of techniques for detection, identification and quantification of microorganisms based on PCR can be completed by a dependent culture and biochemical methods. The developments of specific species of *Azospirillum* were studied by Stoffels et al. (2001) by analysis of fluorescence *in situ* hybridization. However, this method can only detect physiologically active bacteria, and can not detect all the members who belong to the genus *Azospirillum*. At that time, they adopted specific oligonucleotides (primers) for the genus *Azospirillum* based on the conservation of the 16S rDNA gene sequence of *Azospirillum*. Using PCR amplification, primer sequences were quickly identifying the members of the genus (Shih et al., 2011). For evaluation of nitrogen-fixing populations in the environment, analysis of *nif*H, the gene encoding nitrogenase reductase, due to the vast phylogenetic differences among nitrogen fixers, the sequences of *nif*H genes have diverged considerably (Zehr et al., 1989), and even the DNA sequences encoding conserved protein regions may differ due to codon redundancy for most amino acids. The design of universal nifH primers requires a high degree of DNA sequence degeneracy and may result in reduced specificity during PCR amplification. However, the use of more sophisticated amplification protocols may make it relatively simple to study the complexity of nitrogen-fixing microorganisms in a given ecosystem.

The objective of the present study was to evaluate the properties and specificity of the strains isolate at different levels: (i) phenotypic and morphological identification of isolates; (ii) analysis of the molecular diversity and detection of gene *nif*H; and (iii) evaluation of inoculation between the *A. brasilense* and the durum wheat under controlled conditions.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of bacterial strains and culture conditions

The bacterial strains were isolated from the rhizosphere of durum wheat grown in the fields of several regions in Algeria (Ain El bey Constantine, El Khroub-Constantine (zoneA), El Khroub-Constantine (zoneB), El Khroub-Constantine (El Baraouia zone1), El Khroub-Constantine (El Baraouia zone2), Mila, Souk Ahrass, Setif, Batna and Tebessa), in the period of 2010 and 2011. Samples are collected at a depth of 20 to 30 cm, transported to the laboratory at low temperature (4°C) where they are processed for

the isolation of bacteria. The soil was left in NaCl buffer (0.85%) and diluted with water distilled and inoculated into tubes containing 5 ml of semi-solid medium (nitrogen free medium, NFB) with 0.05 g of yeast extract. After 48 h of incubation at 30°C, a loop of culture was transferred to fresh semi solid NFB medium (Dobereiner, 1995). The colonies were transferred on the solid medium NFB containing yeast extract, and also on the medium Congo red (0.5%), and incubated for 48 h at 30°C.

Phenotypic and morphological characterization of the strains isolated

Morphology and Gram staining was determined by microscopic observation (Myoungsu et al., 2005). Several parameters have been used to identify strains (carbon sources, different pH). Culture of the 10 isolates was performed on solid NFB medium and incubated at 27, 32, 40, 45 and 50°C. The change of growth and coloration were observed after 72 h of incubation.

Resistance of bacteria towards salinity

The medium NFB was prepared with different concentrations of NaCl (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 mM). The 10 isolates were inoculated separately and incubated for 48 h. The level of growth was measured by spectrophotometer at 620 nm.

Effect of PGPR strains

Production of IAA

Bacteria were grown overnight in liquid Luria-bertani (LB) medium in darkness at 30°C. Bacterial cells were recovered by centrifugation at 8000x *g* for 10 min. 1 ml of the supernatant was mixed vigorously with 2 ml of Salkowski's reagent, and incubated at room temperature in the dark for 30 min. The absorbance at 535 nm was measured (Benizri et al., 1998; Fischer et al., 2007). Development of Pink color indicated IAA production (Gangoir et al., 2012).

Production of ammonium

The isolated bacteria were tested for their capacity to produce ammonia in peptone water. Fresh culture of bacteria was inoculated in 10 ml of peptone water in tubes and incubated for 48 to 72 h at 36 ± 2°C. After 72 h, Nessler's reagent (0.5 ml) was added to bacteria suspension. Development of brown to yellow color was positively test for ammonia production (Yadav et al., 2010).

Solubilization of phosphorus

Solubilization was detected by the formation of transparent halos surrounding the bacterial colonies on a medium (NFB) containing insoluble phosphate (PO_4) after 5 days of incubation at 30°C (Ashrafuzzaman et al., 2009).

Amplification and sequencing of 16S rDNA

This part of the work was performed in the laboratory LSTM in Montpellier France. For 16S rDNA amplification, they resuspended a single colony in 20 µl of sterile water and heated to 95°C for 10 min to allow cell lysis. 2 µl of the lyses cell suspension was used for polymerase chain reaction (PCR) (Renato et al., 1995). The PCR was done as follows: initial denaturation at 96°C for 3 min followed by 35 cycles consisting of a 30" denaturation at 95°C, 30" at annealing temperature of 55°C, followed by a Az16S-D (Forward, 5'CCGCGGTAATACGAAGGGGGC3', and Az16S-D Reverse, 5'GCCTTCCTCCGGCTTGTCACCGGC3') primer extension at 72°C. Then, the PCR products were run on a 1% agarose gel (Sigma, France) in TAE buffer with a DNA size standard (Eurogentec Smartladder). The size of the amplificon by the primers was determined to be 670 bp (Shime et al., 2011). Amplified fragments were purified with a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, France). Sequencing was performed using a BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, USA) and reactions were analyzed on an automated DNA sequencer (Applied Biosystems model 310, Perkin Elmer Applied Biosystems).

The 16S rDNA sequences of *Azospirillum* spp. strains were corrected using the sequence viewer 4Peaks program from Mackintosh B.V. For multiple alignments and for phylogenetic tree building, the SeaView program version 4 was used (Gouy et al., 2010). This interface drives the Clustal Omega program and includes the BioNJ distance-based tree reconstruction method (Gascuel, 1997).

Search for the presence of the *nif*H gene

A loop ful of rhizobacteria cells was suspended in 20 µl of sterile water in an Eppendorf tube for preparing DNA for the PCR. The cell suspension was boiled in water for 5 min for lysing the cells. Cell debris was removed by centrifugation at 13,000 rpm for 1 min at room temperature, and 2 µl of the supernatant was used as a template for PCR. Fragments of *nif*H genes were amplified by using nested PCR. The first PCR was performed with the forward primer *nif*H (for A) (GCIWTITAYGGNAARGGNGG) and the reverse primer *nif*H (rev) (GCRTAIABNGCCATCATYTC). The second PCR nested was performed with the forward primer nifH (forB) (GGITGTGAYCCNAAVGCNGA) and the same reverse primer *nif*H (rev) according to Widmer (1999). The first PCR was performed for 40 cycles with a 25-ml reaction mixture containing 2 ml of purified bulk DNA was done as follows: denaturation for 11 s at 94°C and for 15 s at 92°C, annealing for 8 s at 48°C and for 30 s at 50°C, and extension for 10 s at 74°C and for 10 s at 72°C.

A final 10-min extension step at 72°C was performed after the cycling steps and before the samples was maintained at 4°C. The nested reaction was performed for 35 cycles with a 100-ml reaction mixture containing 2 ml of the first PCR product as the template. The quality and quantity of the amplification products were analyzed on 2% ultraPure agarose gels with a DNA 1 Kb ladder (Eurogentec Smartladder).

Seed sterilization and germination

Seeds of wheat (*Triticum durum* Desf.), collection GTA/DUR, with similar size and weight were washed with distilled water three times and soaked in alcohol of 70% for 20 s. The extra alcohol was removed and seeds were washed with sterilized water. Seeds were then sterilized for 15 min using sodium hypochlorite 3% and rinsed with sterilized water 5 times. The sterilized seeds were soaked in distilled water for 3 h and 15 of them were grown in sterilized Petri dishes for 48 h at 20°C in darkness.

Seedlings inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense*

Six isolates including Azo4, Azo5, Azo6, Azo7, Azo8 and Azo10

were selected for the experiment. The bacterial suspension was prepared in LB medium. After germination, wheat seedlings were inoculated wit 3 ml of bacterial inoculums. After 3 h, the extra inoculums were removed from tubes and the tubes were rinsed with distilled water. After the phase of inoculation, the germination seed were transferred into the pots containing sterile soil and n-free nutrient solution (10 g Malat, 1 g KH_2PO_4, 0.2 g $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.2 g NaCl, 0.005 g $FeSO_4$ $7H_2O$, 5 g Mannitol, 100 mg yeast extract (Azlin et al., 2005) and uninoculated seeds are irrigated also with n-free nutrient solution. The experiment was placed in the greenhouse under conditions controlled (temperature 25°C, 16 h photoperiod and humidity 30%). After three months of growth for greenhouse experiment, different parameters were measured to determine growth of plants: plant length (cm), plant weight (g), roots length (cm), roots weight (g), thousand seeds weight (g), rate of total chlorophyll (Spad Unit) and determination of nitrogen content in leaves wheat of durum (mg/ml).

Statistical analysis

For each of the durum wheat studied and each parameter analyzed, all the data collected were subjected to a one way analysis of variance (ANOVA). When *Azospirillum* strain factor had a significant effect on a given parameter, the means of the different treatments were ranked into homogeneous groups according to NEWMAN-KEULS test. All the statistical analyses were performed using Excel STAT Pro 2012.

RESULTS

Isolation of bacterial strains and culture conditions

Ten strains were isolated from the rhizosphere of different regions in eastern Algeria (Table 1). All isolated S1, S2, S3, Azo4, Azo5, Azo6, Azo7, Azo8, S9 and Azo10 were tested and observed (colony, color and shape). They show that all strains (S1, S2, S3, Azo4, Azo5, Azo6, Azo7, Azo8, S9 and Azo10) are Gram-negative (Table 1).

We noted that the 10 different strains have shown a formation of white veil in the subsurface environment and on the solid medium, small white colonies appeared as dense mucosa. This result was demonstrated in Table 1. The result showed in Table 1 found that strains isolated have a good growth in the five different temperatures used (27, 32, 40, 45 and 50°C), but some strains (Azo8, Azo10, S3 and S9) do not have growth at 50°C. Thus, some isolates (S1, S2, Azo5, Azo7, Azo8, S9 and Azo10) have a good growth and tolerate different pH levels (5.5, 6.0, 6.8, 7.0 and 7.5). However, isolates S3, Azo4 and Azo6 do not tolerate pH 5.5. This result was shown in Table 1. Concerning the use of different nitrogen source, we notice that the majority of strains use mannitol, fructose, sucrose and lactose; but Azo5 does not use sucrose and S3; and S9 does not use Lactose (Table 1).
The growth of the bacteria in the presence of different concentrations of NaCl shows that the strains tolerate up to 300 mM NaCl. We noticed that strains S1, S2, Azo4, Azo5, Azo7, Azo8 and S9 were very tolerant to the highest concentration of NaCl (Figure 1), but the growth rate was slightly lower compared to the other strains (S3 and Azo10) (Figure 1).

We also noted that among the 10 selected isolates, S1, S2, Azo5, Azo7, Azo8 and Azo10 had a good growth at concentration of NaCl equal to 400 mM.

Effect PGPR of strains

Isolated S1, S2, S3, Azo4, Azo5, Azo6, Azo7, Azo8, S9 and Azo10 were tested for their ability to produce IAA, ammonium and solubilization of phosphate. Results in Table 2 demonstrate the ability of isolates to synthesize IAA and ammonia with a production rate that changes from one strain to another, and can also solubilize phosphate.

Molecular characterization of isolates

Based on morphological and phenotypic characterization, several similar isolates were selected to facilitate the identification of *Azospirillum* by simple PCR. The distributions of isolates gave six strains of the genus *Azospirillum* and are very close to the species *A. brasilense*; other belongs to different genera of *Pseudomonas*, *Aeromonas* and *Stenotrophomonas.* About 670 bp fragments of the 16s rDNA gene was sequenced with primers Azo16S-D (Figure 2); then, the sequence obtained was analyzed using Blast search. Isolated Azo4, Azo5 and Azo6 showed high identity (98 to 100%) with *Azospirillum* genus. The phylogenetic position of the isolate is shown in Figure 3. It indicates that this isolate is clustering with the *Azospirillum* genus, especially to species of *A. brasilense*. *Azospirillum* members and the inter-genera phylogenetic difference were very limited.

Amplification of nifH gene fragment by using a nested PCR approach

The results were shown in Figure 4. The majority of strains amplification gives bands at expected nifH gene fragment size of approximately 370 ≈ 380 bp (Figure 4). We observed in Figure 4 the lanes: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 and 10 corresponding to S1, S2, S3, Azo4, Azo5, Azo6, S9 and Azo10. They give a good result to show a band in 370 to 380 bp according to DNA ladder. However, lanes 7 and 8 corresponding to Azo7 and S8 do not give a good result, they give unclear bands.

Effect of inoculation with Azospirillum brasilense on the different plants parameters of durum wheat (Triticum durum Desf. var: GTA/dur*) under greenhouse*

The results of the greenhouse experiments reported in

Table 1. The sites of the strains isolated and morphological and physiological characterization of isolates

Strain	Isolation site	Surveying point	Physiological characterization										Different nitrogen source					Morphological characterization		
			Temperature					Ph												
			27	32	40	45	50	5.5	6.0	6.8	7.0	7.5	M	S	F	L	G	Shape	Color	Gram
Azo4	El Khroub-Constantine (zone B)	36°15′49.31″N 6°39′19.37″E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Rod	White	Negative
Azo5	El Khroub-Constantine (El Baraouia zone 2)	36°16′29.86″N 6°40′27.64″E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Rod	White	Negative
Azo6	Ain El bey -Constantine	36°16′59.63″N 6°36′59.63″E	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	Rod	White	Negative
Azo7	Setif	36°10′59.91″N 5°26′13.51″E	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Rod	White	Negative
Azo8	Batna	35°32′16.97″N 6°04′47.69″E	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Rod	White	Negative
Azo10	Tebessa	35°25′52.84″N 8°03′12.71″E	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Rod	White	Negative
S1	El Khroub-Constantine (zoneA)	36°12′52.93 ″N 6°36′57.03″E	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Rod	White	Negative
S2	El Khroub-Constantine (El Baraouia zone1)	36°15′49.97″N 6°39′10.62″E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	Rod	White	Negative
S3	Mila	36°21′49.44″N 6°09′40.83″E	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	Rod	White	Negative
S9	Souk Ahras	36°17′34.87″N 7°55′24.73″E	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Rod	White	Negative

+, Presence; -, absence; M, mannitol; S, sucrose; F, fructose; L, lactose; G, glucose.

Table 2. IAA production and phosphorus solubilization by PGPR isolates.

Strain N	Production of IAA	Solubilization of phosphate
Azo4	++	Solubilization
Azo5	++	Solubilization
Azo6	+++	Solubilization
Azo7	++	Solubilization
Azo8	+++	Solubilization
Azo10	++	Solubilization
S1	+	Solubilization
S2	++	Solubilization
S4	++	Solubilization
S9	+	Solubilization

+, Low production; ++, average production; +++, good production.

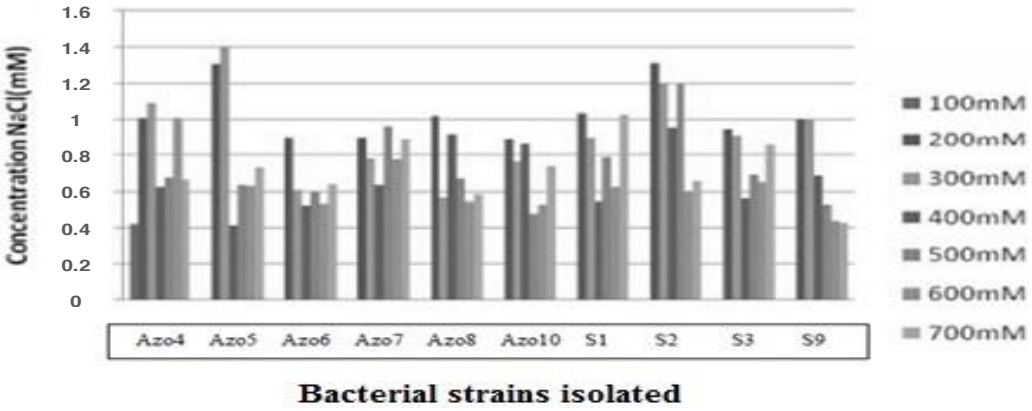


Figure 1. The effect of different concentrations of NaCl (mM) on growth of isolates. Histogram was based on the growth of different strains in media containing different concentrations of NaCl ranging from the lowest concentration (100 mM) to the highest concentration (700 mM).

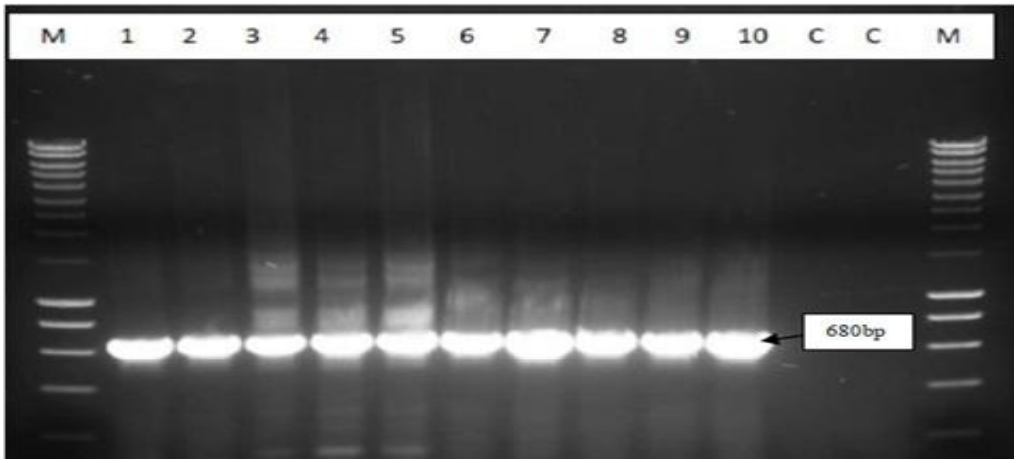


Figure 2. Gel of 16S rDNA PCR products generated (received) by the primers rhizobacteria isolated. PCR products were resolved in 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. Lane M, size marker (Smart ladder 1 Kb); lanes 1 to 10, bacterial isolates; lane C, negative control.

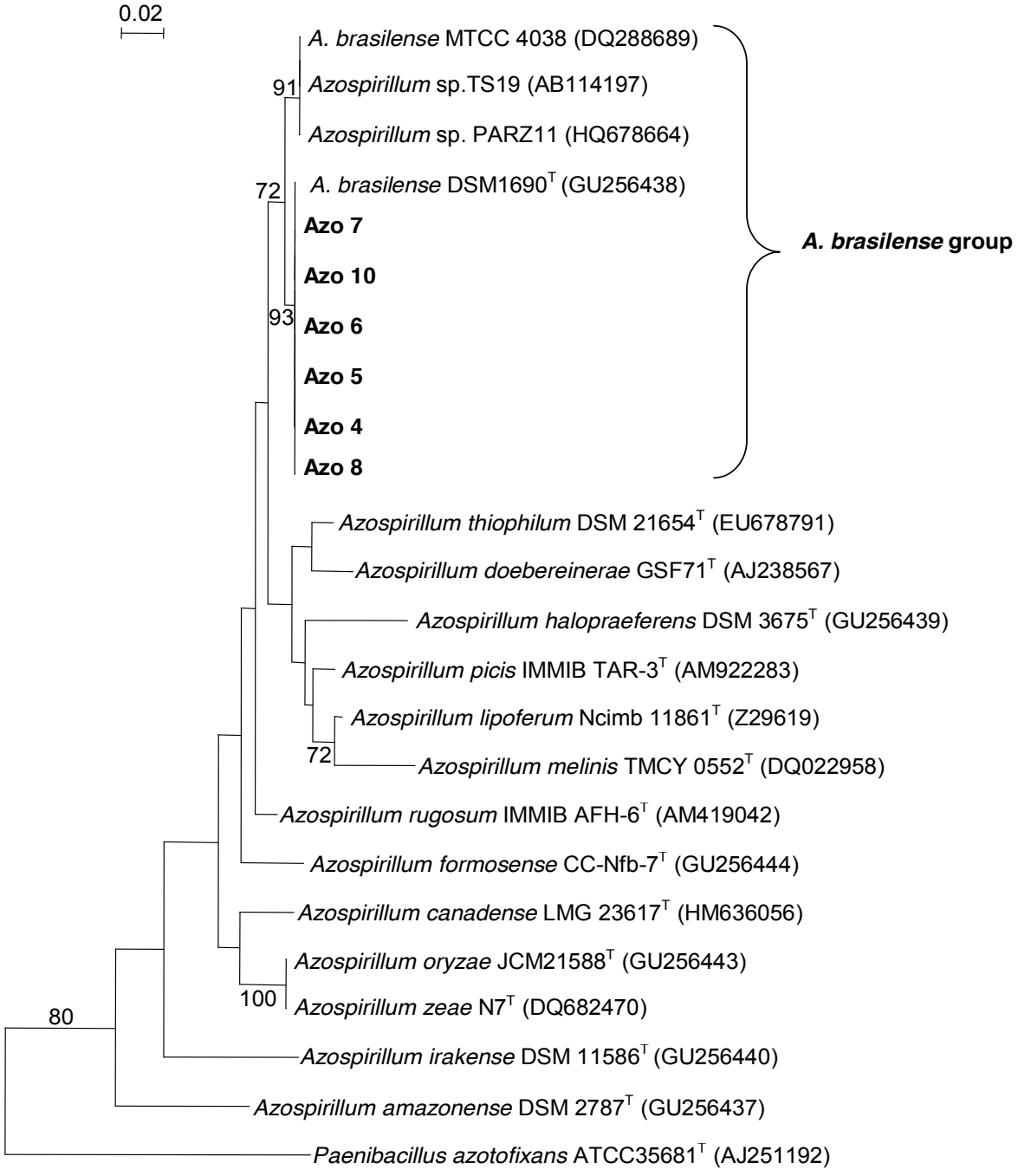


Figure 3. BioNJ phylogenetic tree based on partial 16S rDNA sequences of *Azospirillum* spp. strains (isolated from durum wheat rhizosphere), reference and related strains. The type strains are indicated with the letter "T". Only bootstrap probability values greater than 70% (1000 replications) are given at the branching points. Gaps were not considered. Scale indicated 2% sequence divergence. *Paenibacillus azotofixans* was chosen as an outgroup.

Table 3 show that the difference in parameters measured between plant inoculated and uninoculated plant control the plant length (cm) and highest result was obtain with strain Azo6 (85.39 ± 0.00 cm) and an average value was observed with Azo4, Azo5, Azo7 and Azo10 (83.75 ± 0.02 and 80.19 ± 0.00 cm) but plant control uninoculated

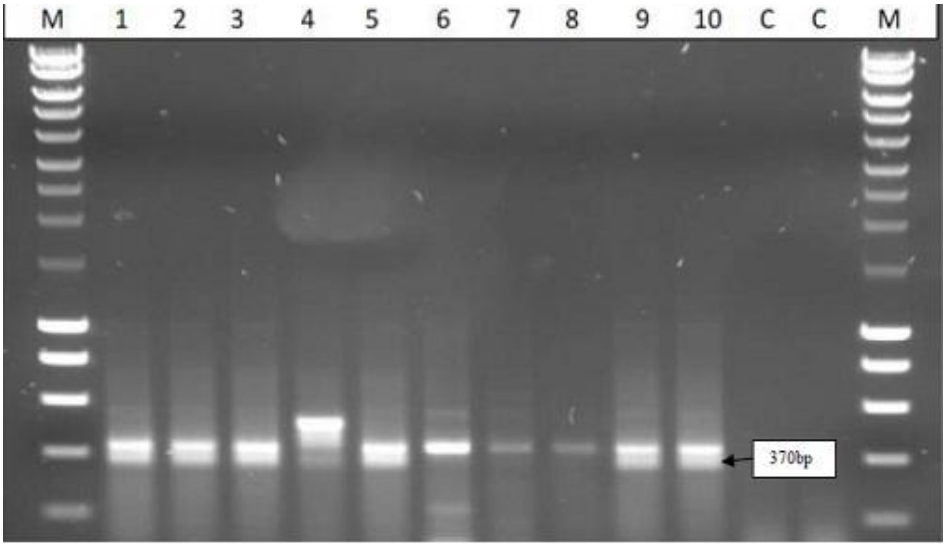


Figure 4. The gel of nifH nested PCR amplification of a *nif*H fragment of 370 bp using the universal primers *nif*H (for A) and reverse (rev) and *nif*H (for B) and reverse (rev). M: ladder; lanes 1-10, *Azospirillum* (isolated from durum wheat); C: negative control.

Table 3. Evaluation of durum wheat growth under the various treatments.

Treatment	Plant length (cm)	Plant weight (g)	Roots length (cm)	Roots weight (g)	Thousand seeds weight (g)
			Wheat Durum: GTA		
Control	73.40±0.01^{Ga}	1.73±0.00^{Ga}	36.05±0.06^{Gb}	0.54±0.01^{Da}	64.20±0.03^{CDa}
Inoculated Azo 4	80.19±0.00^{Fa}	1.92±0.00^{Ea}	39.03±0.01^{Da}	0.65±0.01^{Ca}	64.36±0.02^{Fa}
Inoculated Azo 5	83.69±0.00^{Db}	1.96±0.00^{Ca}	38.32±0.03^{Fa}	0.74±0.01^{Ba}	65.24±0.04^{Da}
Inoculated Azo 6	85.39±0.00^{Aa}	2.06±0.01^{Aa}	39.43±0.04^{Ca}	0.83±0.02^{Aa}	67.26±0.02^{Ba}
Inoculated Azo 7	82.52±0.02^{Ea}	1.94±0.01^{Da}	41.37±0.01^{Aa}	0.73±0.02^{Ba}	68.13±0.01^{Aa}
Inoculated Azo 8	85.12±0.04^{Ba}	2.03±0.01^{Ba}	40.57±0.00^{Ba}	0.65±0.02^{Ca}	65.82±0.02^{Da}
Inoculated Azo 10	83.75±0.02^{Ca}	1.89±0.00^{Fa}	38.38±0.00^{Ea}	0.64±0.03^{Ca}	64.84±0.02^{Ea}

	Chlorophyll total rate (Spad unit)	Nitrogen total (mg/ml)
	Wheat durum: GTA	
Control	33.96±0.03^{Cb}	0.14±0.00^{Db}
Inoculated Azo 4	47.63±0.00^{Ba}	0.52±0.00^{AB}
Inoculated Azo 5	48.70±0.02^{Aa}	0.47±0.01^{Ba}
Inoculated Azo 6	47.43±0.01^{Ba}	0.46±0.01^{Ba}
Inoculated Azo 7	47.50±0.00^{Ba}	0.53±0.05^{Aa}
Inoculated Azo 8	48.60±0.00^{Ab}	0.40±0.01^{Ba}
Inoculated Azo10	47.36±0.01^{Ba}	0.44±0.02^{Ca}

The mean values are those of 7 parameters measured on plants for pot experiments.
^{A,B,C}separation index homogeneous groups test by Newman-Keuls. Values ± SD accompanies by same latter (a and b) are not significantly different according to Fisher's least significant different test (P=0.05).

length was very low (73.400 ± 0.012 cm). For plant weight (g); we note that all strains have good effects and plant inoculated with Azo6 and Azo8 were better than the other plants inoculated (2.06 ± 0.01 and 2.03 ± 0.01 g) but the uninoculated control plants was very low (1.73 ± 0.00 g). For roots, we note all the strains have good effects of elongation, plant inoculated with Azo7 (41.37 ± 0.01 cm) have a better effect in plants than the other

strains. However, the uninoculated control plants have small roots (36.05 ± 0.06 cm) when we compare with the plants inoculated with strains *A. brasilense.* The results of the total nitrogen reported in Table 3 show that the plants inoculated with Azo4 and Azo7 produced more nitrogen (0.52 ± 0.00 mg/ml, 0.53 ± 0.01 mg/ml) than the other plants inoculated three months after inoculations. However, uninoculated control plants produced no more nitrogen (0.14 ± 0.00 mg/ml).

Chlorophyll total content of plants of durum wheat (GTA) inoculated with *A. brasilense* (six strains: Azo4, Azo5, Azo6, Azo7, Azo8 and Azo10) and the uninoculated control plant was reported in Table 3. The results obtained are different; we note that chlorophyll total content is higher in plants inoculated with *A. brasilense*. Note that the highest content was recorded in plants inoculated with strains Azo5 and Azo8 (48.70 ± 0.02 and 48.60 ± 0.00 Spad Unit). However, the uninoculated control plants produce no more chlorophyll total (33.96 ± 0.03 Spad Unit). The yields were estimated with thousand seeds weight (g). We note that all the strains gives good results and the plant inoculated with Azo7 have good effect to enhanced growth and yields (68.13 ± 0.01 g) when compared with uninoculated plant (64.202 ± 0.034 g) (Table 3). In contrast, no significant difference (at P = 0.05) between strains was for weight (68.13 ± 0.01 g) of biomass higher with 94%.

DISCUSSION

Azospirillum spp. has been given much attention as important PGPR (Okon and Vanderleyden, 1997; Bashan et al., 2004). Despite their importance in agriculture, the isolation of *Azospirillum* bacteria from agricultural samples greatly depends on laborious conventional methods using selective media and morpho-physiological tests (Caceres, 1982; Han and New, 1998; Baldani et al., 2005). The formation of the fine colonies is a characteristic of *Azospirillum* spp. (Dobernier and Day, 1976) showed growth under micro-aerophilic conditions on semi-solid agar and suggests that this method was particularly used to study the substrates and growing conditions for nitrogen fixation. For different strains, the observed color was white colonies; this result was similar to the study of Lakshmi et al. (1985) who showed that the bacterial colonies obtained from different isolates are not colored. Ekert et al. (2001) has stated that all these characteristics are very similar to *Azospirillum*. The features that distinguish are species to another, based on its ability to use more sugar and some growth in the detail genetic optimum occurs at 30°C and pH between 6.0 and 7.0. Kreig (1984) reported that organic acids are used to support growth and also support nitrogen fixation of all species of *Azospirillum*. However, the strains have very different abilities for sugar utilization; Goebel et al. (1984) showed that *A. brasilense* can not grow and fix nitrogen with most sugars, and *A. lipoferum* actually used glucose and sucrose *A. amazoneuise* uses.

It was suggest that the chemotaxis of organic acid sugars and amino acids is important for the establishment of bacteria root associations contributing to the growth of *Azospirillum* in their ecological niche. The results obtain about strains growth on medium with different concentrations of NaCl are similar to result demonstrated by Usha et al. (2011) and indicating in the presence of 700 mM NaCl that the increase in growth rate was purely osmotic and not the result of specific ions present in high concentration. It has been proven that the mode of action of many PGPR is to increase the availability of nutrients for the plant, it is mainly the trais PGPR, as the production of IAA and solubilization of phosphates, than some strains that have promote the growth of wheat. Richardson (2001) showed that phosphate solubilization in the rhizosphere is the most common mode of action implied by PGPR increasing the availability of the host plant. Examples of associations include *Azotobacter chroococcum* and wheat, *Bacillus circulans* wheat and *Pseudomonas chlororaphis* and *P. putida* and soybeans (Vessey, 2003). On the other hand, production of IAA by PGPR increased root growth and root length, resulting in greater root surface which allows the plant to access more soil nutrients (Vessey, 2003). The presence of IAA and related compounds has been demonstrated for many diazotroph, for example, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum* sp. *Azotobacter*, *Paenibacillus polymyxa* (Dobbelaere et al., 2003). Moreover, these isolates have the capacity to produce ammonia.

Mirza and collaborators (2001) have found that the production of IAA and ammonium by PGPR varied between different species and strains, and was influenced by the state of culture, growth stage and substrate availability. On the other hand, phosphorus is a major nutrient element; most of the soil phosphorus is present as insoluble phosphates and can not be used by plants. The ability of bacteria to solubilize phosphate was of great interest to agricultural microbiologists to improve plant growth. These reports indicate that this species is a phylogenetically close relative of *Azospirillum* from a different habitat. Moreover, it remains unclear whether the primers can discriminate *Azospirillum* bacteria from other major nitrogen-fixing bacteria such as *Azotobacter* and *Klebsiella*. Taken together, the specificity and sensitivity of Az16S-D primers were highly satisfactory for the detection of *Azospirillum* bacteria even in contaminated cultures, indicating their applicability to identify *Azospirillum* from agricultural samples. Moreover, the current study adopted simple bacterial-cell boiling and standard (inexpensive) Taq DNA polymerase for DNA extraction and amplification, respectively, indicating the easy, low cost applicability of PCR tests with Az16S-D primers.

The isolation of *Azospirillum* bacteria from agricultural samples involves the repeated uses of selective media and

and morpho-physiological tests, which cause selection bias. Han and New (1998) reported that *Azospirillum* bacteria with low nitrogen fixation ability were missed in the conventional isolation process involving nitrogen-free media. The PCR detection of *Azospirillum* isolates by Az16S-D primers is considered to reduce the uses of the media and tests and consequently to accelerate the isolation while decreasing the selection bias. This study developed a rapid and simple genus-specific PCR method using Az16S-D primers to facilitate the detection and identification of *Azospirillum* isolates within populations of rhizosphere bacteria. The PCR method developed would probably serve as a useful tool for isolating a variety of indigenous *Azospirillum* bacteria from agricultural samples to discover novel strains of PGPR and to analyze the diversity and ecology of *Azospirillum* populations (Mcgilloway et al., 2002; Mirza et al., 2006). Further studies are required to develop a rapid, easy and selection bias-minimizing *Azospirillum* isolation technique involving the current PCR method, as well as a real-time PCR quantification technique based on the Az16S-D primer sequences.

In order to increase the specificity and sensitivity of ni*f*H detection, we developed a nested PCR approach based on previously described conserved primer target sites (Kirshtein et al., 1991; Ueda et al., 1995). As shown in Figure 3, this approach improved both the sensitivity and the specificity of *nif*H amplification. PCR amplification of gene sequences has proved to be a powerful tool, but if applied to mixtures of related genes, it may be biased by two known factors. One factor is the potential for preferential amplification of certain sequences, which prevents quantitative correlation of sequence abundance in the DNA sample and sequence abundance in the PCR product. The analysis of *nif*H PCR products from samples is a powerful tool for assessing the presence and diversity of nitrogen-fixing microorganisms in ecosystems. Although, this approach does not directly allow evaluation of functional aspects of the nitrogen-fixing populations in a sample, structural information on the gene pool and the potential for nitrogen fixation may be assessed. The differences are consistent with reports that the nitrogen fixation activities associated with forest litter and logs are greater than the nitrogen fixation activities associated with soil (Hope et al., 1997).

Nitrogen availability in soil may limit or regulate degradation processes (Berg, 1986; Berg et al., 1994; Dawson, 1992) and controlled nitrogen fixation may provide nutrient levels that allow optimal mineralization activities. The correct taxonomic classification of organisms in the environment may be determined by isolation and polyphasic characterization (de Lajudie et al., 1994). Durum wheat Inoculated with *A. brasilense* increase the total dry plant weight, the amount of nitrogen, the thousand seeds weight and *A. brasilense* also affects roots length and increased yield. These results were similar to Bashan and Levanony (1991) who describe that these bacteria have a direct influence on root length, number of secondary roots, increase the elongation zone, root volume, dry weight and increased yield. In general, these diazotroph are reported to improve root growth and function, often leading to increased uptake of water and mineral nutrients. Plant inoculation with *A. brasilence*, for example, promoted greater uptake of NO_3, K and H_2PO_4 in sorghum, wheat and setaria (Zavalin et al., 1998; Saubidet et al., 2000). The beneficial effects of inoculating durum wheat with *A. brasilense* give higher yielding wheat when compared with uninoculated durum wheat. Our result is confirmed by Martin et al. (2008). Several strains of *A. brasilense* and *A. lipoferum* have been used successfully as crop inoculants to increase yield (Dobbelaere et al., 2001; Okon and Labandera-Gonzalez, 1994).

In conclusion, the population of Rhizobacteria isolated from soil mainly cereals (wheat) is identical and dominated by the genus *Azospirillum*. Many strains of these genus are able to grow in an environment with high concentrations of NaCl, and can also synthesize IAA, ammonium and solubilize phosphate, thus confirming the potential for tolerance of PGPR from Algerians soil. One of the recommandations is the evaluation of inoculation between the *A. brasilense* and the durum wheat under controlled conditions and in the field. In future, these strains could be effectively used as biofertilizers for wheat (*T. durum* Desf.) in Algeria.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to the engineers of the laboratory Mrs. Bouldjadj Ryma, Djemel Amina and Mouellef Adra (Laboratory of Plant Genetics Biochemistry and Biotechnology-Constantine, Algeria).

REFERENCES

Ashrafuzzaman M, Akhta F, Razi H, Ismail M (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. Afr. J. Biotechnol. 8:1247-1252.

Baldani JI, Krieg NR, Baldani VLD, Hartmann A, Dobereiner J (2005). Genus II Azospirillum. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn. (2)- Part C.

Bashan Y, Holguin G, Bashan L (2004). *Azospirillum* plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances. Can. J. Microbiol. 50:521-577.

Bashan Y, Levanony Y (1991). Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense.* Plant Soil 137:99-103.

Ben Dekhil S, Cahill M, Stackebrandt E, Sly LI (1997) .Transfer of Conglomeromonas largomobilis subsp. largomobilis to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. Appl. Microbiol. 20:72-77.

Benizri E, Courtade A, Picard C, Guckert A (1998). Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* Short communication. Soil Biol. Biochem. 30:1481-1484.

Berg B (1986). Nutrient release from litter and humus in coniferous forest soils a mini review. Can. J. Res. 1:359-369.

Boudour L, Gheroucha H, Boukaboub A (2011). Evaluation of genetic diversity of an Algerian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) collec-

tion. J. Stress Physiol. Biochem. 17(3):95-107.
Bogola A, Tesfaye K (2011). Relationship between Kernel ash content, water use efficiency and yield in Durum wheat under Deficit Induced at different Growth stages. Afr. J. Bas. Appl. Sci. 3(3):80-86.
Caceres EA (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Appl. Environ. Microbial. 44:990-991.
Dawson JO (1992). Nitrogen fixation in forests and agroforestry, In F. B. Metting, Jr. (ed.), Soil. microbial. Ecol. pp. 227-253.
de Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins D, Dreyfus B, Kersters K, Gillis M (1994). Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus Sinorhizobium and de-scription of Sinorhizobium meliloti comb. nov., Sinorhizobium saheli sp. nov., and Sinorhizobium teranga sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:715-733.
Dey R, Pal KK, Bhat DM, Chauhan SM (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. Microbiol. 159:371-394.
Dobbelaere S, Croonenborghs A, Amber T, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Aguirre JF, Kapulnik Y, Shimon B, Burdman S, Kadouri D, Sarig S, Okon Y (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with Azospirillum. Aust. J. Plant. Physiol. 9:28.
Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003). Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Plant Sci. 22:107-149.
Dobereiner J (1995). Isolation and identification of aerobic nitrogen fixing bacteria from soil and plants. In: Alef K, Nannipier P (eds) Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press. London. pp. 134-141.
Dobernier J, Day JM (1976). Association symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Proceeding of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation Newton W.E. and Nyman, J.C.Eds. pp. 518-538.
Eckert B, Weber OB, Kirchhof G, Halbritter A, Stoffels M, Hartmann A (2001). *Azospirillum* doebereinerae sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C (4)-grass Miscanthus. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:17-26.
Falk EC, Dobereiner J, Johnson JL, Krieg NR (1985). Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* Magalhaes and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. Int. J. Syst. Bacteriol. 35:117-118.
Fischer SE, Fischer SI, Magris S, Mori GB (2007). Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. World. J. Microbiol. Biotechnol. 23:895-903.
Gangoir M, Rani S, Sharman N (2012). Diversity of endophytic Actinomycetes from wheat and its potential as plant growth promoting and biocontrol agents. J .Adv. Labor. Res. Biol. 3:17-24.
Gascuel O (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data .Mol. Biol. Evol. 14:685-695.
Glick BR (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can.J. Microbiol. 41:109-117.
Glick BR, Bashan Y (1997) .Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phyto-pathogens. Biotechnol. Adv. 15:353-378.
Goebel EM, Krieg NR (1984). Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 159:86-92.
Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol. Biol. Evol. 27:221-224.
Han SO, New PB (1998). Isolation of *Azospirillum* spp. from natural soils by immunoma gnetic separation. Soil. Biol. Biochem. 30:975-981.
Helsel LO, Hollis DG, Steigerwalt AG, Levett PN (2006). Reclassification of Roseomonas fauriae Rihs as a later heterotypic synonym of *Azospirillum brasilense*. Int. J. Syst.Evol. Microbial .56:2753-2755.
Herman MAB, Nault BA, Smart CD (2008). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. Crop. Protect. 27: 996-1002.
Hope SM, Li CY (1997). Respiration, nitrogen fixation, and mineralizable nitrogen spatial and temporal patterns within two Oregon Douglas-fir stands. Can. J. Res. 27:501-509.
Khammas KM, Ageron E, Grimont PAD, Kaiser P (1989). *Azospirillum irakense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbial .140:679-693.
Kirchhof G, Reis VM, Baldani JI, Eckert B, Doebereiner J, Hartmann A (1997). Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. Plant Soil 194:45-55.
Kirshtein JD, Paerl HW, Zehr JP (1991).Amplification, cloning, and sequencing of a nifH segment from aquatic microorganisms and natural communities. Appl. Environ. Microbiol.57:2645-2650.
Kloepper JW (1993). Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: Metting FB Jr. (ed) Soil microbial ecology-applications in agricultural and environ mental management. Marcel Dekker. Inc., New York. 255-274.
Kreig N R (1984). Williams and Wilkins, Baltimore. Vol 1.
Lakshmisadasivam C , Carlos A, Neyra C A(1985). J. Bacteriol. 2: 716-725.
Lavrinenko K, Chernousova E, Gridneva E, Dubinina G, Akimov V, Kuever J, Lysenko A, Grabovich M (2010). *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel Diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60(12):2832-2837.
Lin SY, Young CC, Hupfer H, Siering C, Arun AB, Chen WM, Lai WA, Shen FT, Rekha PD, Yassin AF (2009). *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. Int. J. Syst. Evol. Microbiol .59:761-765.
Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV, Bolwerk A, vanden Broek D, Cazorla-Lopez F, Chin-A-Woeng TFC, Eijkemans K, Kamilova FD, Kuiper I, Mulders IH, van Rij ET, deWeert S (2004). Biocontrol of pathogens. In: Tikhonovich I, Lugtenberg BJJ, Provorov N (eds) Biology of plant-microbe interactions, International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St Paul, Minnesota, USA . 4:305-309.
Martin LB, Navara KJ, Bailey MT, Hutch CR, Powell ND, Sheridan JF, Nelson RJ (2008).Food Restriction Compromises Immune Memory in Deer Mice (*Peromyscus maniculatus*) by Reducing Spleen-Derived Antibody-Producing B Cell Numbers. Physiol. Biochem. Zool. 81(3):366-372.
Mcgilloway RL, Weaver RW, Ming DW, Pillai SD (2002). A PCR-MPN based quantitative approach to enumerate nitrifying bacteria in zeoponic substrates. J.Rapid Methods. Autom. Microbiol. 10:49-58.
Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G (2007a). Azospirillum canadense sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:620-624.
Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G (2007b). *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated fromrhizosphere soil of Zea mays. Int. J. Syst. Evol .Microbiol. 57:2805-2809.
Minorsky PV (2008). On the inside. Plant. Physiol. 146: 323-324.
Mirza MS, Ahmad W, Latif F, Haurat J, Bally R, Normand P, Malik KA (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. Plant. Soil. 237:47-54.
Mirza MS, Mehnaz S, Normand P, Combaret CP, Loccoz YM, Bally R, Malik KA (2006).Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing Pseudomonas strain promoting rice growth. Biol. Fertil. Soils 43:163-170.
Myongsu P, Chungwoo K, Jinchul Y, Hyoungseok L, Wansik S, Seunghwan K, Tongmin S (2005). Isolation and Characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. Microbiological Research. 160:127-133.
Okon Y, Labandera-Gonzalez CA (1994). Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil. Biol. Biochem. 26:1551-1601.
Okon Y, Vanderleyden J (1997). Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM. News .63:366-370.
Peng G, Wang H, Zhang G, Hou W, Liu Y, Wang ET, Tan Z (2006) .*Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazo-trophs isolated from tropical molasses grass. Int. J. Syst. Evol. Microbiol .56:1263-1271.
Reinhold B, Hurek T, Fendrik I, Pot B, Gillis M, Kersters K, Thielemans S, Ley JD (1987).*Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (Leptochloa fusca L. Kunth). Int. J. Syst. Bacteriol. 37:43-51.
Renato F, Claudio B (1995). Phylogeny of the genus *Azospirillum* based on 16S rDNA sequence. FEMS. Microbiol. 195-200.
Richardson AE (2001). Prospects for using soil microorganisms to

improve the acquisition of phosphorus by plants. Aust. J. Plant. Physiol. 28:897-906.
Saubidet MI, Fatta N, Barneix AJ (2000). The effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. Plant Soil 245: 215-222.
Shih YL, Fo TS, Chiu ChY (2011). Rapid detection and identification of the free-living nitrogen fixing genus *Azospirillum* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. Antonie van Leeuwenhoek.99:837-844.
Shime HA, Kobayashi S (2011). A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within population of rhizosphere bacteria. J. Appl. Microbiol. 111:915-924.
Stead DE, Elphinstone JG, Weller S, Smith N, Hennessy J (2000). Modern methods for characterizing, identifying and detecting bacteria associated with plant. Acta Hortic .530:45-59.
Stoffels M, Castellanos T, Hartmann A (2001). Design and application of new 16S rRNA-targeted oligonucleotides probes for the *Azospirillum*-Skermanella-Rhodocista-Cluster. Syst. Appl. Microbiol. 24:83-97.
Tarrand JJ, Krieg NR, Do¨bereiner J (1978) .A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24:967-980.
Ueda T, Suga Y, Yahiro N, Matsuguchi T (1995). Remarkable N_2 fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nifH gene sequences. J. Bacteriol. 177:1414-1417.
Usha DK, Kanimozhi K (2011). Isolation and characterization of saline tolerant *Azospirillum* strains from paddy field of Thanjavur district. Adv. Appl.Science. Res. 2:239-245.
Verma JP, Yadav J, Tiwari KN, Lavakush, Singh V (2010).Impact of plant Growth promoting Rhozobacteria on Crop Production. Int. J. Agric. Res. 5:954-983.
Vessey J K (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255:571-586.
Widmer F, Shaffer BT, Porteous LA, Seidler RJ (1999). Analysis of nif*H* Gene Pool Complexity in Soil and Litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range. Appl. Environ. Microbiol. 374-380.
Xie CH, Yokota A (2005). *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant Oryza sativa. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1435-1438.
Yadav J, Verma JP, Tiwari KN (2010). Effect of plant promoting Rhizobacteria on seed germination and plant growth Chickpea (Cicer arietinum L.) under in vitro conditions. Biol. Forum. 2:15-18.
Young CC, Hupfer H, Siering C, Ho MJ, Arun AB, Lai WA, Rekha PD, Shen FT, Hung MH, Chen WM, Yassin AF (2008). *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:959-963.
Zavalin AA, Kandaurovd TM, Vinogradova LV (1998). Influence of nitrogen fixing microorganisms on the characteristics of productivity of spring wheat and on the characteristics of photosynthesis of different varieties of spring wheat. Biological nitrogen fixation for the 21st century. Dordrecht.The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. 413-414.
Zehr JP, McReynolds LA (1989).Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the nifH gene from the marine cyanobacterium Tricho-desmium thiebautii. Appl. Environ. Microbiol. 55:2522-2526.
Zhou Y, Wei W, Wang X, Xu L, Lai R (2009). *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China. J. Gen. Appl. Microbiol. 55:1-7.

Chapitre 2 : Effet de 2,4-Dichlorophenoxyacetate dans la formation des paranodules racinaires chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) inoculer avec *Azospirillum brasilense* isolé dans la rhizosphère de blé dur en Algérie

Ce chapitre constitue la seconde partie abordée lors de mon travail de thèse. Il concerne la formation des paranodules racinaires chez le blé dur inoculé avec Azospirillum brasilense, isolé et identifié dans le chapitre 1 ceci par l'induction de 2,4- Dichlorophenoxyacetate (2,4-D).

Ce travail a été réalisé au laboratoire biochimie génétique et biotechnologie végétales, au sein de l'équipe de recherche biotechnologie et amélioration des plantes.

Dans cette étude, j`ai effectué l`ensemble des expériences physiologiques, de dosage d`azote ainsi que les premières observations microscopique validant la présence des paranodules sur le système racinaire de blé dur inoculé avec A. brasilense et traité avec le 2,4-D.

Les expériences de marquage par fluorescence des bactéries ont été réalisées sur des coupes de paranodules racinaires découpés au vibratome. Cette partie a été effectuée au LSTM de Montpellier, France.

Cette partie a fait l`objet d`une publication dans le journal : Science & Technologie, revue de l`université Constantine 1.

1. Problématique

Les rhizobactéries possèdent plusieurs rôles bénéfiques, parmi lesquelles la fixation biologique d'azote atmosphérique. Ces dernières années, plusieurs études indiquent que l'inoculation des céréales comme le riz ou encore le blé avec des PGPR, impliquent la formation de nouvelles structures au niveau racinaires plus connues sous le nom de paranodules. Ces paranodules sont considérés comme étant le siège de la fixation biologique de l'azote atmosphérique (Nie *et al*., 1992).

L'étude effectuée dans ce travail de thèse a nécessité l'utilisation de plusieurs techniques physiologiques et biochimiques, pouvant ainsi confirmer la fixation biologique d'azote chez le blé dur inoculé avec *Azospirillum brasilense*. De nombreux outils ont été utilisés pour localiser *Azospirillum brasilense* au niveau des racines (paranodules) de céréales (Gough *et al*., 1997 ; Nie *et al*., 1992). Cependant, aucune étude concernant le blé dur n'a été effectué pour induire la formation de paranodules.

Cette partie de thèse va s`attacher à présenter la formation de ces paranodules au niveau racinaire de blé dur par l'induction de 2,4-D. Ces paranodules ont été obtenus grâce à l'inoculation du blé dur avec *Azospirillum brasilense*.

2. Publication et principaux résultats

Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetate on the formation of paranodules root in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) inoculated with *Azospirillum brasilense* isolated in rhizosphere of wheat in Algeria

Cette publication présente les données spécifiques à la formation des paranodules chez le blé dur inoculé avec *Azospirillum brasilense.*

De nombreux paranodules sont obtenus tout au long des racines de blé dur. Cette formation de paranodules a été réalisée par l'induction de l'hormone 2,4-D. Nous avons ainsi montré qu'*A. brasilense* possède la capacité de noduler le blé dur en présence de 2,4-D avec une concentration bien déterminée de 0.4µg/ml, ces paranodules sont formés au niveau racinaire. Cependant, la taille et la forme de ces structures diffèrent des nodules obtenus dans le cas la symbiose *Rhizobium* / légumineuse. Ainsi, les paranodules de blé dur présentent une forme irrégulière et une taille plus petite.

L'étude de la fixation biologique d'azote a été réalisée par deux approches différentes : la première physiologique qui consiste à déterminer le taux de chlorophylle totale. Celle-ci a démontré que ce taux chez les plantes inoculées est nettement supérieur aux plantes témoins. La seconde, biochimique qui consiste à doser l'azote. Celle-ci a démontré que la quantité d'azote fixé chez les plantes inoculées est cinq fois la quantité fixée chez les plantes témoins, 0.50 mg et 0.15 mg respectivement.

Nous avons par la suite utilisé un agent fluorescent afin de déterminer la présence d'*A. brasilense* dans les paranodules racinaires de blé dur. L'étude microscopique de ces paranodules pour la localisation d`*A. brasilense* a confirmé leur nature qui ne peut être que le siège de la fixation biologique de l'azote.

Sciences & Technologie **C – N°36** Décembre (2012), pp.18-24.

EFFECT OF 2, 4-DICHLOROPHENOXYACETATE ON THE FORMATION OF PARANODULES ROOT IN DURUM WHEAT (*Triticum durum Desf.*) INOCULATED WITH *Azospirillum brasilense* ISOLATED IN RHIZOSPHERE OF WHEAT IN ALGERIA

Reçu le 15/02/2012 – Accepté le 28/10/2012

BENMATI M., YKHLEF N., BELBEKRI N., DJEKOUN A.
Laboratory of Biochemical Genetics and Plant Biotechnology, Faculty of Natural Sciences and Life, Department of Biology and Ecology, University of Constantine 1-Algeria
djakoun@umc.edu.dz

Résumé

Plusieurs recherches ont montré que les PGPR ont des effets bénéfiques sur les plantes, ces rhizobactéries peuvent procurer à la plante l'azote sous forme d'ammonium par leurs associations avec les légumineuses et certaines graminées. Les souches d`*Azospirillum brasilense*, isolées préalablement de la rhizosphère du blé dur dans l`Est d`Algérie, ont la capacité de fixer l`azote cet effet a été déterminer par le dosage d`azote et la chlorophylle total des partie aériennes, ces souches peuvent coloniser des racines du blé dur (*Triticum durum* Desf.) inoculée par la formation des para-nodules au niveau des racines par l`induction du *2.4-D*. Ces bactéries possèdent aussi un effet positive sur l`augmentation du rendement qui se traduit par le poids de mille graines des plantes inoculées.
Mots clés : *Azospirillum brasilense, blé dur (Triticum durum Desf.), Paranodules, Rendement.*

Abstract

Several studies have shown that PGPR have beneficial effects on plants, these rhizobacteria may provide the plant with nitrogen as ammonium by their associations with legumes and some grasses. The strains of *Azospirillum brasilense* isolated before in rhizosphere of durum wheat, these strains can fix nitrogen improved by nitrogen content in leaves and total chlorophyll. The strains can colonized the durum wheat roots (*Triticum durum* Desf.) inocultated by formation of para-nodules in roots induced by *2.4-D*.These bacteria have also effect to improve growth yield these result was obtained by determination of thousand seeds weight.
Keywords: *Azospirillum, Durum wheat (Triticum durum Desf.), Para-nodules, Yield.*

ملخص

PGPR

.

Azospirillum ( )PGPR

. :

.

.D-2،4

( ) . D-2،4

.( ) .

. . *Azospirillum :*_____

© Université Constantine 1, Algérie, Décembre 2012

Diazotrophic bacteria are important in agriculture, they are known to improve the soil and increase crop productivity. Many soil bacteria have demonstrated a potential to promote plant growth and increase yields of plants. It is now well known that the use of different Diazotrophic bacteria (*Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter chroocaccum, Bacillus sp*., etc.), which were isolated from the rhizosphere of wheat plant can improve plant growth [1]. The production of plant hormones by *Azotobacter* and *Azospirillum* as well as changes in plant growth and development were observed [2]. In recent years, several reports have appeared describing attempts to induce the formation of new growth referred to as paranodules on the roots of several non-legume plants including rice, wheat, barley and rape seed [3, 4, 5].

Species of the genus *Azospirillum* are known to associate with many crops of agronomic interest. After inoculation, the bacteria absorbed the roots, proliferate at the surface and can then invade and colonize the internal tissues of roots. The factors controlling the colonization of roots by *Azospirillum* species are not yet fully understood, but it was suggested that the polar flagella, surface polysaccharides and protein lectins are involved in the process [6].

These bacteria are interesting because, first they can assimilated atmospheric nitrogen and thereby contribute to the nitrogen nutrition of plants, on the other hand, they promote the absorption of nutrients by plants and create favorable conditions for protection of the root system of pathogenic bacteria, and third, they help regulate the flow of nutrients and production of phytohormones [7]. Of the five major classes of hormones, indole acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA3), kinetin, abscisic acid and ethylene, known *Azospirillum* produce the first three types of plant hormones. However, little information is available on the system, the nature and extent of the production of phytohormones in terms of qualitative and quantitative [6]. One of the important problems of modern microbiology is the improved supply of non-leguminous plants with available nitrogen using soil nitrogen-fixing microorganisms [8].

The artificial formation of nodules on the roots of non leguminous plants (such nodules are known as para nodules) can be induced by auxin-like substances (such as 2,4-dichlorophenoxy acetic acid) [9, 10, 11] using such an approach , paranodulation was induced in wheat, rice, maize, and rape plants[11, 12].

Studies by several researchers showed that adding small amounts of synthetic auxins such as 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) may increase colonization and nitrogen fixation of Azospirillum, coinciding with pattern formation in lateral roots of modified para-nodules [2, 13, 14]. For this reason, the application of phytohormones microbiologically produced by rhizobacteria that promote plant growth (PGPR) or synthetic growth regulators and often recommended to improve the quality of performance, to change the processes of plant life [6].

MATERIALS AND METHODS

Sterilization, inoculation and germination of seeds of durum wheat: A variety of wheat (*Triticum durum*) was chosen: GTA / DUR. The seeds of durum wheat were sterilized first in 70% ethanol for 20 seconds, then emerged in a solution of 30% sodium hypochlorite for 30 minutes followed by several rinses with sterile distilled water. Finally, place the sterile seeds in sterile dishes over sterile filter, and put these boxes in sterile conditions in darkness 48 hours. After germination, the seeds are inoculated with a bacterial suspension (3 strains selected: Azo1, Azo2, Azo3) one way to put 1 ml for each seed, and leave overnight at room temperature.

Induction of para-nodules : After the phase of inoculation, place the seeds in jug containing a mixture of sterile soil (1/3soil, 1/3compost,1/3 sand) and add a solution containing n-free liquid medium (10g malat, 1g KH_2PO_4, 0.2g $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.2g Nacl, 0.005g $FeSO_4$ $7H_2O$, 5g Mannitol, 100mg yeast extract [15]and the concentration of 2,4-D, and uninoculated seeds are irrigated also with n-free liquid medium. The test and place in the growth chamber under conditions controlled (t: 25±3°C, 16H photoperiod and humidity 30%) and monitored for 1 month and a half (45 days) to obtain the para-nodules.

The rate of total chlorophyll: Measuring the chlorophyll content of leaves was performed with a Minolta SPAD 502 chlorophyll meter. This manual is a radiometer whose measure is a ratio of leaf reflectance in the red (650nm) and near infrared (940nm). This amounts to a vegetation index measurement of the nitrogen status and leaf chlorophyll [16].

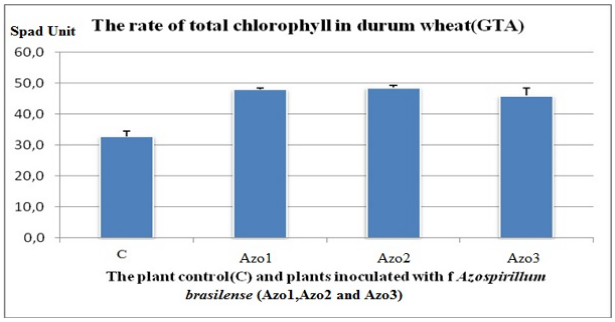
Determination of nitrogen content in leaves of durum wheat: Total leaves nitrogen determination was done using kjeldahl method for soil and plant analysis as described by Sertsu and Bekele (2000) [17]. Dried leaves samples from each pot were milled into powder using a coffee grinder and sieved through 0.5 mm sieve. From each sample 0.2 g was weighed and subjected to Kjeldahl digestion for the determination of total nitrogen.

Microscopy : Observe the morphology of the nodules and the location of bacteria, why the nodules of plants inoculated cultures were harvested after 45 days of growth oriented and then included in the agarose to 30%. The microscopic sections are performed in Vibratome to a thickness of 30 microns and then stained with Syto 13 (diluted 1 / 1000) for 15 minutes followed by rinsing with

distilled water for 15 minutes. The stained sections were mounted between slide and coverslip in PBS 10% glycerol (phosphate buffered saline). A first observation is carried out cuts macroscope (white light or epifluorescence) to detect cuts interest. Then microscopy (epifluorescence) is used for imaging of our cut. This part was realized in LSTM laboratory in Montpellier, France.

RESULTS AND DISCUSSION

The rate of total chlorophyll: Total chlorophyll content of plants of durum wheat (GTA) inoculated with *Azospirillum brasilense* (3 strains: Azo1, Azo2 and Azo3) and the uninoculated was presented in Histogram 1.

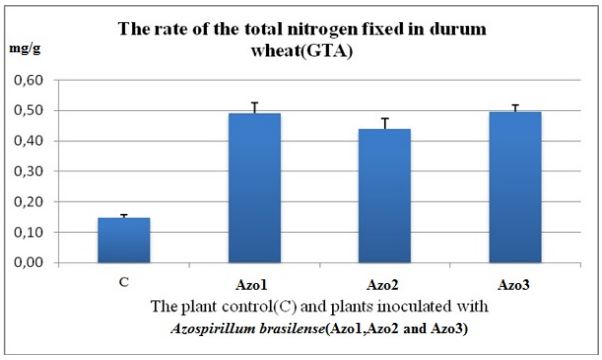


Histogram 1: Total chlorophyll content of durum wheat plant uninoculated (C) and durum wheat plant inoculated with strains *Azospirillum brasilense* (Azo1, Azo2 and Azo3)

The results obtained are different; we note that chlorophyll content is higher in plants inoculated with *Azospirillum*. Note that the highest content was recorded in plants inoculated with strain Azo2 of *Azospirillum brasilense*, followed by plants inoculated with the strain Azo3, and a plant inoculated with strains Azo1 them or less the same level as other plants inoculate. However, the minimum content was recorded in plants controls (controls without inoculation).

Determination of nitrogen content in leaves of durum wheat

The total nitrogen fixation by different parameters (uninoculated plants, plants inoculated with 3 strains (Azo1, Azo2 and Azo3) of *Azospirillum brasilense* was estimated by the Kjeldahl method. The results obtained are presented in Histogram 2. The content of total nitrogen fixation varies between 0.15 mg and 0.50 mg, whichever is higher of the fixed nitrogen was obtained in plants inoculated with strains Azo3, followed by plants inoculated with strain Azo2 and plants inoculated with strain Azo1. However, uninoculated plants and the nitrogen calculated low.



Histogram 2: The total nitrogen content of durum wheat plant uninoculated (C) and durum wheat plant inoculated with strains *Azospirillum brasilense* (Azo1, Azo2 and Azo3)

Effect of isolates on the growth of wheat (*Triticum durum* var: GTA / DUR) and training of para-nodules: The effect of selected isolates (Azo1, and Azo2 Azo3) on growth of wheat (*Triticum durum* var: GTA / DUR) was studied in plants grown for 6 weeks. Different concentrations of 2,4-D were tested to determine which produced an optimal number of para-nodules.

Effect of concentration of 2,4-D and *Azospirillum* inoculation on the growth and number of para-nodules on plant roots: Results in Table 1 show that treatment of seedlings with 2,4-D influenced the growth of plant shoots and roots and induced formation of para-nodules. Root elongation and lateral root formation was compared with control plants. Application of Azospirillum significantly enhanced shoot and root weights as well as plant height. It was also noted that better results were obtained by adding 2,4-D after the root systems had reached a length of about 5cm to allow enough space for para-nodules induction [18]. Inoculation of cereals with *Azospirillum* increased the total dry weight of the plant, the amount of nitrogen, the number of seeds per spike, seed weight and the surface of the sheet, with a high germination rate. Azospirillum also affects root growth of wheat and increased yield. Bashan and Levanony raporter that these bacteria have a direct influence on root length, number of secondary roots and increase the elongation zone and root volume and dry weight.

In plants treated with 2.4 D, a variation in the number of para-nodules per plant was found; these results are similar to those reported by Zeman et *al* (1992**)** [18]. This training of para-nodules was described in the literature. These were found in a medium containing low concentration of 2.4D [7, 9, 19].Wheat after inoculation with Sp7 and *A.brasilense A.brasilense* Sp7.S mutant who is deprived of the synthesis of polysaccharides, they observed that all *A.brasilense* Sp7colonisé the root surface, whereas treatment with strains mutant shows an accumulation of bacteria only on the sides of the roots [20]. All of the strains

Table 1: Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on the different parameters durum wheat plant treated with 2, 4-dichlorophenoxyacetate (2, 4-D)

Treatments	Plant length (cm)*	Plant weight (g)	Root length (cm)	Root weight (g)	Thousand seeds weight (g)
Control+2,4-D	73.554±0.826	1.720±0.040	36.000±0.500	0.560±0.020	64.483±0.172
Plants inoculated S1+2,4-D	82.500±0.500	1.917±0.015	39.033±0.550	0.630±0.020	64.840±0.176
Plants inoculated S2+2,4-D	85.000±0.500	2.047±0.054	40.533±0.208	0.683±0.011	65.490±0.738
Plants inoculated S3+2,4-D	83.667±0.577	1.963±0.028	41.800±0.264	0.736±0.025	68.026±0.309

***the average of 3 replication**

examined in this work colonized both the crevices surrounding the sites of the lateral root emergence and those crevices associated with the para-nodules appearing in 2, 4-D treated roots.

Pereg-Gerk *et al.*(2000) [21] found that the strains of *Azospirillum brasilense*, colonized both the crevices surrounding the sites of lateral root emergence in wheat and those crevices associated with the paranodules appearing after 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) treatment. However, the colonization of paranodules was more extensive than that of lateral root emergence sites in plants that were not treated with 2,4-D [22].

Azospirillum is another much studies diazotroph especially the species *Lipoferum* and *brasilense*, which have been shown to infect a number of cereal plants including wheat, maize and sorghum [23, 24, 25, 26, 27, 28, 29].

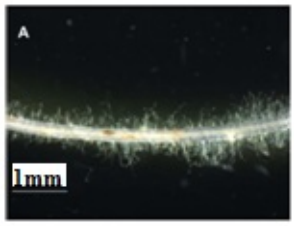
In general, these diazotroph are reported to improve root growth and function, often leading to increased uptake of water and mineral nutrients. Plant inoculation with *Azospirillum brasilence*, for example, promoted greater uptake of NO_3, K and H_2PO_4 in corn, sorghum, wheat and setaria [30, 31, 32, 33].

Initially, the treated plants and plants inoculated and treated differ in root. Infection of *Azospirillum sp* on durum wheat results in a poorly developed root system: the roots are short and few or no hairs with para-nodules protruding round distributed at a regular interval along the roots. The roots of wheat infested Azo1 are shorter and we note the absence of hairs (Fig1 B1 and B2) the same is observed with Azo2 (Fig1 d1 and d2).

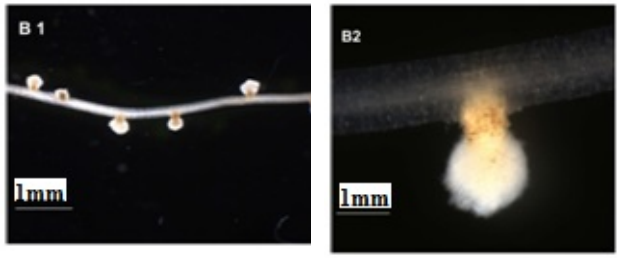
Instead, the root systems invaded by Azo3 has a large number of root hairs (Fig1:C1 and C2). Azo2 As for these para-nodules was larger and well distributed on a regular basis throughout the roots. In the case of control treated with the 2.4D (concentration 0.4µg/ml) and not inoculated, there is a significant formation of root hairs. Similar results were found by Katupitiya and collaborators (1995) [8] with the mutant Sp7.S compared to wild-Sp7.De over an observable effect on the development of the morphology of the roots of wheat (*Triticum durum* var: GTA / DUR) resulted in a decrease in root length, but an increase in root hairs.

This effect was achieved in the case of inoculation of germinated seeds of durum wheat with selected bacterial strains (Azo1, Azo2 and Azo3) and treatment with 2.4D (concentration 0.4µg/ml).

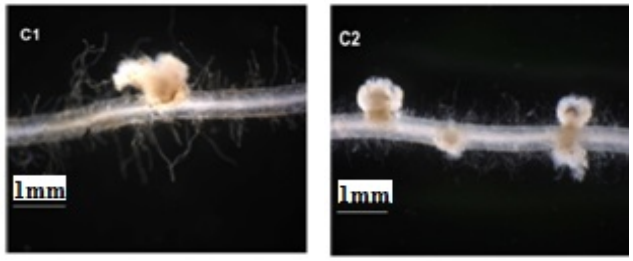
The 2.4D is known to facilitate the entry of bacteria into the lateral roots of the plant, causing the formation of round structures. However, plants control (without inoculation) shows no change in their roots. This was observed visually with a dissecting microscope (Fig1). We also noticed that some bacteria are more efficient in terms of inoculation and training para-nodules (Azo2), was observed by the obtaining of large structures (para-nodules) (Fig1,d3).



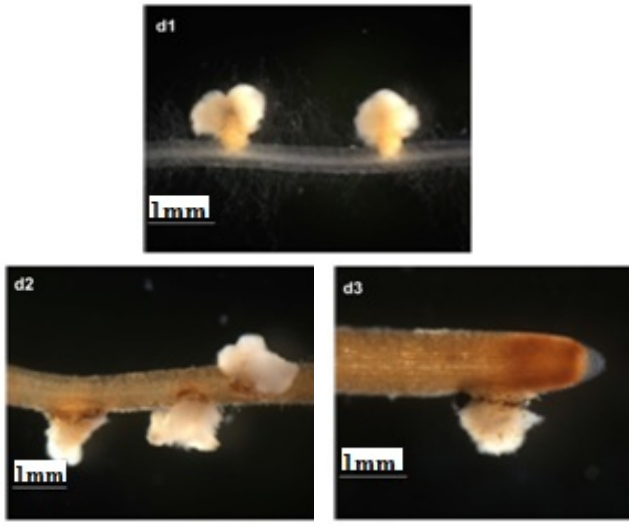
A: Control



(B1, B2) durum wheat inoculated with Azo1+2.4 D



(C1, C2) durum wheat inoculated with Azo3



(d1, d2, d3) durum wheat inoculated with Azo2

Figure 1: Para-nodules in roots induced by the report of 2.4-D on durum wheat (*Triticum durum*) inoculated with *Azospirillum* brasilense (Azo1, Azo2 and Azo3) observed under a binocular (×40)

It is known that it is the root elongation zone that primarily responds to the action of auxins by changing the proprieties of the cells of epidermis, cortical, parenchyma, endodermis, pericycle, and the central vascular cylinder [14]. Light microscopic studies revealed that *Azospirillum brasilense* successfully colonized para-nodules, externally both their basal connection with the root and on the epidermal root surfaces. This may lead to the penetration of bacteria to conducting plants tissues and eventually to their colonization by the bacteria. In the other words, the type of nodulating agent influenced not only the formation time of paranodules and their morphology but also the distribution of microorganisms in the plant tissues (Fig 2, Fig 3).

However, if seeds or seedlings can be effectively inoculated in growing field crops such as wheat, it may not be important for the bacteria to survive in the soil during the prolonged periods between crops. In this case, the development of inoculation techniques that allow sufficient exposure of the roots to *Azospirillum* strains would be necessary [21]. Efforts at extending N_2 fixing ability to important non-leguminous crops such as cereals has long been a major goal of workers in the field of biological nitrogen fixation

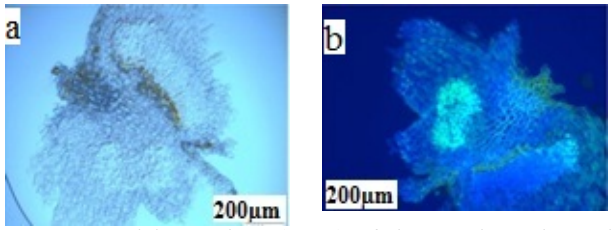


Figure2: Nodules sections (30µm) of durum wheat observed under the microscope without staining (a) and (b) with color (syto13) (×100)

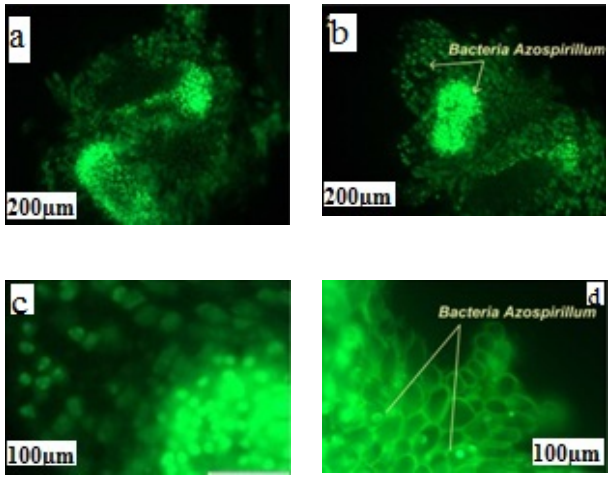


Figure3: Cups durum nodules observed by fluorescence microscopy(a and b) (×100) and (c and d) (×2000)

CONCLUSION

The probability of an effective association of grain appears to be low at present. However, further studies on these relationships will promote the practical application of paranodules for improving the nitrogen nutrition of cereals. In the other word, intensification of research on the interaction microorganism's plants using labeled bacteria is required to follow the path of the bacteria in the para-nodules.

Tools such as genetic analysis by PCR-based markers for the study of parameters that can provide insight into the evolution of symbiotic systems in cereals (wheat). This knowledge will aid in the development of technology that will exploit a favorable plant-bacterial interaction in the production of durum wheat (*Triticum durum* Desf.).

REFERENCES

[1] Kennedy, I.R, and Y.T.Tchan.1992. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops:recent advances.Plant Soil 141:93-118.

[2] Ivan R.Kennedy,Lily L.Pereg-Grek,Graig Wood,Rosalind Deaker,Kate Glichrist and Sunietha Katupitiya,2006.Biological nitrogen fixation in non-leguminous field corps:facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat.SUNFix *Centre for Nitrogen Fixation,Departement of Agricultural Chemistry and soil Science,University of Sydney,NSW,*Australia.

[3] Christisen-weniger C, Vanderleyden J, 1994. Ammonium-excreting Azospirillum sp.become intracellularly established in maize (Zea mays) paranodules.Biol.fertil.soils 17:1-8.

[4] Glagoleva OB, Kovalskaya NU, Umarov MM, 1996. Endosymbiosis formation between nitrogen-fixing bacteria pseudomonas caryophylli and rape root cells.Endocytobiosis,Cell Res.11(2/3).

[5] Hardy RWF, Hilsten RD, Jackson EK, Burms RC, 1968. The acetylene assay for nitrogen fixation.Laboratory and field evaluation.Plant Physiol.43:1195-1207.

[6] Fischer S ; Sandra I. Fischer et al,2007. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat.World J Microbiol Biotechnol 23:895–903

[7] B.E.BACA and C.Elmerich,2007. Chapter 6: Microbial Production of Plant Hormones.*C.Elmerich and W.E.Newton(eds).Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations,*113-143.

[8] N. Narula, A. Deubel, W. Gans, R.K. et al ;2006. Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. Plant soil environment. *52*, (3): 119–129.

[9] Katupitiya S, Millet J, Vesk M, Viccars L, Zeman A, Lidong Z, Elmerich C and Kennedy I, 1995. A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1987–1995.

[10] Shakirov Zair Saatovich,2006. *Azospirilli o*f Uzbekistan soils and their influence on growth and development of wheat plants .Plant and Soil 283:137–145

[11] Gough,C et al.1997.Interaction between Bacterial diazotrophs and the non-legume Dicot Arabidopsis thaliana as model plant,Plant soil,Vol 194, nos1-2,pp.123-130.

[12] Nie,Y;E ,Vesk,M.Kennedy, et al,.1992.Structure of 2,4-D induced Paranodules with Rhizobium on wheat.Phytochemistry,no.11,pp:67-73.

[13] Chen,W.,Xie,Y and Chan,T,.1995.Studies on paranodules of wheat and nitrogen fixation,Abster.10th Int congr on Nitrogen Fixation,St.Petersburg.pp:358

[14] Fischer S , Rivarola V, Mori GB. 2000.Colonization of wheat by *Azospirillum brasilense* Cd is impaired by saline stress. Plant Soil 225:187–191.

[15] Azlin C O, Amir H G and Chan L K. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic rhizobacteria from oil palm roots. Malaysian Journal of Microbiology 1: 32–36.

[16] Luquet, D., Begue, A., Vidal, A., Clouvel, P., Dauzat, J., Olioso, A., Gu, X. F., and Tao, Y. 2003. Using multidirectional thermography to characterize water status of cotton. *Remote Sensing of Environment* , Vol. 84, No. 3, pp. 411-421.

[17] Sertsu,S and T.Bekele,2000. Procedures for soil and plant analysis.Ethiopian Agricultural Reaserch organization,Addis Ababa,Ethiopia.

[18] Zeman, A.M.M., Y.T. Tchan, C. Elmerich and I.R.Kennedy, 1992. Nitrogenase activity in wheat seedlings bearing para-nodules induced by 2,4-D and inoculated with Azospirillum. Res.Microbiol., Institute Pasteur Elsevier.143: 847-855.

[19]Hamon M., Pellerin F., Guenet M. et Maauzier G. 1990. Abréges chimie analytique.Méthodes spectrales et analyse organique. Tome 3. 2eme édition. Masson. Paris. p: 232-233.

[20] Alexander G, Rohr R and Bally R 1999 .A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella. Appl. Environ.Microbiol. 65(10), 4701–4704.

[21] Lily Pereg Grek, Kate Gilchrist, and Ivan R.Kennedy,2000. Mutants with Enhanced nitrogenase activity in hydroponic Azospirillum brasilense-wheat Associations.Applied and environmental Microbiology.p.2175-2184.

[22] Francisco Jr.PB, Akao S,1993.2,4-D induced wheat paranodules are modified lateral roots with structures enhanced by rhizobial inoculation.Plant soil,157:121-129.

[23] Reynders L, Vlassak K, 1992. Use of Azospirillum brasilense as biofertilizer in intensive wheat cropping. Plant Soil 66:217-273.

[24] Christisen-weniger ,1993. Ammonium-excreting Azospirillum sp.become intracellularly established in maize (Zea mays) paranodules.Biol.fertil.soils 17:1-8.

[25] Fallik E,Okon Y, 1996. Inoculants of Azospirillum brasilence: biomass production, survival and growth promotion of Seteria italic and Zea mays. Soil Biol.Biochem.28:123-126.

[26] Malik KA, Bilal R, Mehnaz S, et al,1997. Association of nitrogen fixing,plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) with Kallar grass and rice.Plant Soil 194:37-44.

[27] Kapulnik Y, Sarig S, Nur I, Okon Y, 1983. Effect of Azospirillum inoculation on yield of field-grown wheat.Can.J.Microbiol.29:895-899.

[28] Weber OB, Baldani VLD, Teixeira KRS, et al, 1999. Isolation and characterization of diazotrophs from banana and pineapple plants.Plant Soil 210:103-113.

[29] Dobbelaere S, Croomenborghs A, Thys A, Ptacek D, et al, 2001.Responses of agronomically important crops to inoculation with Azospirillum.Aust.J.Plant Physiol.28:871-879.

[30] Okon Y, Kapulnik Y, 1986. Development and functions of Azospirillum inoculated roots.Plant Soil 90:3-16.

[31] Murty MG, Ladha JK, 1988. Influence of Azospirillum inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions.Plant Soil 108:281-285.

[32] Zavalin AA, Kandaurova TM, Vinogradova LV, 1998. Influence of nitrogen fixing microorganisms on the nutrition and productivity of spring wheat, and on the characteristics of photosynthesis of different varieties of spring wheat. In ElmerichC,Kondorosi A, Newton WE,eds. Biological Nitrogen Fixation for the 21st century. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers,413-414.

[33] Saubidet MI, Fatta N, Barneix AJ, 2000. The effects of inoculation with Azospirillum brasilense on growth and nitrogen utilization by wheat plants.Plant Soil 245:215-222.

Chapitre 3 : Etude de la formation des paranodules racinaires chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) inoculé avec *Frankia Cci3* et traiter par 2,4-D

Ce chapitre constitue la troisième partie abordée lors de mon travail de thèse. Il concerne la formation de paranodules racinaires chez le blé dur (GTA/DUR) traité par l`hormone de croissance 2,4-dichlorophenoxyacetate et inoculé avec l' actinomycète Frankia Cci3 sous serre.

Ce travail a été réalisé au laboratoire génétique biochimie et biotechnologie végétales (GBBV) au sein de l'équipe de recherche biotechnologie et amélioration des plantes à l'université Constantine 1.

La plupart des expériences ont été réalisé par la stagiaire en Master 2 Djemel Amina, supervisé par moi même sous la direction du Pr Djekoun Abdelhamid. Par ailleurs, l'ensemble des études, concernant les observations microscopiques sur les racines de blé dur, ont été effectuées par moi même.

Une partie de ce travail a également fait l'objet d`une publication dans le journal : African journal of Biotechnology.

1. Problématique

Les symbioses actinorhiziennes les plus connus sont des interactions mutuelles entre les arbres ou arbustes et l'actinomycète *Frankia*, ce qui conduit à la formation de nodules racinaires (Perrine-Walker *et al*., 2010). Ces derniers sont des organes spécialisés pour l'assimilation d'azote induite à partir de la fixation symbiotique de l'actinomycète.

Après avoir démontré la capacité d'*Azospirillum brasilense* à induire une nodulation racinaire chez le blé dur (*cf.* Chapitre 2), il semblait intéressant d'effectuer les mêmes expériences en utilisant l'actinomycète *Frankia* sur le blé dur. En effet, celle-ci semble présenter d'importants effets bénéfiques sur les arbres et les arbustes (Perrine-Walker *et al*., 2010). Qu'en est-il réellement avec le blé dur ? Et laquelle de ces souches entre *Azospirillum brasilense* et Frankia sera la plus efficace ?

La détermination de la présence de paranodules dans cette étude a consisté à vérifier leur formation suite à l'inoculation du blé dur avec l'actinomycète *Frankia* accompagnée ou non d'un traitement de 2,4-D et ceci à travers l'observation microscopique des racines.

2. Résultats

2.1. Dans le milieu hydroponique

2.1.1. L'effet du 2,4-D et Frankia sur le système racinaire et foliaire

L`inoculation du blé dur avec *Frankia* seulement à augmenter la longueur des racines latérales. Lorsqu'elle est combinée avec un traitement au 2,4-D, la longueur des racines est petite, et les latéraux ne sont guère absents (Figure 1).

La longueur des pousses des plantes inoculés et traités était moins importante que le contrôle. Les plantes inoculées ont présenté la longueur maximale des feuilles (Tableau 1, Figure 1). Une coloration rouge a été observée sur certaines parties des racines (Figure 2).

2.1.2. L'effet du 2,4-D et Frankia sur la nodulation

La formation des para-nodules est plus prononcée lorsque l'inoculation est combiné avec du 2,4-D, en terme de nombre et de taille, et la distribution de para-nodules est irrégulière mais observé le long de la longueur des racines (Figure 3, Figure 4).

Cependant, les para-nodules résultant de la simple inoculation avec Frankia sont plus petits, moins nombreux, ont une répartition irrégulière (Figure 3, Figure 4), et présentent plusieurs formes (Figure 5).

2.1.3. Isolement de Frankia à partir des racines et nodules de blé dur

Après l`isolement, il a été déterminé que Frankia colonise aussi bien les racines et les para-nodules obtenus par la combinaison de 2,4-D et de Frankia, et également ceux obtenus par inoculation avec Frankia seulement (Figure 6).

2.2. Dans le sable

2.2.1. L'effet du 2,4-D et Frankia sur le système racinaire

La longueur des racines a été affectée par l'inoculation et le traitement avec le 2,4-D, les racines des plantes contrôle étaient plus courts que ceux inoculés et traités et ceux qui sont seulement inoculés avec Frankia (Figure 7 et 8).

2.2.2. L'effet du 2,4-D et Frankia sur la nodulation

Les para-nodules ont été obtenus lorsque l'inoculation avec Frankia a été combinée avec le 2,4-D et même sans 2,4-D. Ainsi, quand on ajoute le 2,4-D, il y avait plus de para-nodules, en termes de nombre, de la taille et la racine était plus grande dans certaines zones (Figure 9).

2.3. L'effet PGPR de Frankia

L'actinomycète *Frankia* a exprimé positivement la capacité de promouvoir la croissance des plantes, ceci par la production de l'AIA, l'ammoniac et par la solubilisation du phosphate.

3. Discussion

Les résultats de cette étude montrent que l'élongation des racines et la formation des racines, même latérale ont été fortement inhibées par le 2,4-D ceci est en accord avec les résultats obtenus par d'El-Shahed et *al.*(2006), qui ont montré que des concentrations différentes 2,4-D en combinaison avec *Nostoc rivulare* diminué la longueur des racines et les pousses de blé, de maïs et de riz, tandis que la simple application de *Nostoc rivulare* est considérablement améliorée par le poids des racines ainsi que la hauteur de la plante que nous avons observé dans ce travail avec *Frankia.* Fischer et *al.* (2000), ont montré aussi que les plantes de blé tendre traités avec le 2,4-D (0,4µg/ml) et inoculés avec *Azospirillum brasilense* présentés des racines courtes.

Par ailleurs, l'allongement important de la racine de blé uniquement inoculé avec *Frankia* est peut être due à l'oxygénation des racines dans des flacons, ceci en comparaison avec certains genres actinorhizien où la longueur des racines et des nodules est inversement corrélée avec la tension externe à l'oxygène (Pawlowski and Demchenko, 2012).

De plus, la zone rose observée sur les racines inoculées avec *Frankia* sans ajouter le 2,4-D est probablement colonisée par *Frankia,* ainsi cette coloration est liée à la protéine de l'hémoglobine. Ceci a été confirmé par Pawlowski et Demchenko (2012), ils ont noté que les promoteurs de soja leghémoglobine et de l'hémoglobine symbiotique de *Casaurina glauca* sont à la fois particulièrement active dans les cellules qui s'adaptent de manière stable le microsymbiote.

D'autres parts, la formation de para-nodule grâce à un traitement au 2,4-D est un processus physiologique indépendant de l'action bactérienne (Francisco et Akao, 1993). Il est fortement possible que les para-nodules obtenus dans notre étude sans le 2,4-D ont été induits par l'effet *Frankia*, en comparant avec les travaux de Saatovich, (2006) qui a obtenu des para-nodules sans ajouter des phytohormones sur les racines de blé inoculés avec *Azospirillum* en utilisant deux souches A1-3 et A13- 6.

Les nodules fraîches obtenues, et des morceaux de racine (disséqué, stérilisées en surface pendant 20 minutes dans 30% de H_2O_2, lavées plusieurs fois dans de l'eau distillée stérile

(Mansour *et al.*, 1990), puis incubées dans du milieu DPM à 30°C pendant 3 semaines (Gtari *et al*.,2004) a révélé que *Frankia* colonisé les deux.

Les actinomycètes endophytes ont été signalés comme de nouvelles sources de composés bioactifs et ont des effets bénéfiques sur la plante hôte par la protection des agents pathogènes ainsi que l'inscription en favorisant la croissance végétale (Suttiviriya *et al.*, 2008). Selon Berry et *al*., (1989) AIA sécrétion par *Frankia* dépend de la présence de tryptophane exogène dans le milieu de culture, ce qui est confirmé dans la présente étude. En l'absence de tryptophane exogène fourni, aucun ou seulement des niveaux de composés indole faibles ont été détectés (Berry *et al*.,1989).

La présence d'actinomycètes à l'intérieur des plantes confère de nombreux avantages pour des plantes telles que la capacité de solubiliser le phosphate (Gangwar *et al*., 2012.), Dans le présent travail, *Frankia* exprime une solubilisation de phosphate positif, selon subsaharienne et Nehra (2011), qui ont déclaré que la solubilisation du phosphate est un trait important dans un PGPB pour augmenter les rendements des plantes.

Une autre importante trait favorisant la croissance des plantes, qui peuvent influencer indirectement sur la croissance des plantes, est la production d'ammoniac (Yadav *et al,*. 2010), ce qui est le cas pour l'actinomycète *Frankia*.

Pour conclure, dans cette étude, nous avons trouvé que l'actinomycète *Frankia* stimule la croissance des racines et la capacité a favorisé la croissance de la plante. Ces résultats peuvent être appliqués par la suite aussi bien dans des conditions contrôlées qu'au champ pour augmenter ainsi le rendement de blé dur. Comme perspective, *Frankia* peut être combiné avec une rhizobactéries (PGPB) afin de les utiliser comme engrais biologique en combinant leurs deux effets bénéfiques.



Figure1: Effet du 2,4-D et *Frankia* sur le système racinaire (A).Dans la chambre de culture. (B).Dans la serre.

1. Témoin.2-3.Plantes inoculées avec *Frankia*. 4-5. Plantes inoculées avec *Frankia* et traitées avec le 2,4-D.

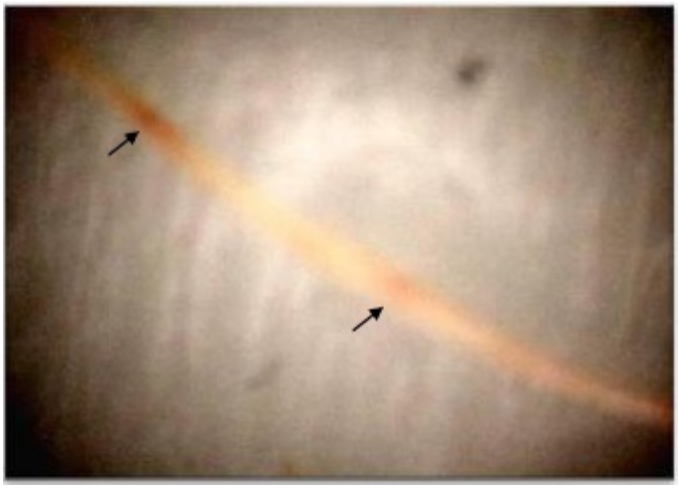


Figure 2: Coloration rouge sur les racines de blé dur inoculée *Frankia*

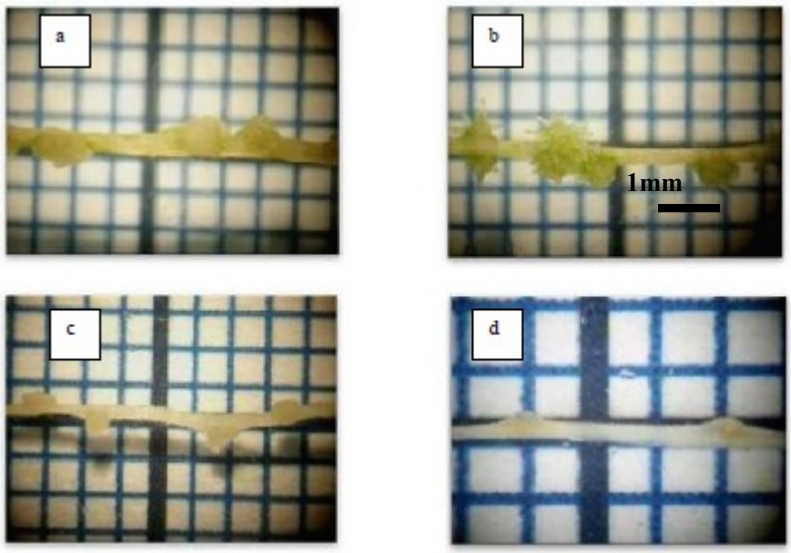


Figure 3 : Observation au microscope binoculaire des *para*-nodules. a-b. *Induction des Para*-nodules par *Frankia* et le 2,4-D. c-d. *Induction des Para*-nodules par inoculation avec *Frankia (×100)*

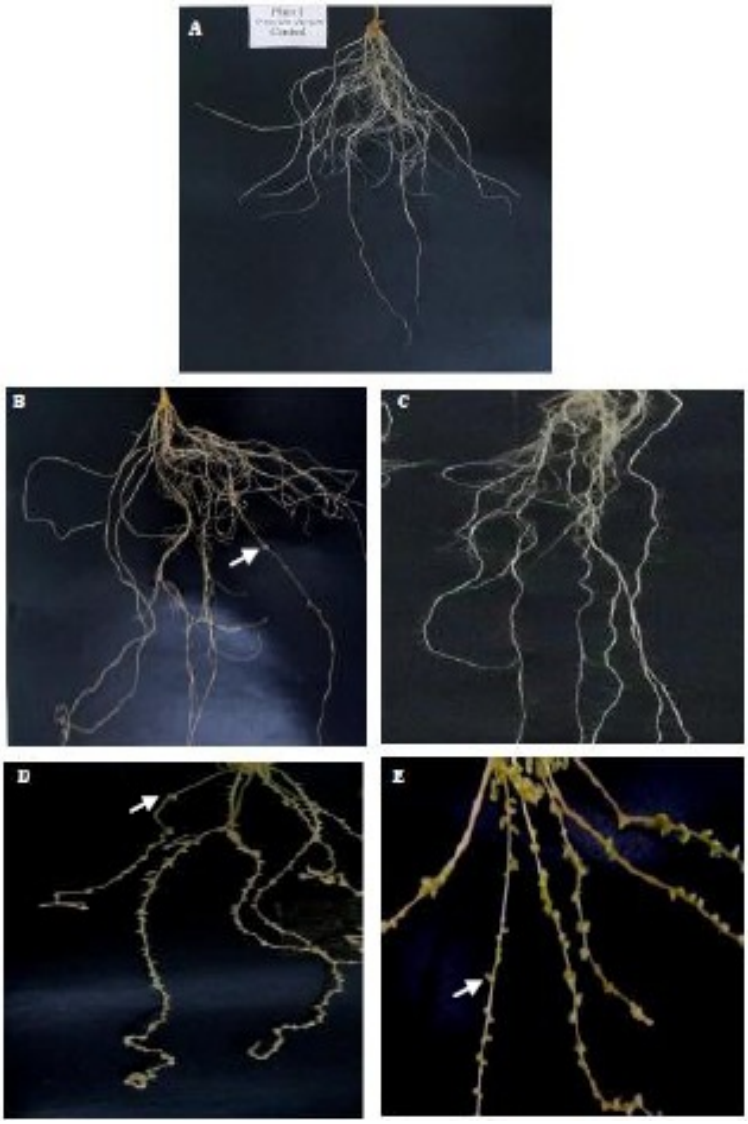


Figure 4 : Différentes racines de blé dur. A. Racine témoin B. Racine inoculée avec *Frankia* (chambre de culture) C. Racine inoculée avec *Frankia* (la serre). D. Racine inoculée avec *Frankia* et traitée par le 2,4-D (chambre de culture). E. Racine inoculée avec *Frankia* et traitée par 2,4-D (la serre)

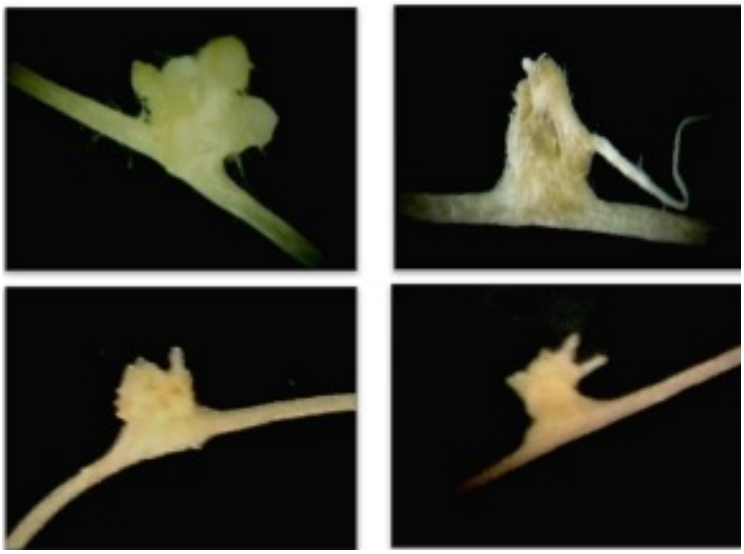


Figure 5: Observation des différentes formes des *para*-nodules obtenus par inoculation du blé dur avec *Frankia.*



Figure 6: Isolement de *Frankia* dans le milieu DPM. a. filaments isolés a partir des *para*-nodules obtenus suite a une inoculation avec Frankia. b. filaments isolés a partir des *para*-nodules obtenus par inoculation avec *Frankia* et le 2,4-D. c. filaments isolés a partir des racines de blé dur.

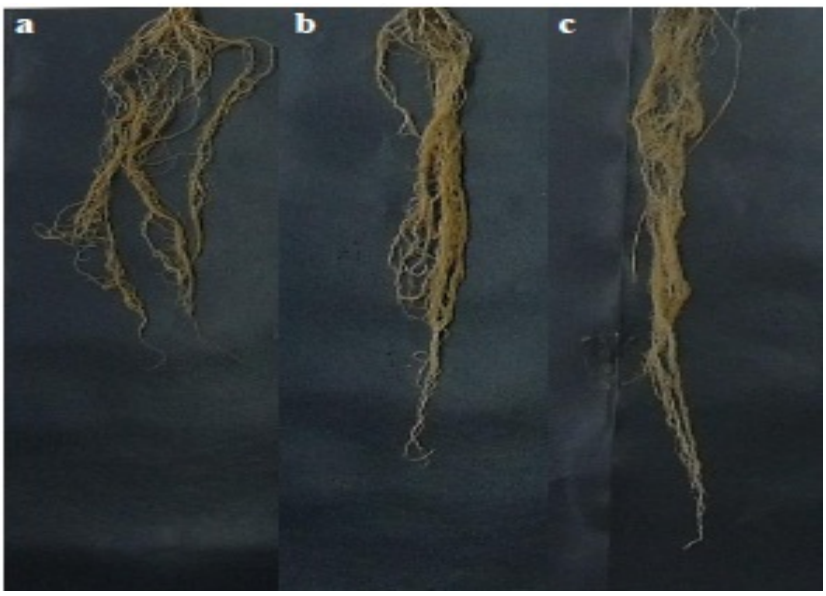


Figure 7: Effet du 2,4-D sur l'inoculation des racines latérales. a. Témoin b. Racine inoculée avec *Frankia* et traitée avec le 2,4-D. c. Racine inoculée avec *Frankia*.

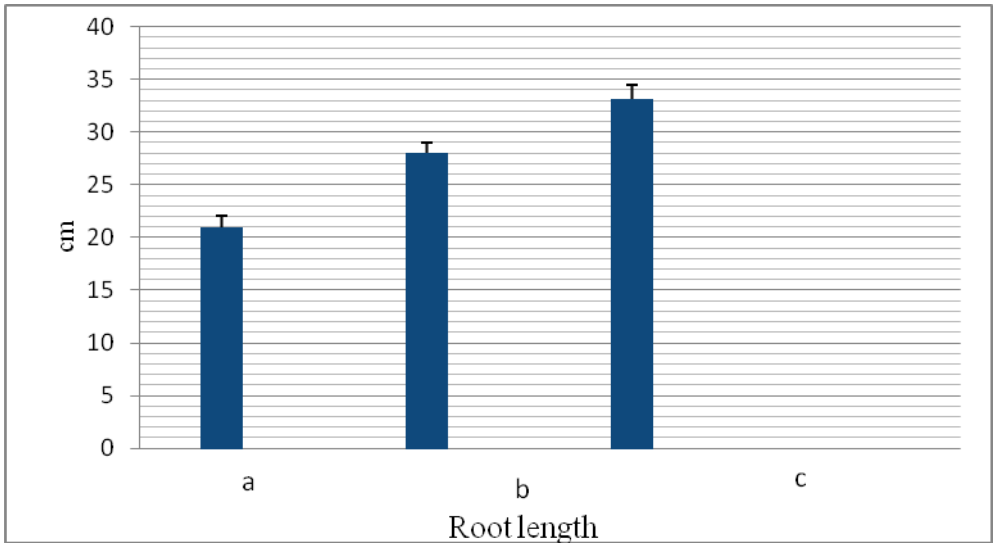


Figure 8: Différences de longueur des racines (cm). a. Témoin b. Racine inoculée avec *Frankia* et traitée avec le 2,4-D. c. Racine inoculée avec *Frankia*

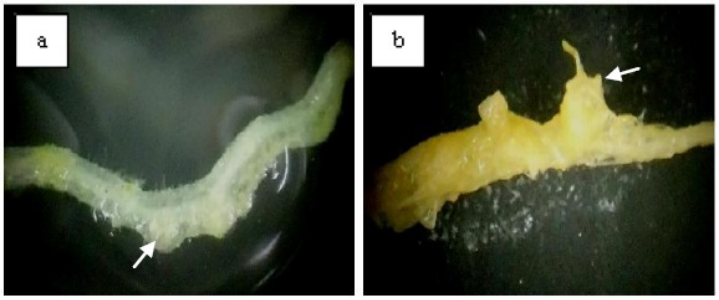


Figure 9: Observation avec le microscope binoculaire des *para*-nodules. a. *Para*-nodules obtenu après inoculation avec *Frankia*. b. *Para*-nodules obtenu après inoculation avec *Frankia* et traitement par le 2,4-D.

Tableau 1: Développement des feuilles et des racines après 3 mois d'inoculation

Paramètres	Conditions de culture					
	Dans la chambre de culture			Dans la serre		
	Plantes Témoins	Plantes traitées par le 2,4-D et inoculées avec *Frankia*	Plantes inoculées avec *Frankia*	Témoins	Plantes traitées par le 2,4-D et inoculées avec *Frankia*	Plantes inoculées avec *Frankia*
Longueur des feuilles (cm)	31.333±2.081	24.000±6.082	36.666±0.577	31.333±2.081	22.333±5.773	34.666±2.309
Longueur des racines (cm)	41.333±17.953	14.333±7.571	48.667±10.785	41.333±17.953	11.667±1.154	78.000±17.349

4. Publication

Study of root *para*-nodules formation in wheat (*Triticum durum Desf.*) inoculated with *Frankia* strain CcI3 and treated with 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D)

Cette publication présente des données spécifiques à la formation des paranodules chez le blé dur inoculé par l'actinomycète *Frankia* CcI3 avec ou sans traitement de 2,4-D.

Nous avons démontré que Frankia possède la capacité de noduler le blé dur en présence ou en absence de 2,4-D. Cependant, les paranodules obtenus sans l'induction de 2,4-D sont plus petits et distribués d'une façon irrégulière sur les racines de blé dur, inoculés avec *Frankia CcI3*.

L'étude de l'élongation racinaire de blé dur inoculé avec *Frankia CcI3* et traité avec le 2,4-D montre une croissance limitée au niveau racinaire. Ainsi, le 2,4-D semble affecter la croissance racinaire du blé dur. En revanche, le blé dur inoculé avec *Frankia CcI3* et sans traitement de 2,4-D semble présenter un bon développement racinaire.

De ce fait, cette étude effectuée et qui concerne l'inoculation du blé dur avec *Frankia CcI3* et sans traitement de 2,4-D a validé clairement l'importance de leur interaction dans le développement et l'élongation du système racinaire mais aussi dans la formation des paranodules.

academicJournals

Vol. 12(35), pp. 5427-5430, 28 August, 2013
DOI: 10.5897/AJB12.2817
ISSN 1684-5315 ©2013 Academic Journals
http://www.academicjournals.org/AJB

African Journal of Biotechnology

Full Length Research Paper

Study of root *para*-nodules formation in wheat (*Triticum durum*) inoculated with *Frankia* strain Ccl3 and treated with 2, 4-dichlorophenoxyacetate (2, 4-D)

Djemel Amina N.*, Benmati Mahbouba, Ykhlef Nadia, Belbekri Nadir and Djekoun Abdelhamid

Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales University Mentouri of Contantine, Algeria.

Accepted 23 August, 2013

Frankia **strains can induce N_2-fixing root nodules on certain non-leguminous plants. It is known that exogenous application of 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D) affects root morphology. In this work, wheat roots were treated with 2,4-D and inoculated with the actinomycete *Frankia*. Wheat plants grew in a growth chamber with hydroponic medium. Binocular observation revealed that para-nodules were formed when wheat roots were inoculated with *Frankia* and the root length was enhanced. When the inoculation with *Frankia* was combined to 2,4-D treatment, the para-nodules formed were bigger and more numerous, while the root length was shortened.**

Key words: *Frankia*, wheat, roots, *para*-nodules, 2,4-dichlorophenoxyacetate.

INTRODUCTION

Actinomycetes are found in soil, rhizosphere, ponds and lake sediments. They are a large group of bacteria that can produce secondary metabolites which have important applications in pharmacy, medicine and agriculture (Suttiviriya et al., 2008). Actinorhizal symbioses are mutual interactions between plants, such as *Casuarina glauca* and *Alnus glutinosa*, and the soil bacteria *Frankia* that lead to the formation of root nodules (Perrine-Walker et al., 2010), which are specialized organs for assimilation of the N derived from fixation by the symbiotic bacteria (Berry et al., 2004). Little is known about the signals exchanged between the two partners during the establishment of actinorhizal symbioses (Perrine-Walker et al., 2010).

Synthetic auxins exogenously applied stimulated lateral root primordium initiation on *Alnus* roots, an important step in nodule formation, and thus auxins may play a role in the actinorhizal nodulation process (Berry et al., 1989). It is known that nodule like structures, could be induced by 2,4-D on plant roots and that they could be colonized by microorganisms (Zeman et al., 1992). Little studies were realized about the interaction between *Frankia* and wheat. Soil with *Frankia* had significant effects on canola shoot length, plant dry weight, number of leaves, and total N, but not on wheat shoot length, fresh and dry weight of shoots and ears, dry weight of roots and total N (Cusato and Tortosa, 2000). In this work, para-nodules were induced using 2,4-D and inoculation with *Frankia* and an eventual growth promoting on root system was elucidated.

MATERIALS AND METHODS

Plant host

Seeds of wheat (Triticum durum) were surface-sterilized in 70% ethanol for 20 s, followed by 30 min in a 30% solution of hypochlorite. After various washings with sterile distilled water, the

*Corresponding author. E-mail: aminadjemel@yahoo.fr.

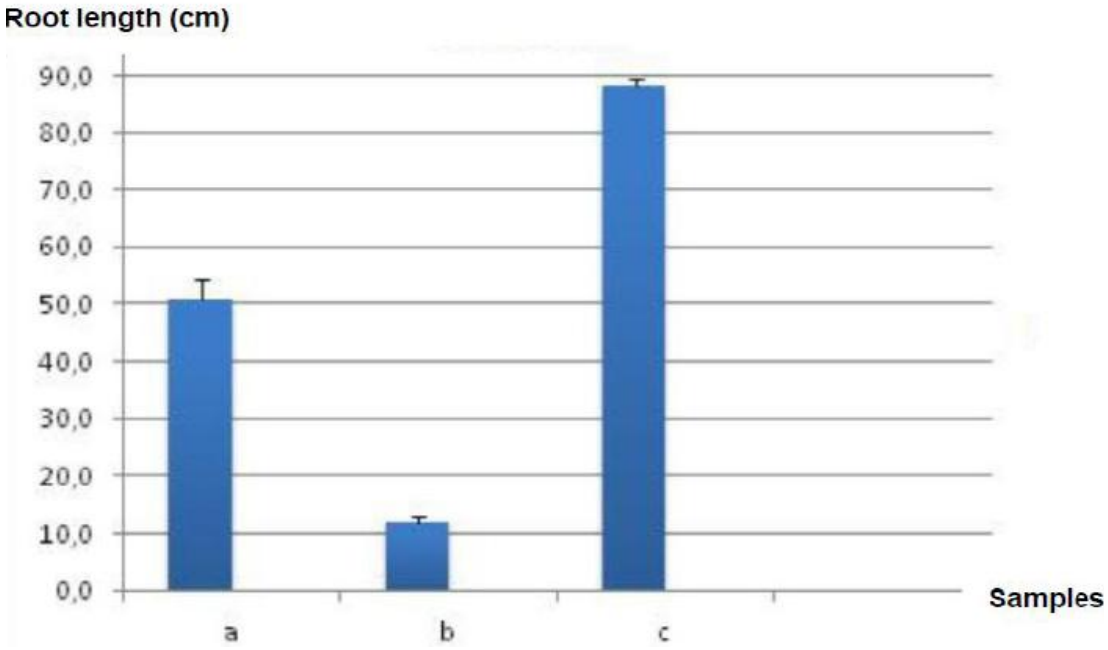


Figure 1. Root length difference (cm). **a.** control. **b.** inoculated root with Frankia and treatment by 2,4-D. **c.** inoculated root with Frankia.

seeds were germinated in the dark under sterile conditions on moist filter paper in Petri dishes (Saatovich, 2006). The germinating seeds were then placed in 1 L bottles (sterilized by UV) containing sterile hydroponic solution and grown until one week old before inoculation with Frankia. 0.4 mg/l of 2,4-D was added to hydroponic solution for para-nodule induction.

Bacterial material

20 ml of Frankia strain Ccl3 culture (isolated from Casuarina glauca) were centrifuged at 5000 rpm for 15 min. The supernatant was eliminated; 5 ml of sterile distilled water were added to the residuum to reduce Frankia hyphae, using sterile syringe. 15 ml of sterile distilled water were added to the suspension and used for inoculation. Seedlings of wheat were grown for three months.

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of 2, 4-D and *Frankia* on root system

Inoculation with *Frankia* alone increased the root length. When combined with 2,4-D treatment, the root length was considerably shortened (Figure 1), and the lateral ones were hardly absent. These results are in accordance with those of El-Shahed and Abdel-Wahab (2006), who established that different 2,4-D concentrations in combination with *Nostoc rivulare* decrease root length in wheat, maize and rice, while the simple application of *N. rivulare* significantly enhances shoot and root weight as well as plant height as we observed in this work with *Frankia*. Fischer et al. (2000), showed that wheat plants are treated with 2,4-D (0.4 μg /ml) and inoculated with *Azospirillum brasilense* present shorter roots.

Seedlings of wheat (*Triticum durum*) grew, during 3 months, in bottles containing hydroponic solution which is composed of 0.4 mg/l of 2,4-D and 20 ml of suspended *Frankia* strain Ccl3 (isolated from *Casuarina glauca*). A represent control, B as inoculated root with *Frankia* and treatment by 2,4-D and C as inoculated root with *Frankia*. The significant elongation of wheat root only inoculated with *Frankia* due to the root oxygenation in bottles which was reduced, in comparison with some actinorhizal genera where the length of nodule roots is inversely correlated with the external oxygen tension (Pawlowski and Demchenko, 2012).

A pink coloration was observed on certain inoculated root parts. These pink zones were probably colonized by *Frankia* and the coloration was related to hemoglobin protein. Pawlowski and Demchenko (2012) noted that the promoters of soybean leghemoglobin and of the symbiotic hemoglobin from *C. glauca* are both specifically active in cells that stably accommodate the microsymbiont.

Effects of 2,4-D and *Frankia* on *para*-nodulation

Para-nodulation was more pronounced when inoculation was combined with 2,4-D, in terms of number and size, and the distribution of *para*-nodules was irregular but observed along the root length. The *para*-nodules resulting from the simple inoculation with *Frankia* were smaller, less numerous, had an irregular distribution and presented

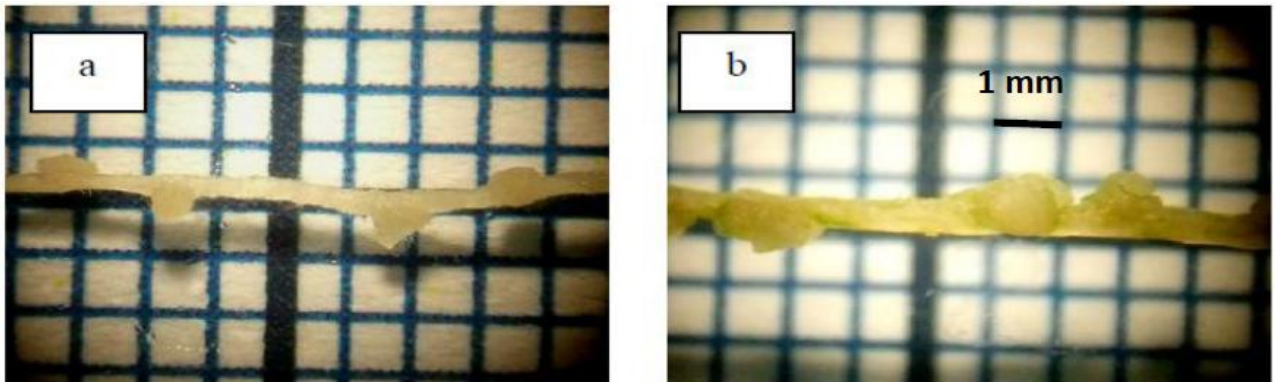


Figure 2. Binocular observation of para-nodules. **a.** Para-nodules induced by the inoculation with Frankia. **b.** Para-nodules induced by the combination between Frankia and 2,4-D.

several shapes (Figure 2). *Para*-nodule formation through 2,4-D treatment is a physiological process independent from bacterial action (Francisco and Akao, 1993). It is strongly possible that *para*-nodules obtained in our study without adding 2,4-D were resulting from the *Frankia* colonization, comparing to Saatovich (2006) who obtained *para*-nodules without the addition of phytohormones on the roots of wheat plants inoculated with *Azospirillum*. Biabani et al. (2012) reported that the colonization of *para*-nodules is more extensive than that of lateral root emergence sites in plants which are not treated with 2,4-D as we found in the present study.

Actinorhizal nodules have an indeterminate growth pattern, which generally consist of numerous conical-shaped lobes and may or may not exhibit nodular roots. The *Rhizobium*-induced nodule can be spherical, cylindrical or collar-shaped according to the patterns of plant cell division and growth of cortical cells as reported by Diouf et al. (2003), while in this study other shapes were obtained in addition to those described by Diouf et al. (2003) and some shapes exhibited root that emerged from the nodules and 2,4-D induced *para*-nodules.

Isolation of *Frankia* from wheat root and nodules

After an isolation experiment, by disinfecting the nodules with 30% of H_2O_2 (Mansour et al., 1990), pleasuring them, then incubating these ones in liquid DPM medium at 30°C (Gtari et al., 2004) for 5 to 9 weeks, it was determined that *Frankia* colonized root and both *para*-nodules obtained by the combination of 2,4-D and *Frankia*, and those obtained only by inoculation with *Frankia*. The quantity of *Frankia* filaments was higher in *para*-nodules obtained when 2,4-D was combined with *Frankia*.

In this study we found that, for the first time, that the actinomycete *Frankia* stimulated the root growth and induced the *para*-nodulation of wheat root. We suggest that *Frankia* may be regarded as Plant Growth Promoting Bacteria and may be used as biofertilizer. These results indicate that *Frankia* has the potential to be applied in natural conditions to increase the root length of wheat plants.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to the engineers of the laboratory and to Mrs Bouldjadj Ryma for providing materials of this work.

REFERENCES

Berry A, Kahn R, Booth M (1989). Identification of indole compounds secreted by *Frankia* HFPArI3 in defined culture medium. Plant Soil 118: 205-209.

Berry A, Murphy T, Okubara P, Jacobsen KR, Swensen SM, and Pawlowski K (2004). Novel expression pattern of cytosolic Gln synthetase in nitrogen-fixing root nodules of the actinorhizal host, *Datisca glomerata*. Plant Physiol. 135(3): 1849-1862.

Biabani A, Boggs LC, Kovalskaya N, Umarov M (2012). Microscopic morphology of nitrogen fixing paranodules on wheat roots. Afr.J.Biotechnol. 11(12): 2971-2976.

Cusato MS, Tortosa RD (2000). Frankia and crops interactions. Phyton 68: 47- 53.

Diouf D, Diop TA, Ndoye I (2003). Actinorhizal, mycorhizal and rhizobial symbioses: how much do we know? Afr.J.Biotechnol. 2 (1): 1–7.

El-Shahed AM, Abdel-Wahab AM (2006). Para-nodule induction in wheat, maize and rice with 2,4-D and its infection with *Nostoc rivulare* kutzing. Pak.J.Biol.Sci. 9(9): 1693-1699.

Fischer S, Rivarola V, Mori G (2000). Colonization of wheat by *Azospirillum brasilense* Cd is impaired by saline stress. Plant Soil 225:187-191.

Francisco P, Akao S (1993). The 2, 4-D-induced wheat para-nodules are modified lateral roots with structure enhanced by rhizobial inoculation. Plant Soil 157:121-129.

Gtari M, Brusetti L, Gharbi S, Mora D, Boudabous A, Daffonchio D (2004). Isolation of *Elaeagnus*-compatible *Frankia* from soils collected in Tunisia. FEMS Microbiol.Lett. 234:349-355.

Mansour SR, Dewedar A, Torrey JG (1990). Isolation, Culture, and Behavior of *Frankia* Strain HFPCgI4 from Root Nodules of *Casuarina* glauca. Bot.Gaz. 151: 490-496.

Pawlowski K, Demchenko KN (2012). The diversity of actinorhizal symbiosis. Protoplasma 249(4):967-79.

Perrine-Walker F, Doumas P, Lucas M, Vaissayre V, Beauchemin NJ, Band LR, Chopard J, Crabos A, Conejero G, Péret B, King JR, Verdeil JL, Hocher V, Franche C, Bennett MJ, Tisa LS, Laplaze L (2010). Auxin carriers localization drives auxin accumulation in plant

cells infected by *Frankia* in *Casuarina glauca* actinorhizal nodules. Plant Physiol.154:1372–1380.
Saatovich SZ (2006). Azospirilli of Uzbekistan soils and their influence on growth and development of wheat plants. Plant Soil 283:137-145.
Suttiviriya P, Vajrodaya S, Thamchaipenet A (2008). Production of plant growth promoting agents from endophytic actinomycetes. 34th Congress on Science and Technology of Thailand.
Zeman AM, Tchan YT, Elmerich C, Kennedy IR (1992). Nitrogenase activity in wheat seedlings bearing *para*-nodules induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and inoculated with *Azospirillum.* Res. Microbiol.143:847-855.

Chapitre 4 : Effet de l'inoculation de blé dur (*Triticum durum* Desf.) avec les PGPR (*Azospirillum brasilense*, *Bacillus* sp et *Frankia CcI3*) et tolérance au déficit hydrique

Ce chapitre constitue la quatrième partie de mon travail de thèse. Il concerne les effets de l'inoculation du blé dur Triticum durum Desf. avec les PGPR Azospirillum brasilense, Bacillus sp et Frankia CcI3 sous l'effet d'un stress hydrique.

L'étude effectuée concerne l'inoculation de deux variétés de blé dur (GTA/DUR et WAHA) par trois souches de PGPR (Azospirillum brasilense, Bacillus sp et Frankia CcI3) pour mesurer ensuite plusieurs paramètres physiologiques et biochimiques dans le but de déterminer le rôle PGPR de ces rhizobactéries face au déficit hydrique.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biochimie Génétique et Biotechnologie Végétales (BGGV) dans l'équipe de Biotechnologie et Amélioration des Plantes à l'université Constantine 1, supervisé par le Pr Djekoun Abdelhamid.

Dans cette étude, j'ai effectué les expériences d'inoculation de blé dur (GTA/DUR et WAHA) avec les rhizobactéries : Azospirillum brasilense et Bacillus sp et l'actinomycète Frankia CcI3, sous conditions contrôlées en serre. J'ai également mesuré l'ensemble des paramètres physiologiques et biochimiques.

1. Problématique

Le stress est un écart important par rapport aux conditions optimales de la croissance. Ainsi, en condition de stress la demande des plantes en ressources augmente, ce qui entraine une réduction de la croissance des plantes. Celle-ci se traduit au niveau cellulaire et moléculaire limitant fortement le rendement (Pereira *et al*., 2008).

Les bactéries du genre *Azospirillum* font partie des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) et détectées pour la plupart dans la rhizosphère de nombreuses plantes cultivées. Ces bactéries sont à Gram négatif, appartenant au groupe Protobacteria (Kloepper 2003). Elles sont capables de fixer l`azote, d'augmenter la croissance des racines, d'assurer un bio-contrôle contre les agents pathogènes mais également de produire des substances telles que des phytohormones (auxine) ou des protéines comme des polyamines induisant ainsi une tolérance des plantes face au stress (Russo *et al*., 2008).

De nombreux chercheurs ont indiquée qu'*Azospirillum* spp peut atténuer les effets défavorables de la sécheresse sur la croissance des plantes (Arzanesh *et al*., 2009). L'efficacité d'association entre *Azospirillum* et la plante hôte diminue sous des contraintes telles que l'eau et la carence en éléments nutritifs. D'autre part, soumis à un stress accentué la capacité des microorganismes du sol pour atténuer le stress peut être améliorée (Miransari and Smith, 2007 ; Miransari *et al*., 2007, 2008). Ces conditions sont fréquentes dans les zones arides et semi-arides partout dans le monde.

Bien qu'il existe des résultats déjà documentés concernant les effets d'A*zospirillum* sur la croissance des céréales en conditions de déficit hydrique, le cas du blé dur reste cependant mal étudié.

Dans ce travail, l'étude de la croissance du blé dur sous l'effet des souches *Azospirillum brasilense* élaboré précédemment est confrontée à des conditions de stress hydrique sévères.

Les objectifs de cette étude sont de :

(1) Evaluer les effets de l'inoculation du blé dur sous stress.

(2) Tester si l'inoculation du blé dur avec les souches PGPR sous l'effet de stress peut restaurer sa croissance.

2. Résultat et discussion

2.1. La teneur relative en eau (TRE)

Une comparaison entre l'évolution de la teneur en eau des plantes témoins et des plantes inoculées du blé dur étudiées montre que la teneur relative en eau diminue au fur et à mesure que le déficit hydrique s'accentue (Tableau 05).

Les teneurs en eau les plus élevées sont notées chez les témoins, avec une valeur maximale de 75,30 ± 0,19 % enregistrée chez GTA/DUR sans inoculation et sans stress (Figure 10). Par opposition, les teneurs en eau les plus faibles sont enregistrées sous l'effet du stress hydrique chez les témoins étudiés.

Tableau 5 : Les moyennes des variables de la teneur relative en eau et leurs groupes homogènes

	TRE (%)	
	GTA /DUR	**WAHA**
Témoin	$75,30 \pm 0,19^{Ae\ h}_{1\ 2}$	$75,24 \pm 0,09^{Be\ h}_{1\ 2}$
Inoculé A	$87,48 \pm 0,17^{Aa\ a}_{1\ 2}$	$85,13 \pm 0,02^{Ba\ d}_{1\ 2}$
Inoculé B	$85,25 \pm 0,08^{Aa\ d}_{1\ 2}$	$87,2 \pm 0,16^{Ba\ b}_{1\ 2}$
Inoculé F	$86,21 \pm 0,11^{Ab\ c}_{1\ 2}$	$84,24 \pm 0,14^{Bb\ e}_{1\ 2}$
Témoin stressé	$46,11 \pm 0,13^{Ag\ k}_{1\ 2}$	$47,59 \pm 0,26^{Bg\ j}_{1\ 2}$
Inoculé A stressé	$72,32 \pm 0,11^{Ac\ f}_{1\ 2}$	$75,28 \pm 0,15^{Bc\ h}_{1\ 2}$
Inoculé B stressé	$74.24 \pm 0,10^{Af\ i}_{1\ 2}$	$74,28 \pm 0,27^{Bf\ i}_{1\ 2}$
Inoculé F stressé	$75,02 \pm 0,12^{Ad\ h}_{1\ 2}$	$76,05 \pm 0,07^{Bd\ g}_{1\ 2}$

A: Inoculé *A. brasilense*, B: inoculé *Bacillus.sp*, F: inoculé *Frankia CcI3*

(A et B) Indice de séparation des groupes homogènes par le Test de NEWMAN-KEULS au seuil α=5%.
(a_1, b_1…) Indice de classement et regroupement des groupes non significativement différents par le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour la variable traitement.
(a2, b2…) Indice de classement et de regroupement des groupes non significativement différent par le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour deux variables (traitement et génotypes).

Les teneurs en eau les plus élevées sont obtenues chez les plantes inoculées avec une valeur maximale de 87,48 ± 0,17 % enregistrée chez GTA/DUR inoculé avec *A.brasilense* (Figure. 10). Par contre, les teneurs en eau enregistrées sont plus faibles sous stress hydrique.

Au niveau de stress 12% de CC, la valeur minimale est observée dans les plantes témoins de 46,11 ± 0,13% et 47,59 ± 0,26 % enregistrée chez GTA et WAHA, alors que la valeur minimale est enregistrée chez les plantes inoculées de 72,32 ± 0,07 % chez GTA/DUR inoculé par *A.brasilense* (Figure 10).

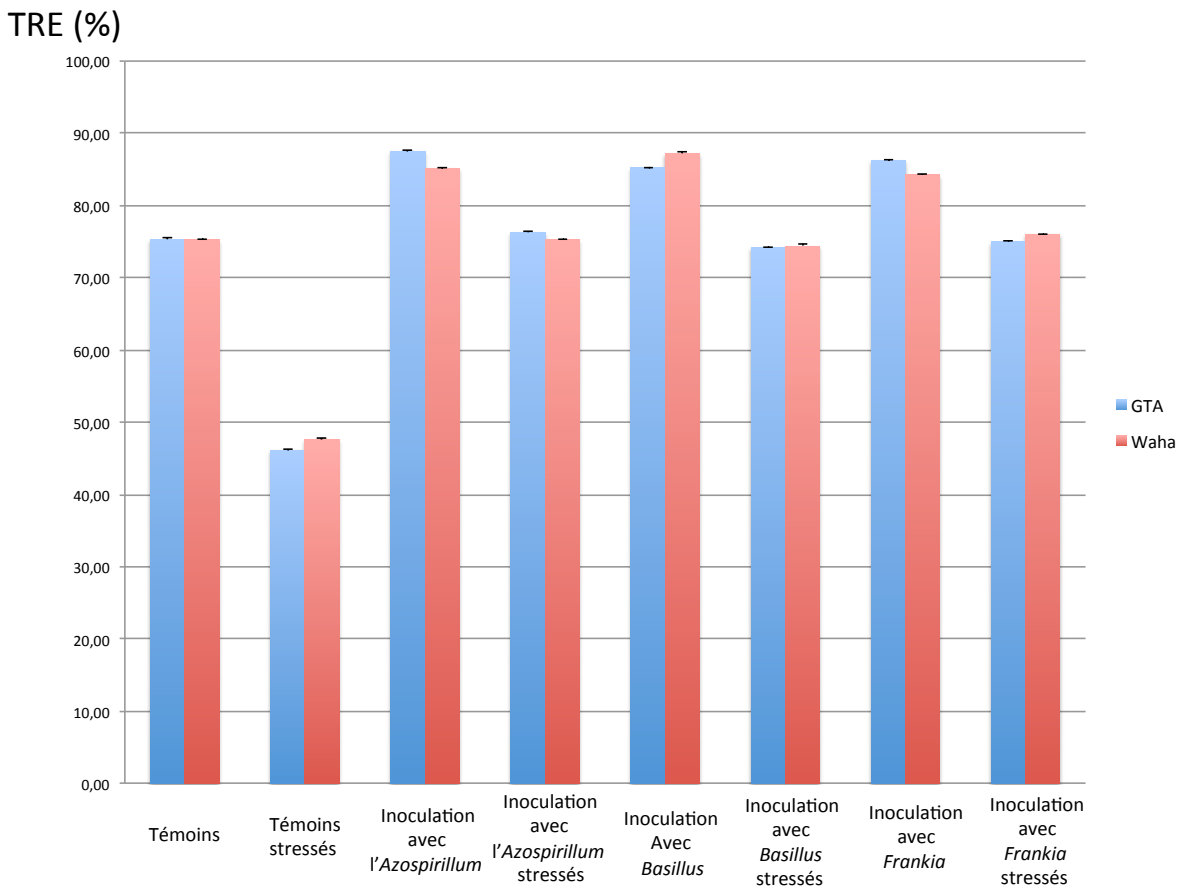


Figure. 10 : Variation de la teneur relative en eau des plantes témoins et plantes inoculées (A.brasilense, Bacillus.sp et Frankia CcI3) de blé dur (GTA/DUR, WAHA) sous condition de stress hydrique

Les résultats présentés dans la figure 10, indiquent que la teneur relative en eau chez le blé dur (GTA/DUR et WAHA) témoin et les inoculés avec les rhizobactéries *A.brasilense*, *Bacillus.sp*. et *Frankia CcI3*. Ainsi, les plantes témoins stressées 12% de CC et inoculées stressé. Nous remarquons que les plantes ont une TRE élevées avec des valeurs maximales obtenues chez les plantes inoculées.

Dans le cas de stress, les valeurs de TRE ne change pas beaucoup chez les plantes inoculées, on obtient pratiquement des valeurs qui sont proche aux celles obtenues chez les plantes témoins sans stress. Cependant, les valeurs de TRE diminuent d'une façon considérable chez les plantes stressées.

La comparaison des moyennes de la teneur relative en eau et l'analyse de variance, montrent qu'il existe une différence très hautement significative entre les génotypes et les traitements et leur interaction (génotype × traitement) (Tableau 02-Annexe.06).

Le test NEWMAN-KEULS au seuil 5% classe le facteur génotype en deux groupes homogènes (Tableau 05), le groupe A (GTA) et B (WAHA), le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% en 9 groupes significativement différents pour la variable traitement. Enfin, le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% en 11 groupes significativement différents pour la variable génotype*traitement.

En effet, le manque d'eau est un élément déterminant pour la croissance des plantes particulièrement en région arides et semi arides. Il induit chez les plantes stressées une diminution du contenu relatif en eau, et une réduction significative de la production de biomasse totale (Albouchi *et al .,* 2000). L'analyse de la teneur relative en eau a permis de décrire d'une manière globale, le statut hydrique en réponse du stress hydrique, d'évaluer l'aptitude à réaliser une bonne osmorégulation et maintenir une turgescence cellulaire (EL Jaafari *et al* ., 2000).

Dans la littérature plusieurs recherches ont montré que la teneur relative en eau des feuilles de blé dur diminue proportionnellement avec la réduction d'eau contenue dans le sol notent que cette diminution est plus répondu chez les plantes témoins (Bajji *et al*., 2001 ; Scofield *et al*., 1988 ; Zeghida *et al.*, 2004).

2.2. Le potentiel osmotique

Une comparaison entre l'évolution du potentiel osmotique des plantes témoins et des plantes inoculées du blé dur étudiées a montré que le potentiel osmotique change sous l'effet du stress (Tableau 06).

Les valeurs du potentiel osmotique les plus élevées sont notées chez les témoins stressés, avec une valeur maximale de -1,040 ± 0,004 Mpa enregistrée chez GTA/DUR.

Le tableau 6 représente les valeurs du potentiel osmotique chez les deux variétés de blé dur (GTA/DUR, WAHA) les témoins et les inoculées (*Azospirillum brasilense*, *Bacillus.sp*. *Frankia CcI3*). Ainsi, chez les plantes témoins stressées 12% de CC et inoculées stressé, nous remarquons que les valeurs ne changent pas beaucoup chez les plantes inoculées, on obtient pratiquement des valeurs qui sont proche a celles obtenues chez les plantes témoins sans stress. Cependant, les valeurs du potentiel osmotique augmentent chez les plantes stressées.

La comparaison des moyennes du potentiel osmotique et l'analyse de variance, montrent qu'il existe une différence très hautement significative entre les génotypes et les traitements et leur interaction (génotype × traitement) (Tableau 04 Annexe.06).

Tableau 6 : Les moyennes des variables du potentiel osmotique et leurs groupes homogènes

	Potentiel osmotique (Mpa)	
	GTA /DUR	**WAHA**
Témoin	$-1,252 \pm 0,033^{Ab}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$	$-1,239 \pm 0,008^{Bb}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$
Inoculé A	$-1,334 \pm 0,036^{Ab}{}_{1}{}^{e}{}_{2}$	$-1,187 \pm 0,037^{Bb}{}_{1}{}^{b}{}_{2}$
Inoculé B	$-1,326 \pm 0,023^{A\,d}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$	$-1,400 \pm 0,011^{Bd}{}_{1}{}^{d}{}_{2}$
Inoculé F	$-1,271 \pm 0,008^{Ab}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$	$-1,273 \pm 0,010^{Bb}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$
Témoin stressé	$-1,040 \pm 0,004^{Aa}{}_{1}{}^{a}{}_{2}$	$-1,051 \pm 0,003^{Ba}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$
Inoculé A stressé	$-1,358 \pm 0,032^{Ad}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$	$-1,326 \pm 0,024^{Bd}{}_{1}{}^{e}{}_{2}$
Inoculé B stressé	$-1,301 \pm 0,006^{Ad}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$	$-1,421 \pm 0,012^{Bd}{}_{1}{}^{d}{}_{2}$
Inoculé F stressé	$-1,301 \pm 0,011^{Ac}{}_{1}{}^{d}{}_{2}$	$-1,269 \pm 0,003^{Bc}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$

A: Inoculé *A. brasilense*, B: inoculé *Bacillus.sp*, F: inoculé *Frankia CcI3*

(A et B) Indice de séparation des groupes homogènes par le Test de NEWMAN-KEULS au seuil α=5%. (a_1, b_1…) Indice de classement et regroupement des groupes non significativement différents par le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour la variable traitement. (a2, b2…) Indice de classement et de regroupement des groupes non significativement différents par le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour deux variables (traitement et génotypes).

Le test NEWMAN-KEULS au seuil 5% classe le facteur génotype en deux groupes homogènes (Tableau 06), le groupe A (GTA) et B (WAHA). De plus, le test NEWMAN-KEULS classe avec un intervalle de confiance à 95,00% en 4 groupes significativement différent pour la variable traitement. Enfin, le test NEWMAN-KEULS classe avec un intervalle de confiance à 95,00% en 7 groupes significativement différents pour la variable génotype*traitement.

2.3. La résistance stomatique

Une comparaison entre l'évolution de la résistance stomatique des plantes témoins et des plantes inoculées de blé dur étudiées a montré que la résistance stomatique change beaucoup sous l'effet du stress (Tableau 07).

La valeur la plus élevée est notée chez les témoins, avec un maximum de 1,05± 0,05 s/cm enregistrée chez les plantes témoins WAHA sans inoculation et sans stress. Chez les plantes inoculées la résistance stomatique la plus élevée est de 0,77 ± 0,02 s/cm enregistré chez les plantes WAHA inoculées avec *A.brasilense*.

Tableau 7 : Les moyennes des variables de la résistance stomatique et leurs groupes homogènes

	Résistance stomatique (s/cm)	
	GTA /DUR	**WAHA**
Témoin	$0,87\pm\ 0,02^{Ae}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$	$1,05 \pm 0,05^{Be}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$
Inoculé A	$0,72\ \pm\ 0,02^{Af}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$	$0,77 \pm\ 0,02^{Bf}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$
Inoculé B	$0,71\ \pm\ 0,02^{Af}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$	$0,65\ \pm 0,02^{Bf}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$
Inoculé F	$0,63\ \pm\ 0,03^{Af}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$	$0,67 \pm\ 0,02^{Bf}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$
Témoin stressé	$62,27 \pm 0,04^{Aa}{}_{1}{}^{b}{}_{2}$	$77,66 \pm 0,05^{Ba}{}_{1}{}^{a}{}_{2}$
Inoculé A stressé	$5,68 \pm\ 0,02^{Ab}{}_{1}{}^{d}{}_{2}$	$4,71 \pm 0,02^{Bb}{}_{1}{}^{e}{}_{2}$
Inoculé B stressé	$3,34 \pm\ 0,05^{Ac}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$	$6,55 \pm 0,03^{Bc}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$
Inoculé F stressé	$3,02 \pm\ 0,03^{Ad}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$	$3,17 \pm 0,02^{Bd}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$

A: Inoculé *A. brasilense*, B: inoculé *Bacillus.sp*, F: inoculé *Frankia CcI3*

(A et B) Indice de séparation des groupes homogènes par le Test de NEWMAN-KEULS au seuil α=5%.
(a_1, b_1…) Indice de classement et regroupement des groupes non significativement différents par le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour la variable traitement.
(a_2, b_2…) Indice de classement et de regroupement des groupes non signification différente par le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour deux variables (traitement et génotypes).

Dans le cas de stress12% de CC, on note une très grande augmentation de la résistance stomatique chez les plantes témoins, les valeurs sont comprises entre 62,27 ± 0,04 s/cm et 77,66 ± 0,05 s/cm enregistrées chez GTA et WAHA respectivement. Chez les plantes inoculées la valeur maximale est de 6,55 ± 0,03 s/cm enregistré chez WAHA inoculé par *Bacillus.sp*.

Les résultats dans la figure 11, présentent la résistance stomatique chez le blé dur (GTA/DUR, WAHA) témoins et les inoculées (*A.brasilense*, *Bacillus.sp*. *Frankia CcI3*). Ainsi que les plantes témoins stressées (12% de CC) et inoculées stressé (Figure 11).

Dans le cas de stress, nous remarquons que les valeurs ne changent pas beaucoup chez les plantes inoculées, on obtient pratiquement des valeurs qui sont proche aux celles obtenu chez les plantes témoins sans stress. Cependant, les valeurs de RS augmentent d'une manière considérable chez les plantes témoins stressées sans inoculation.

La comparaison des moyennes de la résistance stomatique (RS) et l'analyse de variance, montrent qu'il existe une différence très hautement significative entre les génotypes et les traitements et leur interaction (génotype × traitement) (Tableau 06-Annexe.06).

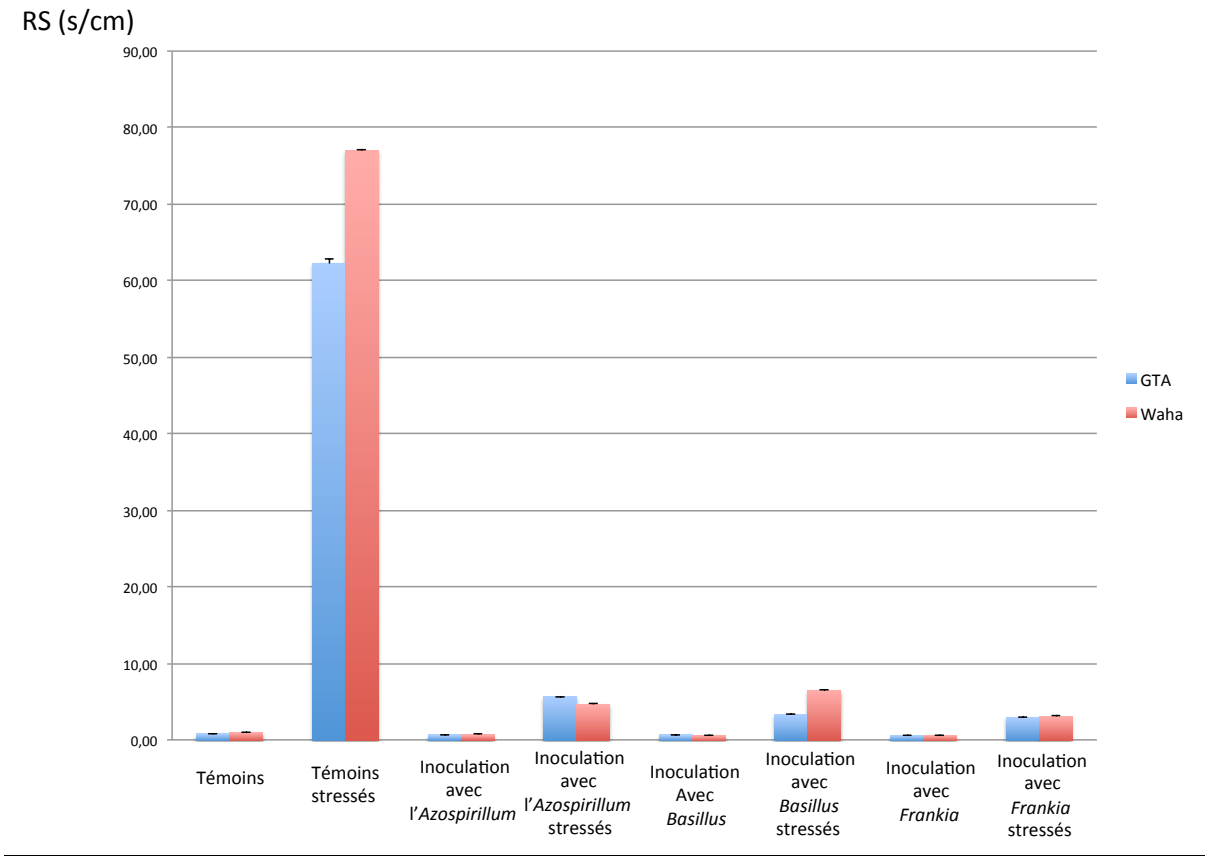


Figure 11 **:** *Variation de Résistance stomatique des plantes témoins et plantes inoculées (A.brasilense, Bacillus.sp et Frankia CcI3) de blé dur (GTA/DUR, WAHA) sous condition de stress hydrique.*

Le test NEWMAN-KEULS au seuil 5% classe le facteur génotype en deux groupes homogènes (Tableau 07) le groupe A (GTA) et B (WAHA). De plus, le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% classe en 6 groupes significativement différents pour la variable traitement. Enfin, le test NEWMAN-KEULS classe, avec un intervalle de confiance à 95,00%, en 7 groupes significativement différents pour la variable génotype*traitement.

Bousba *et al.,* en 2009 ont montré que le blé répond au stress hydrique par une augmentation dans la résistance stomatique qui est due a la fermeture prolongée des stomates ceci entraîne l'arrêt des processus photosynthétiques, ainsi un faible rendement. Les travaux de Kuruvadi (1989) sur le blé ont montré que celui-ci répond au stress hydrique par une réduction de la densité des stomates, la diminution de la densité des stomates ne se traduit pas toujours par une réduction des pertes en eau par la plante, à cause de sa compensation par l'augmentation de leur taille (Wang et Clarke, 1993).

2.4. Dosage de la proline

Une comparaison entre l'évolution de la proline des plantes témoins et des plantes inoculées de blé dur étudiées a montré que le taux de la proline change beaucoup sous l'effet du stress (Tableau 08).

La valeur de la proline la plus élevée notée chez les témoins, avec une valeur maximale de 35,60± 0,35 µg/100mg MF enregistrée chez les plantes WAHA sans inoculation et sans stress. Chez les plantes inoculées une valeur maximale de 34,65 ± 0,23 µg/100mg MF enregistrée chez les plantes GTA/DUR inoculées avec *Bacillus.sp*.

Dans le cas de stress 12% de CC, les taux de la proline augmente beaucoup chez les plantes sans inoculation on note des valeurs de164,30 ± 1,41 µg/100mg MF; 164,63 ± 3,30 µg/100mg MF respectivement chez GTA/DUR et WAHA. Cependant, les plantes inoculées on des valeurs proches aux témoins sans stress et sans inoculation.

Tableau 8 : Les moyennes des variables de la teneur en proline et leurs groupes homogènes

	Dosage de la proline (µg/100mg MF)	
	GTA /DUR	**WAHA**
Témoin	$33,30\pm\ 0,28^{Ad}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$	$35,60 \pm 0,35^{Bd}{}_{1}{}^{e}{}_{2}$
Inoculer A	$31,49\ \pm\ 0,13^{Ae}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$	$32,58 \pm\ 0,31^{Be}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$
Inoculer B	$34,65\ \pm 0,23^{Ad}{}_{1}{}^{e}{}_{2}$	$33,39\ \pm 0,09^{Bd}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$
Inoculer F	$33,69\ \pm\ 0,22^{Ae}{}_{1}{}^{e}{}_{2}$	$31,22 \pm\ 0,10^{Be}{}_{1}{}^{h}{}_{2}$
Témoin stresse	$164,30 \pm 1,41^{Aa}{}_{1}{}^{a}{}_{2}$	$164,63 \pm 3,30^{Ba}{}_{1}{}^{a}{}_{2}$
Inoculer A stresse	$34,72 \pm\ 0,10^{Ab}{}_{1}{}^{e}{}_{2}$	$42,72\pm 0,02^{Bb}{}_{1}{}^{b}{}_{2}$
Inoculer B stresse	$38,32 \pm\ 0,08^{Ab}{}_{1}{}^{d}{}_{2}$	$40,72 \pm 0,05^{Bb}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$
Inoculer F stresse	$35,66 \pm\ 0,06^{Ac}{}_{1}{}^{e}{}_{2}$	$37,66 \pm 0,08^{Bc}{}_{1}{}^{d}{}_{2}$

A: Inoculé *A. brasilense*, B: inoculé *Bacillus.sp*, F: inoculé *Frankia CcI3*

(A et B) Indice de séparation des groupes homogènes par le Test de NEWMAN-KEULS au seuil α=5%. (a_1, b_1…) Indice de classement et regroupement des groupes non significativement différents par le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour la variable traitement. (a2, b2…) Indice de classement et de regroupement des groupes non significativement différents par test le NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour deux variables (traitement et génotypes).

Les résultats dans la figure 12, présente le taux de la proline chez le blé dur (GTA/DUR, WAHA) témoins et les inoculées (*A.brasilense*, *Bacillus.sp*. *Frankia CcI3*). Ainsi, les plantes témoins stressées 12% de CC et inoculées stressé, nous remarquons que les plantes ont un taux de proline élevé avec des valeurs maximales obtenues chez les plantes stressées.

Dans le cas de stress, les valeurs de la proline ne changent pas beaucoup chez les plantes inoculées, on obtient pratiquement des valeurs qui sont proches a celles obtenus chez les plantes témoins sans stress.

La comparaison des moyennes de la proline et l'analyse de variance, montrent qu'il existe une différence très hautement significative entre les génotypes et les traitements et leur interaction (génotype × traitement) (Tableau 08-Annexe.06).

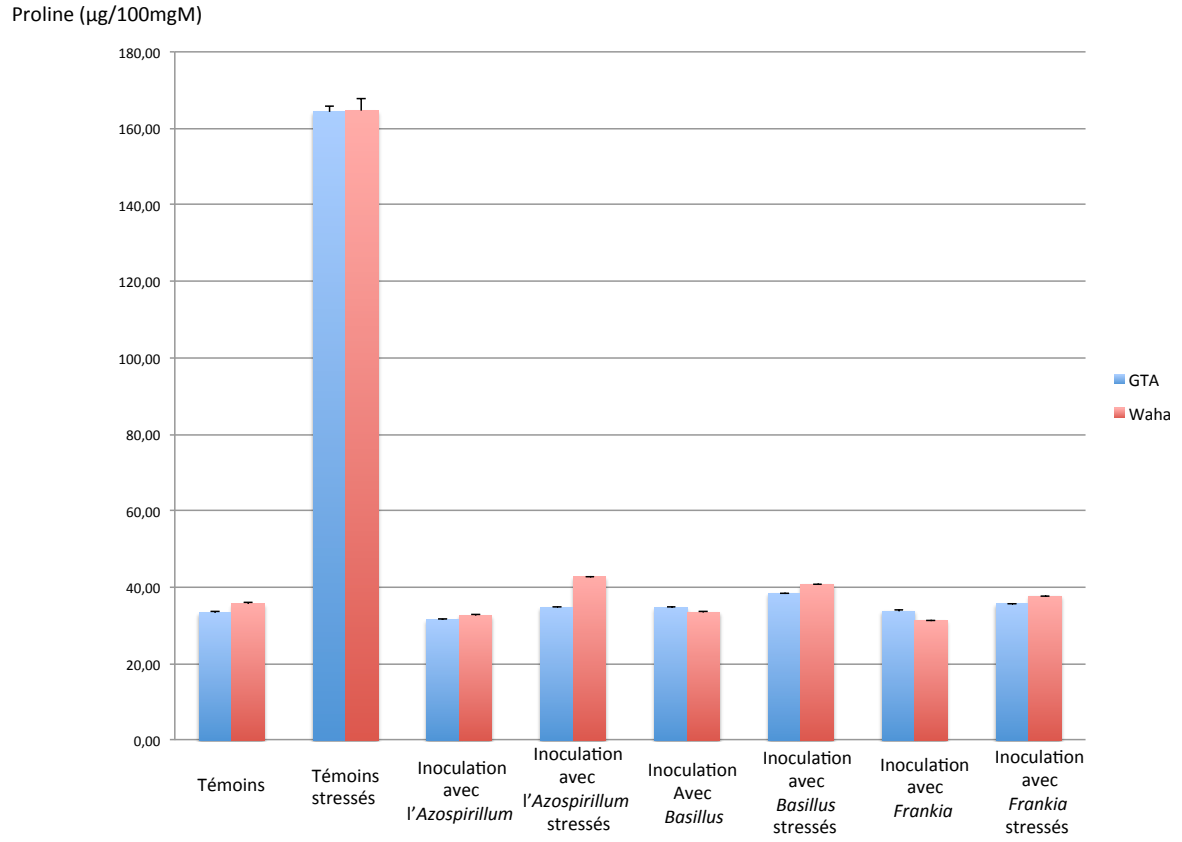


Figure 12 : Variation de la teneur en proline des plantes témoins et plantes inoculées (A.brasilense, Bacillus.sp et Frankia CcI3) de blé dur (GTA/DUR, WAHA) sous condition de stress hydrique.

Le test NEWMAN-KEULS au seuil 5% classe le facteur génotype en deux groupes homogènes (Tableau 08), le groupe A (GTA) et B (WAHA). De plus, le test NEWMAN-KEULS classe avec un intervalle de confiance à 95,00% en 5 groupes significativement différent pour la variable traitement. Enfin, le test NEWMAN-KEULS classe avec un intervalle de confiance à 95,00% en 7 groupes significativement différents pour la variable génotype*traitement.

Dans la littérature plusieurs travaux ont montrés que la proline est connue pour être présente largement chez les plantes et s'accumule normalement en grande quantité en réponse

aux stress environnementaux aussi bien suite à une augmentation de sa production que par une réduction de sa dégradation (Nakashima *et al* .,1998 in Roeder, 2006).

Plusieurs auteurs montrent que l'augmentation de la proline est reliée directement à l'application du stress hydrique (Cechin *et al*., 2006). L'accumulation de la proline a été démontrée chez de nombreuses espèces et dans différentes situations de stress (osmotiques, hydriques, thermiques) (Blum, 1996). Plus le niveau de stress appliqué augmente plus les teneurs en proline deviennent plus marquées (Savouré *et al.*, 1995).

Cette corrélation négative entre l'accumulation de la proline et l'humidité du sol est observée chez différentes espèces de blé dur (Nouri, 2002), chez la luzerne (Hireche, 2006). Il apparaît que la proline peut conférer la tolérance des plantes aux stress par le développement d'un système antioxydant qui peut jouer un rôle d'indicateur d'ajustement osmotique (Eliane *et al*., 2007).

2.5. La fluorescence chlorophyllienne

Une comparaison entre l'évolution de la fluorescence du blé dur témoin et du blé dur inoculé a montré que la fluorescence ne change pas beaucoup sous l`effet du stress (Tableau 09).

Tableau 9 : Les moyennes des variables de la Fluorescence chlorophyllienne et leurs groupes homogènes.

	Fluorescence	
	GTA /DUR	**WAHA**
Témoin	$0,885 \pm 0,002^{A\,c}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$	$0,875 \pm 0,004^{Bc}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$
Inoculé A	$0,881 \pm 0,001^{A\,c}{}_{1}{}^{d}{}_{2}$	$0,876 \pm 0,002^{Bc}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$
Inoculé B	$0,883 \pm 0,001^{Ac}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$	$0,887 \pm 0,001^{Bc}{}_{1}{}^{e}{}_{2}$
Inoculé F	$0,878 \pm 0,001^{Ad}{}_{1}{}^{e}{}_{2}$	$0,873 \pm 0,002^{Bd}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$
Témoin stressé	$0,895 \pm 0,001^{Aa}{}_{1}{}^{b}{}_{2}$	$0,906 \pm 0,003^{Ba}{}_{1}{}^{a}{}_{2}$
Inoculé A stressé	$0,885 \pm 0,001^{Ab}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$	$0,885 \pm 0,002^{Bb}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$
Inoculé B stressé	$0887, \pm 0,001^{Ab}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$	$0,882 \pm 0,004^{Bb}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$
Inoculé F stressé	$0,887 \pm 0,002^{Ab}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$	$0,886 \pm 0,001^{Bb}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$

A: Inoculé *A. brasilense*, B: inoculé *Bacillus.sp*, F: inoculé *Frankia CcI3*

(A et B) Indice de séparation des groupes homogènes par le Test de NEWMAN-KEULS au seuil α=5%.
(a_1, b_1…) Indice de classement et regroupement des groupes non significativement différents par le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour la variable traitement.
(a2, b2…) Indice de classement et de regroupement des groupes non significativement différents par le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour deux variables (traitement et génotypes).

La fluorescence la plus élevée est notée chez les témoins, avec une valeur maximale de 0,885± 0,002 enregistrée chez GTA/DUR sans inoculation et sans stress. Les valeurs de la fluorescence les plus élevées sont obtenues chez le blé dur inoculé avec une valeur maximale de 0,887 ± 0,001 enregistrée chez WAHA inoculé avec *Bacillus.sp*. Par contre, les valeurs de la fluorescence enregistrées sont légèrement plus élevées pour le paramètre du stress hydrique.

Dans le cas du stress 12% de CC, nous remarquons une augmentation faible de la fluorescence. Ainsi, chez les plantes témoins, les valeurs de la fluorescence sont de 0,895 ± 0,001 et 0,906 ± 0,003, enregistrées chez GTA et WAHA respectivement. En revanche, chez les plantes inoculées, les valeurs sont de 0,887 ± 0,001 et 0,887 ± 0,002, enregistrées chez GTA/DUR et inoculé par *Bacillus.sp et Frankia Cci3* respectivement.

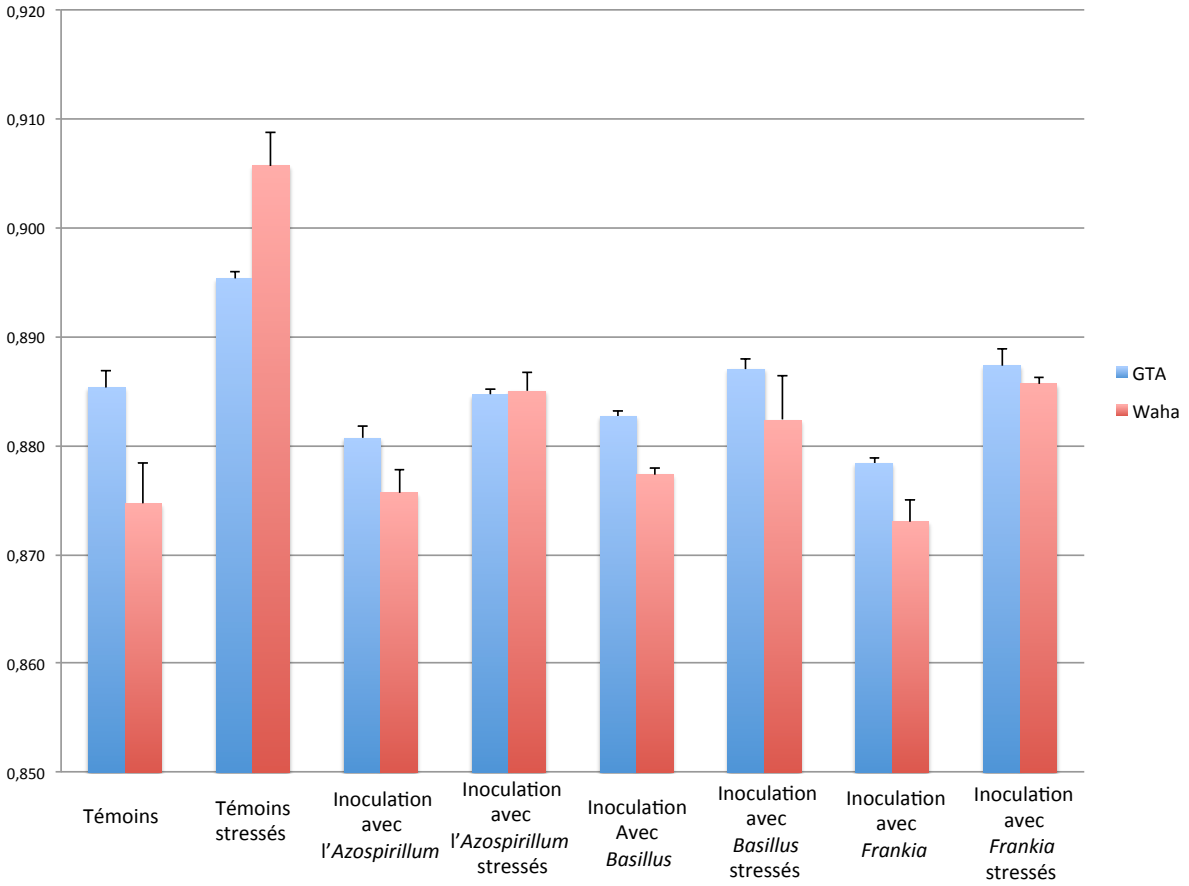


Figure 13 : Variation de la fluorescence chlorophyllienne des plantes témoins et plantes inoculées (A.brasilense, Bacillus.sp et Frankia CcI3) de blé dur (GTA/DUR, WAHA) sous condition de stress hydrique.

La figure 13 présente les résultats de la fluorescence chlorophyllienne chez le blé dur (GTA/DUR, WAHA) témoins et inoculés (*A.brasilense*, *Bacillus.sp*. *Frankia CcI3*). Ainsi que les plantes témoins stressées et inoculées stressées (12% de CC).

Dans le cas de stress, les valeurs de la fluorescence ne change pas beaucoup le blé inoculé, on obtient pratiquement des valeurs qui sont proche aux celles obtenu chez le blé témoin sans stress.

La comparaison des moyennes de la fluorescence et l'analyse de variance, montrent qu'il existe une différence très hautement significative entre les génotypes et les traitements et leur interaction (génotype × traitement) (Tableau 03-Annexe.06).

Le test NEWMAN-KEULS au seuil 5% classe le facteur génotype en deux groupes homogènes (Tableau 12). Le premier groupe A (GTA) et B (WAHA). De plus, le test NEWMAN-KEULS classe avec un intervalle de confiance à 95,00% en 4 groupes significativement différent pour la variable traitement. Enfin, le test NEWMAN-KEULS classe avec un intervalle de confiance à 95,00% en 6 groupes significativement différents pour la variable génotype*traitement.

2.6. La teneur en chlorophylle total (unité SPAD)

Une comparaison entre l'évolution de la chlorophylle des plantes témoins et des plantes inoculées de blé dur étudiées a montré que la chlorophylle ne change pas beaucoup sous l'effet du stress dans le cas des plantes inoculées (Tableau 10).

Tableau 10 : Les moyennes des variables de la teneur en chlorophylle total et leurs groupes homogènes

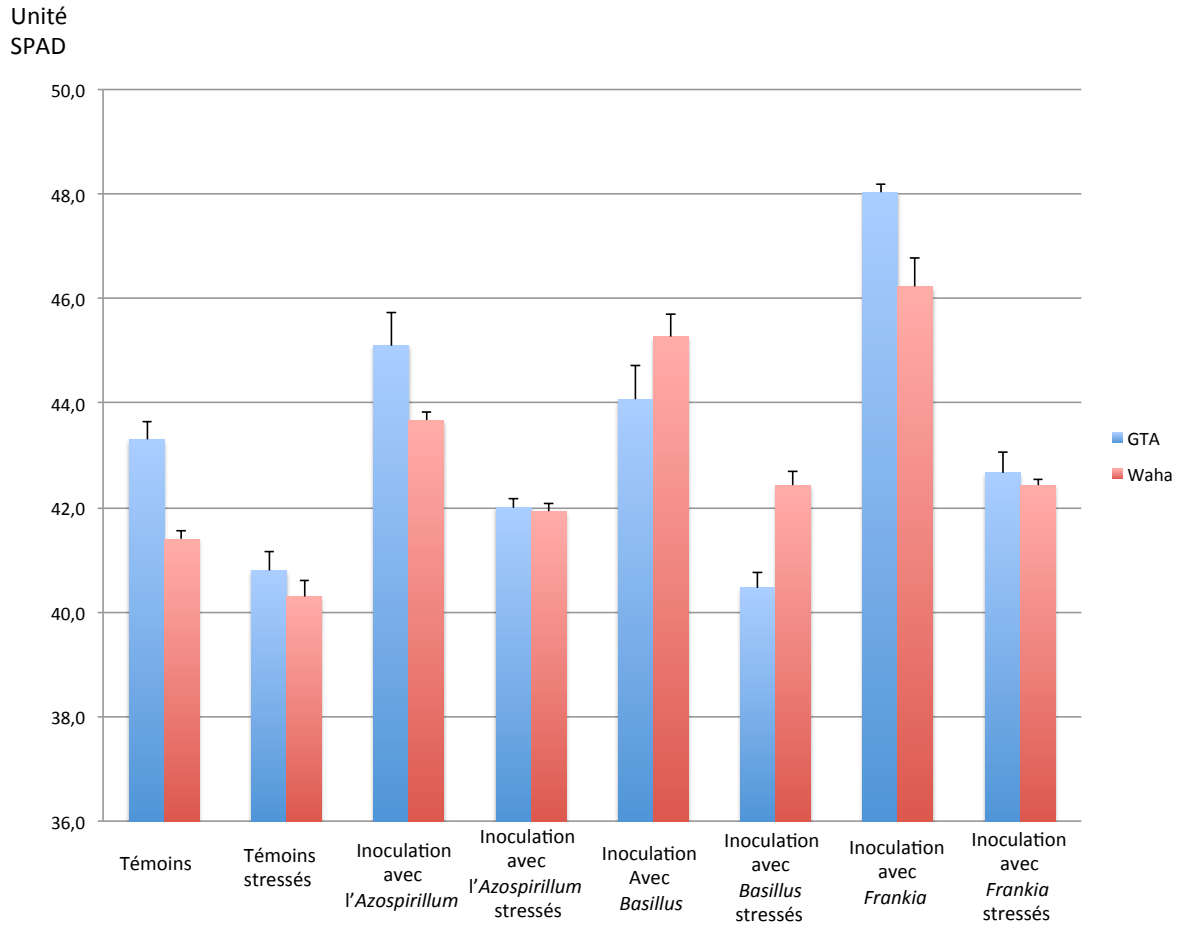
	Teneur en chlorophylle total (unité SPAD)	
	GTA /DUR	**WAHA**
Témoin	$43,3 \pm 0,4^{Ac}{}_{1}{}^{e}{}_{2}$	$41,4 \pm 0,2^{Bc}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$
Inoculé A	$45,1 \pm 0,6^{Ab}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$	$43,7 \pm 0,2^{Bb}{}_{1}{}^{e}{}_{2}$
Inoculé B	$44,1 \pm 0,6^{Ab}{}_{1}{}^{d}{}_{2}$	$45,3 \pm 0,5^{Bb}{}_{1}{}^{c}{}_{2}$
Inoculé F	$48,0 \pm 0,2^{Aa}{}_{1}{}^{a}{}_{2}$	$46,2 \pm 0,6^{Ba}{}_{1}{}^{b}{}_{2}$
Témoin stressé	$40,8 \pm 0,4^{Ae}{}_{1}{}^{i}{}_{2}$	$40,3 \pm 0,3^{Be}{}_{1}{}^{i}{}_{2}$
Inoculé A stressé	$42,0 \pm 0,2^{Ac}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$	$41,9 \pm 0,2^{Bc}{}_{1}{}^{g}{}_{2}$
Inoculé B stressé	$40,5 \pm 0,3^{Ad}{}_{1}{}^{i}{}_{2}$	$42,4 \pm 0,3^{Bd}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$
Inoculé F stressé	$42,7 \pm 0,4^{Ac}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$	$42,4 \pm 0,1^{Bc}{}_{1}{}^{f}{}_{2}$

A: Inoculé *A. brasilense*, B: inoculé *Bacillus.sp*, F: inoculé *Frankia CcI3*

(A et B) Indice de séparation des groupes homogènes par le Test de NEWMAN-KEULS au seuil α=5%. (a_1, b_1…) Indice de classement et regroupement des groupes non significativement différents par le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour la variable traitement. (a_2, b_2…) Indice de classement et de regroupement des groupes non significativement différent par le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour deux variables (traitement et génotypes).

Les valeurs de la chlorophylle les plus élevées sont notées chez les plantes inoculées avec une valeur maximale de 48,0 ± 0,2 SPAD, enregistrée chez GTA/DUR inoculée avec *Frankia CcI3* et sans stress.

Dans le cas d'un stress à 12% de CC, on remarque une diminution du taux de chlorophylle totale, celles-ci sont comprises entre 40,8 ± 0,4 SPAD et 40,3 ± 0,3 SPAD mesurées chez GTA et WAHA respectivement. En revanche, celles-ci atteignent une valeur maximale de 42,7 ± 0,4 SPAD chez GTA/DUR inoculé avec *Frankia Cci3*.



<u>Figure 14</u> : Variation de la chlorophylle totale des plantes témoins et plantes inoculées (A.brasilense, Bacillus.sp et Frankia CcI3) de blé dur (GTA/DUR, WAHA) sous condition de stress hydrique.

La figure 14 représente les résultats de la chlorophylle totale chez le blé dur (GTA/DUR, WAHA) témoin et les inoculés (*A.brasilense*, *Bacillus.sp*. *Frankia CcI3*), ainsi que les plantes témoins stressées 12% de CC et inoculées stresser. Nous remarquons que les plantes ont une chlorophylle élevée avec des valeurs maximales obtenues chez les plantes inoculées.

Dans le cas de stress, les valeurs obtenues ne changent pas énormément chez les plantes inoculées, on obtient pratiquement des valeurs qui sont proche a celles obtenues chez les plantes témoins sans stress. Cependant, les valeurs de chlorophylle diminuent d'une façon considérable chez les plantes témoins stressées.

La comparaison des moyennes de la teneur en chlorophylle totales et l'analyse de variance, montrent qu'il existe une différence très hautement significative entre les génotypes et les traitements et leur interaction (génotype × traitement) (Tableau 05-Annexe.06).

Le test NEWMAN-KEULS au seuil 5% classe le facteur génotype en deux groupes homogènes (Tableau 10). Le premier groupe A (GTA) et B (WAHA). De plus, le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% en 5 groupes significativement différent pour la variable traitement. Enfin, le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% en 8 groupes significativement différents pour la variable génotype*traitement.

2.7. Dosage des sucres solubles

Une comparaison entre l'évolution des sucres solubles des plantes témoins et des plantes inoculées du blé dur étudiées a montrée que le taux de sucres soluble augmente beaucoup sous l`effet du stress (Tableau 11).

Tableau 11 : Les moyennes des variables de la teneur en sucre soluble et leurs groupes homogènes

	Dosage des sucres solubles (µg/100mg MF)	
	GTA /DUR	**WAHA**
Témoin	$53.05\pm\ 0,16^{Ae\ i}_{1\ 2}$	$52,22 \pm 0,39^{Be\ i}_{1\ 2}$
Inoculé A	$53,37\ \pm\ 0,41^{Ae\ h}_{1\ 2}$	$51,77 \pm\ 0,57^{Be\ j}_{1\ 2}$
Inoculé B	$50,66\ \pm\ 0,52^{Af\ k}_{1\ 2}$	$51,19\ \pm 0,53^{Bf\ j}_{1\ 2}$
Inoculé F	$48,17\ \pm\ 0,28^{Ag\ m}_{1\ 2}$	$49,21 \pm\ 0,30^{Bg\ l}_{1\ 2}$
Témoin stressé	$155,09 \pm 0,50^{Aa\ a}_{1\ 2}$	$119,46 \pm 0,48^{Ba\ b}_{1\ 2}$
Inoculé A stressé	$60,81 \pm\ 0,08^{Ac\ f}_{1\ 2}$	$66,17\pm 0,40^{Bc\ c}_{1\ 2}$
Inoculé B stressé	$63,98 \pm\ 0,24^{Ab\ e}_{1\ 2}$	$64,92 \pm 0,07^{Bb\ d}_{1\ 2}$
Inoculé F stressé	$59,31 \pm\ 0,98^{Ad\ g}_{1\ 2}$	$53,31 \pm 1,07^{Bd\ h}_{1\ 2}$

A: Inoculé *A. brasilense*, B: inoculé *Bacillus.sp*, F: inoculé *Frankia CcI3*

(A et B) Indice de séparation des groupes homogènes par le Test de NEWMAN-KEULS au seuil α=5%.
(a_1, b_1…) Indice de classement et regroupement des groupes non significativement différents par le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour la variable traitement.
(a_2, b_2…) Indice de classement et de regroupement des groupes non significativement différents par test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% pour deux variables (traitement*génotypes).

La valeur la plus élevée notées chez les témoins, avec une valeur maximale de 53,05± 0,16 µg/100mg MF enregistrée chez GTA/DUR sans inoculation et sans stress. Chez le blé dur inoculé la valeur maximale est de 53,37 ± 0,41µg/100mg MF enregistrer chez GTA/DUR inoculé avec *A. brasilense*.

Dans le cas de stress 12% de CC, nous remarquons une augmentation considérable des sucres. Ainsi, chez les plantes témoins des valeurs comprises entre 155,09 ± 0,50 µg/100mgMF et 119,46 ± 0,48 µg/100mg MF enregistrées chez GTA et WAHA respectivement. De plus, chez les plantes inoculées les valeurs maximales sont 66,17 ± 0,40 µg/100mg MF et 64,92 ± 0,07 µg/100mg MF enregistrées chez WAHA inoculé par *A.brasilense* et *Bacillus.sp* respectivement.

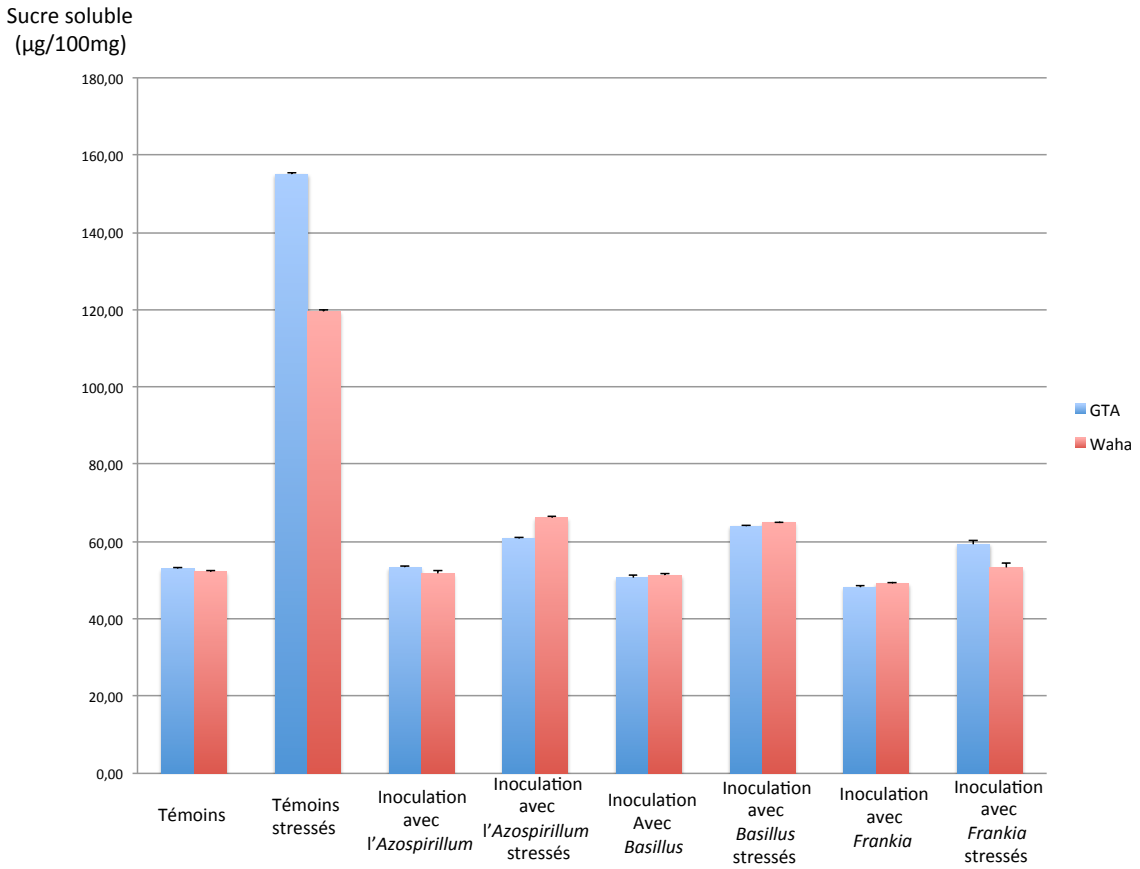


Figure 15 : Variation de la teneur en sucre soluble des plantes témoins et plantes inoculées (A.brasilense, Bacillus.sp et Frankia CcI3) de blé dur (GTA/DUR, WAHA) sous condition de stress hydrique.

La figure 15 présente la teneur en sucre soluble chez le blé dur (GTA/DUR, WAHA) témoins et les inoculées (*A.brasilense*, *Bacillus.sp*. *Frankia CcI3*). Ainsi que les plantes témoins stressé (12% de CC) et inoculées stressé. Dans le cas de stress, on note que les valeurs changent chez les plantes stressées.

Par contre, pour les plantes inoculées on obtient pratiquement des valeurs qui sont proches a celles obtenus chez les plantes témoins sans stress.

La comparaison des moyennes de la teneur en sucres solubles et l'analyse de variance, montrent qu'il existe une différence très hautement significative entre les génotypes et les traitements et leur interaction (génotype × traitement) (Tableau 07-Annexe.06).

Le test NEWMAN-KEULS au seuil 5% classe le facteur génotype en deux groupes homogènes (Tableau 11). Le premier groupe A (GTA) et B (WAHA). De plus, le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% en 7 groupes significativement différent pour la variable traitement. Enfin, le test NEWMAN-KEULS avec un intervalle de confiance à 95,00% en 13 groupes significativement différents pour la variable génotype*traitement.

L'accumulation des sucres solubles est un moyen adopté par les plantes en cas de stress, afin de résister aux contraintes du milieu (Loretti *et al*., 2001).

Les sucres solubles sont des indicateurs des degrés de stress, à cause de son importante augmentation lors de la sévérité, les sucres métaboliques (glucose, galactose, saccharose, et fructose) permettent la résistance aux différents stress (Zerrad *et al.*, 2006).

Les sucres solubles protègent les membranes contre la déshydratation, en condition de déficit hydrique, ils participent en grande partie à l'abaissement du potentiel osmotique chez le blé. Les plantes stressées ont réagi par l'augmentation des quantités de sucres solubles au niveau de leurs cellules (Hireche, 2006). Cette augmentation est en réalité une confirmation des résultats des chercheurs qui ont affirmé que le déficit hydrique a causé une accumulation importante des sucres solubles au niveau des feuilles (Zerrad *et al*.,2006).

2.8. Détermination de la longueur racinaire

D'après les résultats obtenus des différents paramètres étudies, nous avons montré que l'effet bénéfique des rhizobactéries dans la restauration de blé dur sous stress hydrique, et pour déterminer encore l'effet de ces PGPR sur la croissance racinaire les résultats suivants, d'une méthode indirecte, montrent significativement l'augmentation de la croissance racinaire chez le blé dur inoculée ceci peut avoir un lien directe sur la restauration du blé dur dans le cas de déficit hydrique. Les résultats de l'inoculation de blé dur (*Triticum durum* Desf.) (GTA/dur) avec les différentes souches PGPR sont présentés dans la figure 16.

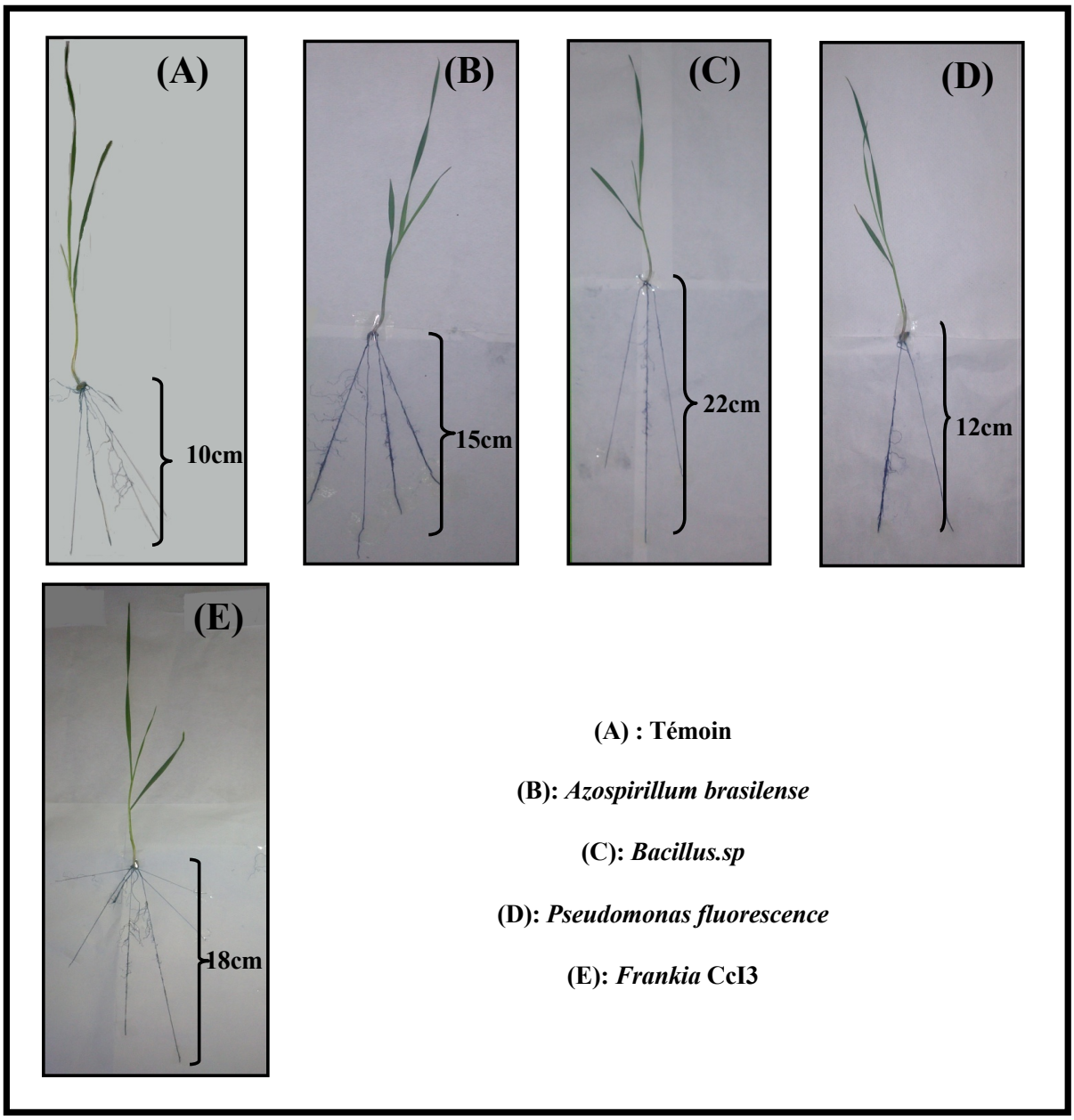


Figure 16 : La longueur racinaire chez le blé dur (Triticum durum Desf)

L'inoculation avec les différentes souches PGPR favorise la croissance des racines. Dans nos résultats nous remarquant que la plante non inoculée à un système racinaire réduit, contrairement aux plantes inoculées, ainsi une longueur racinaire importante et notée chez les plantes inoculées par *Bacillus sp.* et *Frankia* CcI3 de 22 cm et 18 cm respectivement. Pour la variété inoculée par *Azospirillum brasilense* et *Pseudomonas fluorescence* nous remarquons également une longueur moyenne des racines de 12 cm et 15 cm respectivement.

D'autres parts, nous constatons aussi que les racines de blé non inoculée sont fines par rapport aux racines de blé dur inoculé. De plus chez le blé dur inoculé par *Azospirillum brasilense, Bacillus sp.* et *Frankia* CcI3 une bonne croissance des racines secondaires est notée.

Tableau 12 : Les moyennes des variables de la longueur racinaire et leurs groupes homogènes.

Blé dur	Longueur racinaire (cm)
Témoin	12.00±0.00 ^{B}
B1	14.50±1.15 ^{B}
B2	23.50±2.30 ^{A}
B3	14.30±1.73 ^{B}
B4	15.50±2.30 ^{B}

B1: inoculé avec *A. brasilense*, B2 : inoculé avec *Bacillus sp*., B3 : inoculé *P. fluorescence*, B4 : inoculé avec *Frankia* CcI3. (A, B) indice de séparation des groupes homogènes par le test de NEWMAN-KEULS au seuil α=5%.

Après traitements statistiques les résultats sont les suivants :

- Le test NEWMAN-KEULS au seuil 5% classe le facteur de la longueur racinaire en deux groupes (Tableau 12). Le premier groupe A comprend le blé dur inoculé avec *Bacillus sp*. avec une moyenne maximale de 23.50 cm. Le deuxième groupe B comprend le témoin avec une moyenne de 12.00 cm, également le blé dur inoculé par *A. brasilense* avec une moyenne de 14.50 cm, blé dur inoculé par *P. fluorescence* avec une moyenne de 14.30 cm et de même pour le blé dur inoculé par *Frankia* CcI3 avec une moyenne de 15.50 cm.

- L'analyse de variance à un facteur montre des différences très hautement significatives (P=0,000) (Tableau1-Annexe 06). Ainsi, la comparaison des moyennes de la longueur racinaire des différentes plantes inoculées avec les différentes bactéries et pour le témoin est faite par le test de Dunnett et à un niveau de confiance de 95%, a décelée qu'il existe une différence très hautement significative (p=0,000) pour les plantes inoculées avec *Bacillus sp.* par contre les autres inocula ont montré une différence non significative par rapport à la plante témoin.

- La figure 17 représente les différentes longueur racinaire chez le blé dur (*Triticum durum Desf)* inoculé avec *Azospirillum brasilense, Bacillus sp., Pseudomonas fluorescence* et *Frankia CcI3* et par rapport une plante non inoculée. Ainsi, nous remarquons que les plantes inoculées ont donné une bonne longueur racinaire par rapport à la plante non inoculée. De ce faite, les plantes inoculées avec *Bacillus sp.* présente la meilleure longueur racinaire de 23 cm, les plantes inoculées avec *Pseudomonas fluorescence* ont une longueur 14 cm, de même pour les plantes inoculées avec *Azospirillum brasilense*. De plus, les plantes inoculées avec *Frankia CcI3* ont aussi une bonne élongation de 15 cm.

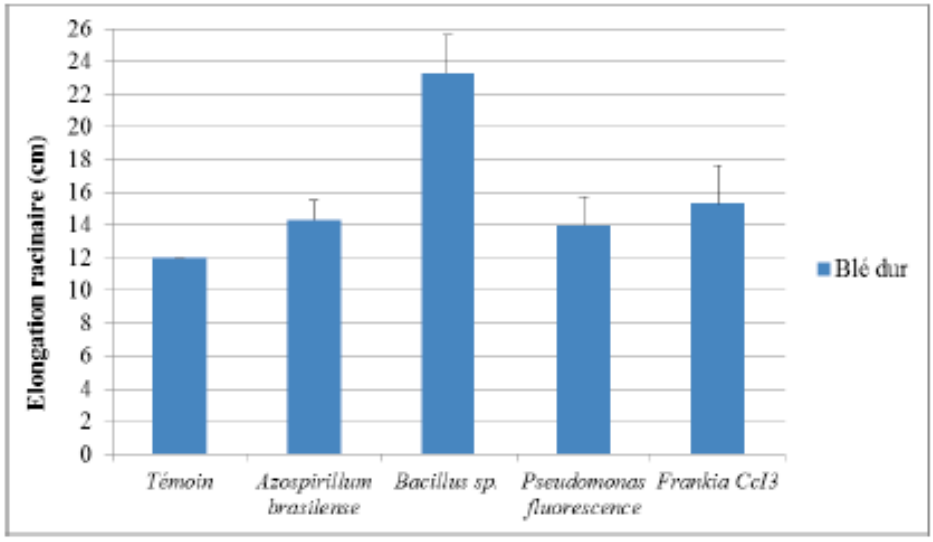


Figure 17 : Effet de l'ACC désaminase sur la longueur racinaire de blé dur (Triticum durum Desf.) (Dey *et al*., 2004 ; Belimov ,2002)

Comme il est reconnu de par des études préalables que l'ACC désaminase joue un rôle bien compris dans la régulation de l'éthylène et, par conséquent, la croissance et le développement des plantes sont modifiées, Ceci confirme les résultats obtenus

Le blé dur (*Triticum durum* Desf) inoculée avec les différentes rhizobactéries PGPR et l'actinomycète *Frankia* CcI3 ont exprimé un bon effet de l'activité ACC désaminase par rapport aux plantes non inoculées.

Dans la littératures plusieurs études ont montré l'importance d'*Azospirillum sp* dans l'augmentation de la longueur racinaire chez le blé dur (Ramdani *et al.,* 2002), dans l'élongation racinaire du blé inoculé par *Bacillus pumilus* (Maplestone et Campbell, 1989) et dans la capacité de promouvoir le développement de la croissance en diminuant l'absorption des agents toxiques et augmentant ainsi le taux d'auxines, ceci chez les plantes inoculées par *Pseudomonas* (Egamberdieva et Kucharova, 2009).

2.9. Variation des protéines totales foliaires

L'analyse des protéines totales foliaires des deux génotypes du blé dur par la technique d'électrophorèse SDS-PAGE a montrée une différence dans le nombre des bandes révélées, en termes de présence et d'absence de bandes et aussi en fonction de leurs poids moléculaire (Figure 18 et 19).

Les profils électrophorétiques des protéines totales des feuilles de blé dur étudiées, révèlent des variations entre les génotypes témoins et stressés et les inoculées (Figure 18 et19), ils présentent des bandes de bonne résolution. Ainsi, le nombre total des bandes polypeptidiques est de 55 bandes pour le génotype GTA et 31 pour WAHA et leurs poids moléculaire varient de 13.359 à 122,833 KDa (Annexe 6, Tableaux 1et 2).

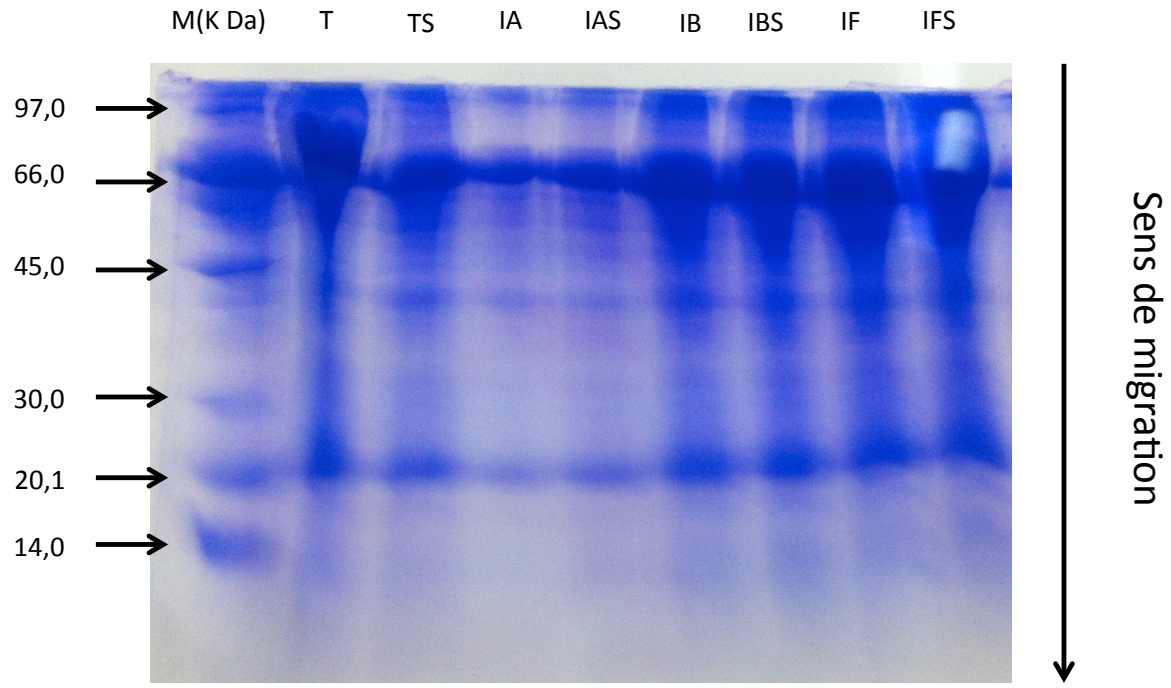


Figure 18 : Profil électrophorétiques SDS-PAGE des protéines totales des feuilles de blé dur (GTA) sous condition de stress hydrique

T: témoin, TS: témoin stressé, IA: Inoculé A.brasilense, IAS: Inoculé A.brasilense stressé, IB: inoculé Bacillus.sp, IBS: inoculé Bacillus.sp stressé, IF: inoculé, Frankia CcI3, IFS: inoculé Frankia CcI3 stressé

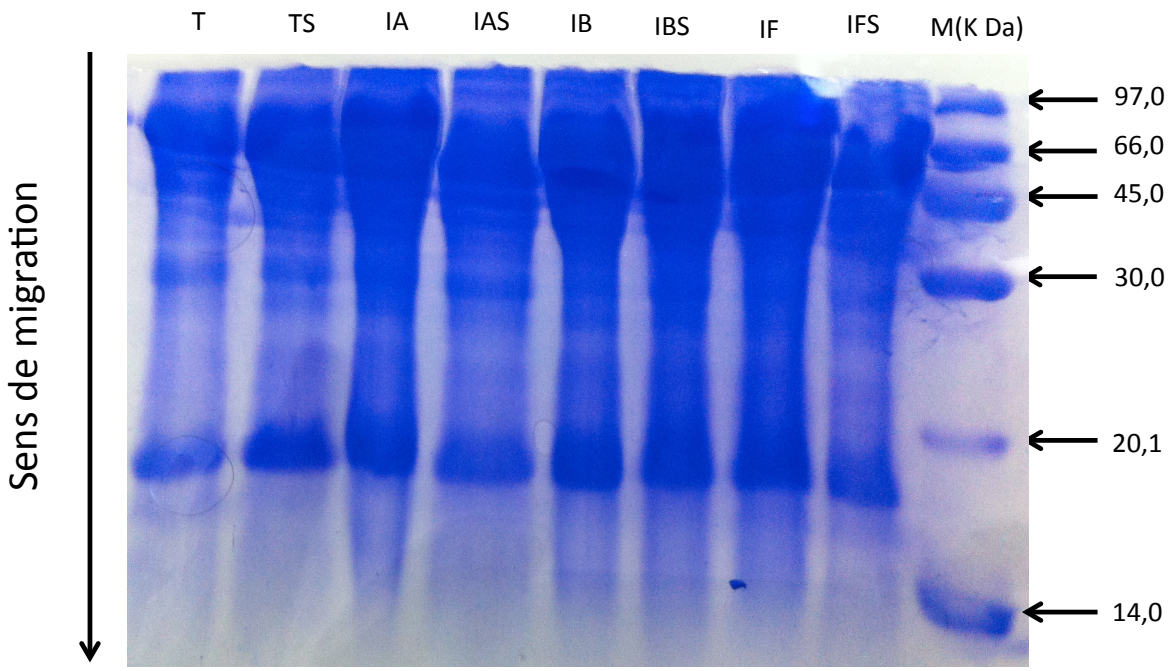


Figure 19 : Profil électrophorétiques SDS-PAGE des protéines totales des feuilles de blé dur (WAHA) sous condition de stress hydrique

T: témoin, TS: témoin stressé, IA: Inoculé A.brasilense, IAS: Inoculé A.brasilense stressé, IB: inoculé Bacillus.sp, IBS: inoculé Bacillus.sp stressé, IF: inoculé Frankia CcI3, IFS: inoculé Frankia CcI3 stressé

L'évaluation des nombre des bandes par SDS-PAGE indique qu'après l'effet du stress hydrique provoqué sur les plantes inoculées de nouvelles bandes protéiques sont apparues et d'autre disparaissent, cependant chez le blé dur stressé il y'a plus de bandes qui disparaissent. Ceci est confirmé par d'autres études effectuées par Farshadfar et *al*., (2008) et Jasso *et al.,* (2002).

Yordanova *et al.,* (2004) indiquent que les changements dans le profil protéique l'inhibition de certaines protéines, la surexpression de certaines et l'apparition de nouvelles protéines qui interviennent suite au stress environnementaux, ces protéines ont une grande importance dans l'adaptation des plantes face au stress. Ainsi, le changement d'expression de ses protéines est l'un des résultats qui est du à la modification du métabolisme des plantes lors d'un stress sévère (Jangpromma, 2007).

En effet, la synthèse des protéines lors d'un stress est due à une activation d'un ensemble de gènes permettant la synthèse des protéines spécifiques associée aux stress, telles que les LEA notamment les déhydrines qui ont pour rôle la protection de l'ensemble vital des protéines cellulaires (David et Grongnet, 2001).

Ainsi, ces protéines s'accumulent en cas de stress dans de nombreuses plantes, surtout pour le cas des cultures annuelles comme les céréales (Longxing *et al.,* 2010).

2.10. Variation des protéines totales racinaires

L'analyse des protéines totales racinaires des deux génotypes de blé dur par la technique d'électrophorèse SDS-PAGE a montré une différence dans le nombre des bandes révélées, en termes de présence et d'absence de bandes et également en fonction de leurs poids moléculaire (Figures 20 et 21).

Les profils électrophorétiques des protéines totales des racines de blé dur étudié, révèlent des variations entre les génotypes témoins et stressés et les inoculés (Figures 20 et 21), ils présentent des bandes de bonne résolution. Le nombre total des bandes polypeptidiques est de 56 bandes pour GTA/DUR et 69 pour WAHA, et leurs poids moléculaire varient de 7.935 à 131.647 KDa (Annexe 6 Tableaux 3 et 4).

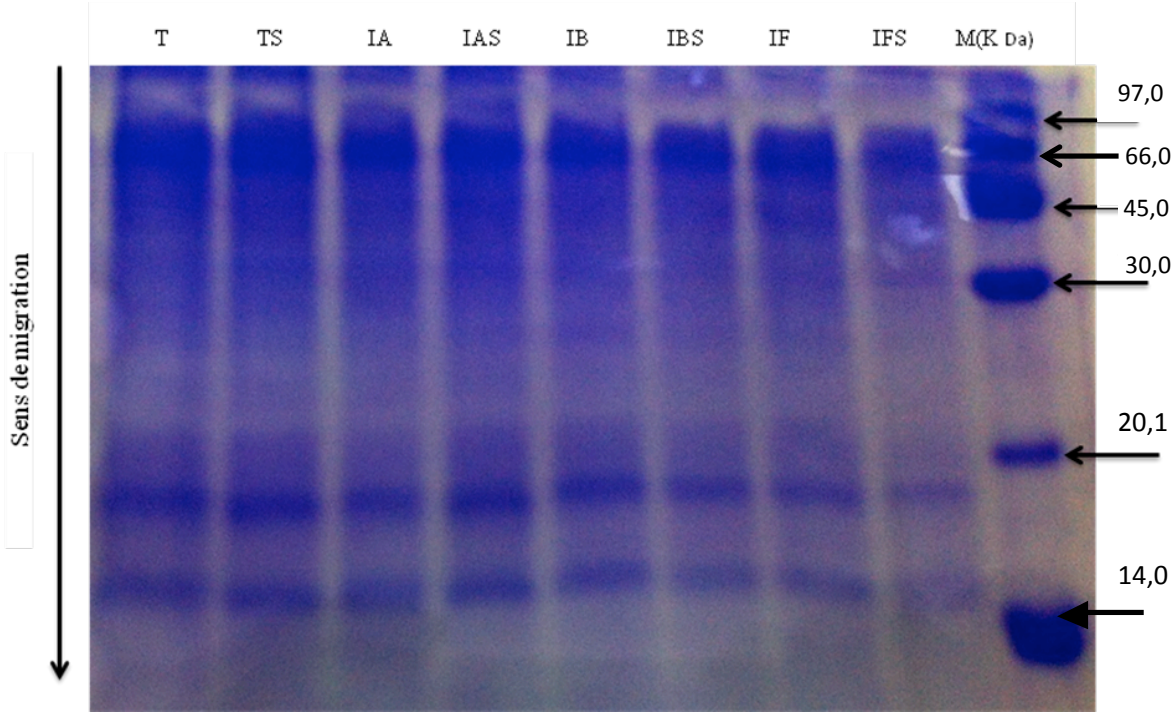


Figure 20 : Profil électrophorétiques SDS-PAGE des protéines totales des racines de blé dur (GTA) sous condition de stress hydrique

T: témoin, TS: témoin stressé, IA: Inoculée A.brasilense, IAS: Inoculée A.brasilense stressé, IB: inoculée Bacillus.sp, IBS: inoculée Bacillus.sp stressé, IF: inoculée Frankia CcI3, IFS: inoculée Frankia CcI3 stressé

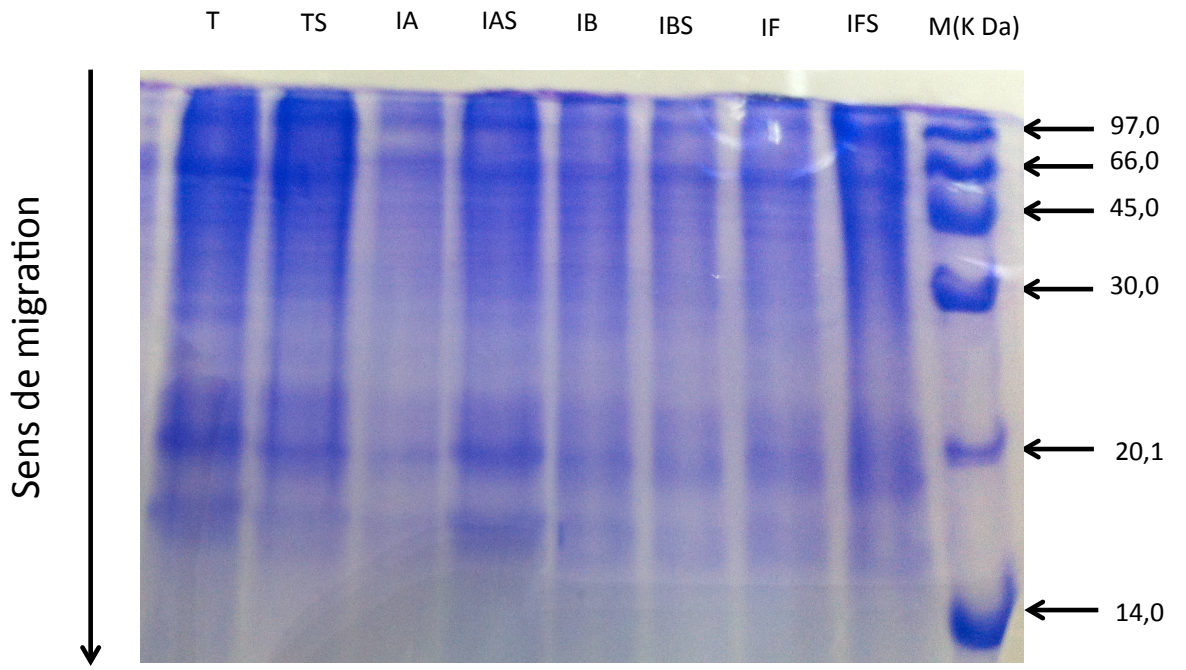


Figure 21 : Profil électrophorétiques SDS-PAGE des protéines totales des racines de blé dur (WAHA) sous condition de stress hydrique

T: témoin, TS: témoin stressé, IA: Inoculée A.brasilense, IAS: Inoculée A.brasilense stressé, IB: inoculée Bacillus.sp, IBS: inoculée Bacillus.sp stressé, IF: inoculée Frankia CcI3, IFS: inoculée Frankia CcI3 stressé

L'évaluation du nombre des bandes par SDS-PAGE révélé à partir des racines, indique qu'après inoculation et sous l'effet de stress hydrique plusieurs bandes protéiques sont apparues chez les deux variétés de blé dur. Cependant, plusieurs bandes sont absentes chez le blé stressé contrairement aux plantes non stressées, ceci est confirmé par d'autres études effectuées par Farshadfar *et al*., (2008) et Jasso *et al.,* (2000).

3. Conclusion

L'étude de la tolérance et de l'amélioration de la croissance du blé dur sous serre en présence de PGPR face au déficit hydrique à montrer la capacité remarquable que présente ces PGPR à restaurer la croissance du blé dur sous stress sévère (12% de CC), ceci pourrait apporter une solution au problème de déficit hydrique qui heurte la culture du blé dur et les céréales en générale en Algérie.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes sont considérées comme une alternative à l'utilisation de produits chimiques dans l'agriculture (Kloepper 1993). *Azospirillum*, est l'une des bactéries les plus étudiés qui s'associent avec les plantes (Bashan et Holguin, 1997).Un facteur important à considérer lors du dépistage de nouvelles souches est leur activité dans la gamme d'environnements dans lesquels ils sont susceptibles d'être utilisés, en particulier différents types de sol (Ross et *al*. 2000). Pour cette raison, il est important d'étudier les souches locales isolées dans la même région où ils peuvent être utilisés comme inoculant pour les céréales. Par conséquent, nous avons décidé de rechercher des souches locales (*Azospirillum* ou autres PGPR) sont déjà adaptées à l'environnement de la région EST d'Algérie. Ainsi, nous avons isolé les bactéries de la rhizosphère de blé à l'aide de milieu semi-solide NFB. Le milieu NFB a souvent été utilisé pour isoler les souches du genre *Azospirillum* a partir de céréales et plantes fourragères. Dans ce milieu, *Azospirillum* forme un voile comme pellicule (Dobereiner 1995).

Les résultats obtenus dans cette thèse concernant la population de rhizobactéries isolées du sol identiques que le genre *Azospirillum* est le plus dominant. Ainsi, de nombreuses souches de ce genre sont capables de se développer dans un environnement salin avec des concentrations élevées de NaCl. Ces PGPR peuvent également synthétiser l'AIA, l'ammoniac et solubiliser le phosphate.

De plus, l'étude moléculaire nous a permis d'obtenir un arbre phylogénétique après alignement des séquences du gène d'ADNr 16S, ainsi un cluster de l'espèce *A. brasilense* est formé des 6 souches isolées.

Dans les plantes traitées avec 2,4D, une variation dans le nombre de para-nodules par plante a été trouvée, ces résultats sont similaire à ceux rapportées par Zeman *et al* .,(1992).Ce phénomène de formation de para-nodules a été décrit dans la littérature (Christiansen-Weniger, 1992; Sriskandarajah *et al*., 1993; Katupitiya *et al.*, 1995; Fischer *et al.*, 2000). Ces derniers ont été trouvés que dans un milieu contenant de faible concentration de 2.4D après l'inoculation du blé avec A.brasilense Sp7 et une A.brasilense mutant Sp7.S qui est privé de la synthèse de polysaccharides, ils ont observé que A.brasilense Sp7colonisé toutes la surface des racines, tandis que le traitement avec les souches mutantes montre une accumulation de bactérie seulement sur les parties latérales des racines (Alexander *et al*., 1999).

L'inoculation avec *Azospirillum brasilense* et l'actinomycète *Frankia* CcI3 avec ou sans traitement du 2,4-D, a permis la formation des paranodules racinaires indispensables à la

fixation d'azote. Toutefois, d'autres études sur ces interactions vont promouvoir l'application pratique de paranodules pour l'amélioration de la nutrition azotée des céréales. De plus, l'intensification des études sur les interactions plantes microorganismes à l'aide de bactéries marquées est nécessaire pour localiser celles-ci à l'intérieur des paranodules.

Les résultats positifs de ce travail, en particulier ceux de l'interaction entre *Frankia* et le blé, ouvrent les portes sur plusieurs perspectives, telles que la combinaison entre *Frankia*, qui a exprimé un grand potentiel sur l'élongation racinaire, et une rhizobactéries promotrice de croissance, et l'exploitation des terres à aspect sableux avec inoculation aux PGPR comme agents biofertilisants.

Par ailleurs, l'allongement important de la racine de blé uniquement inoculé avec *Frankia* est peut être due à l'oxygénation des racines dans des flacons, ceci en comparaison avec certains genres actinorhizien où la longueur des racines et des nodules est inversement corrélée avec la tension externe à l'oxygène (Pawlowski and Demchenko, 2012).

De plus, la formation de para-nodule grâce à un traitement au 2,4-D est un processus physiologique indépendant de l'action bactérienne (Francisco et Akao, 1993). Il est fortement possible que les para-nodules obtenus dans notre étude sans le 2,4-D ont été induits par l'effet *Frankia*, en comparant avec les travaux de Saatovich (2006) qui a obtenu des para-nodules sans ajouter des phytohormones sur les racines de blé inoculés avec *Azospirillum* en utilisant deux souches A1-3 et A13- 6.

Un autre point a été abordé dans ce travail, c'est l'étude de la tolérance et de l'augmentation du rendement de blé dur, sous serre, avec les rhizobactéries et l'actinomycète *Frankia* CcI3 face au stress, nous avons montré l'importance de l'inoculation dans la restauration du blé dur. Ceci pourrait apporter une solution au problème de stress hydrique qui heurte la culture du blé en Algérie.

Les espèces *A. brasilense* stimulent la croissance du blé à partir du stade de germination jusqu'au stade final. *A. brasilense* accélère la croissance du blé, son effet serait dû à deux mécanismes : la présence de la ß-glucuronidase chez cette bactérie qui assure le chimiotactisme des cellules bactériennes vers les racines du blé (Kapulnik *et al.*, 1985 ; Kapulnik *et al.*, 1987 ; Broek *et al.*, 1998) et la colonisation endophytique des racines du blé (Bashan, 1986). La colonisation des cellules des racines de blé a été mise en évidence par Assmus *et al.* (1995) par la technique de l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) et l'observation au microscope confocal laser scanner (CSLM). *Azospirillum* améliore le rendement des céréales (Bashan and Levanony, 1989). L'effet des *Azospirillum* serait lié à la production des phytohormones qui sont indispensables pour la croissance des plantes.

En outre, *Azospirillum* stimule l'apport des minéraux et augmente la vitesse d'assimilation de l'azote du stade de germination jusqu'à l'apparition de l'épi (Ferreira *et al.*, 1987 ; Rodrigues *et al.*, 2000). En revanche, La teneur en protéines et en azote de la plante dépend de l'activité nitrogénasique des bactéries fixatrices d'azote et le type d'engrais contenu dans le sol (Webster, 1959).

Lorsque le blé est soumis à un stress salin ou hydrique, la feuille répond en premier lieu par changement dans le volume et le nombre des stomates afin de maintenir suffisamment d'eau pour rétablir l'activité photosynthétique. La feuille doit donc garder intacte sa surface pour assurer le bon déroulement de la croissance de la plante (Gallé *et al.*, 2002).

Les plantules croissent grâce à un ensemble de composants tels que l'auxine, la gibbérelline ou la kénitine qui assurent leur morphologie et leur croissance. Le stress affecte l'activité de ces phytohormones. Par conséquent, la taille et le poids sec de la tige et des racines seront affectés et réduits (Ayaz *et al.*, 2000 ; Cicek and Cakirlar, 2002). En effet, l'effet des PGPR (*A. brasilense)* sur la restauration de la croissance végétale du blé en présence de stress ce résume à la réduction de l'effet du stress sur les plantes d'une part, et fournissent une source d'azote à la plante. D'autre part, La proline et la glycine bétaine améliorent la croissance des céréales en présence de différents stress abiotiques (Ashraf and Foolad, 2007).

La tolérance de *A. brasilense* lui permet de garder intactes l'ensemble de ses fonctions, comme la stimulation de la croissance de la plante par la synthèse des phytohormones et l'apport d'azote nécessaire à la plante. Les résultats obtenus avec l'effet de la souche *A. brasilense* sur le blé s'accordent avec ceux de Albrecht *et al.,* (1981), Bashan (1986) et Baldani et Döbereneir, (1990). Ceux-ci rapportent que l'inoculation des céréales par *Azospirillum* augmente le poids sec total de la plante, la quantité d'azote dans la souche et la graine et le nombre de thalles et leur fertilité, le nombre de graines par épi, le poids de la graine et la surface de la feuille, avec une grande vitesse de germination. *Azospirillum* affecte aussi le développement des racines du blé et de l'orge. Ces bactéries influent directement sur la longueur des racines, le nombre de racines secondaires et augmentent la zone d'élongation ainsi que le volume des racines et leur poids sec (Bashan et Levanony, 1990). D'autre part, les Rhizobactéries produisent des exo-polysaccharides (EPS) en présence du stress (*Azospirillum brasilense*) (Fischer *et al.*, 1999).

Sarig *et al.,* (1988) ont révélé qu'en plus de l'apport des minéraux, l'inoculation par *Azospirillum* de certaines céréales améliore la teneur en eau du sol dans le cas d'un déficit hydrique.

Par ailleurs, une relation étroite est notée entre la teneur en eau dans les tissus et l'accumulation de la proline, l'exposition des plantes contenant des teneurs élevées en eau à un stress provoque l'activation du répresseur et l'inhibition de la proline dans les fleurs et les graines (Verbruggen *et al.*, 1996).

Les résultats obtenus sur les teneurs en chlorophylle et en proline s'accordent avec ceux de certains auteurs (Bengston *et al.*, 1978 ; Reddy et Veeranjaneyulu, 1991) qui ont signalé l'existence d'une connexion vraisemblable entre les voies de synthèse des pigments chlorophylliens et celles de la proline. Une compétition entre ces deux composés pour leur précurseur commun, le glutamate, peut être à l'origine de ce phénomène. Le stress hydrique provoque l'augmentation de la proline foliaire ; parallèlement, une baisse dans les teneurs en pigments chlorophylliens totaux (chlorophylles a et b) est enregistrée. La variété accumulant plus de proline est aussi celle qui connaît la plus forte diminution de ses teneurs en pigments chlorophylliens (Tahri *et al.*, 1997).

La production des sucres solubles est proportionnelle au stress hydrique subi par la plante, elle suit celle de la proline. L'effet de stress sur l'espèce (*T. aestivum* L.) provoque la production de divers sucres (Kerepesi and Galiba, 2000).

L'adaptation des plantes au stress est associée à un ajustement métabolique qui mène à l'accumulation des solutés organiques tels que les sucres, les polyols, les bétaïnes et la proline. Les sucres solubles jouent un rôle important dans la régulation des cellules durant la germination face au déficit hydrique (Gill *et al.*, 2002). La diminution de la teneur en sucres en présence des PGPR (*A. brasilense, P. Fluorescence et Frankia)* pourrait être expliquée par l'élimination de l'effet du stress.

Actuellement, la préservation de l'environnement est devenue un enjeu majeur vu les altérations qui ont atteint les différents systèmes écologiques. En effet, la recherche tend vers le développement de technologies nouvelles dont les effets conséquents sur l'environnement sont quasi néants.

En effet, les PGPR viennent se substituer aux fertilisants chimiques en intervenant par des mécanismes directes et indirectes pour améliorer le rendement des cultures, l'absorption des éléments essentiel pour le bon développement des plantes et ils permettent de fixer l'azote atmosphérique ou de le solubiliser les éléments nutritifs du sol.

Cependant, pour diminuer l'utilisation des produits agrochimiques, une solution biologique contenant des microorganismes, comme les bactéries ou les champignons, sont caractérisés de bioengrais. Ces microorganismes peuvent être inoculés seuls ou mélangés à des

substrats. Cette alternative plus écologiquement durable permet d'accroître la fertilité des sols dans le cadre d'une production agricole durable.

Suite aux résultats obtenus dans les quatre chapitres expérimentaux, ceci nous a conduits vers plusieurs perspectives dont la production des biofertilisants. Dans le chapitre suivant, on a choisi deux substrats comme support de conservation dans le but de valorisée ce travail de thèse afin d'aboutir à la production des biofertilisants.

Ainsi, une étude portée sur la production des biofertilisants par les PGPR est testée et cela par l'utilisation de deux substrats différents (Talc et le marc de café). Les premiers résultats obtenus à partir de cette étude semblent bénéfique et ouvre les portes vers d'autres perspectives dans le futur.

Par ailleurs, il serait intéressant de poursuivre les recherches dans ce sens afin de tester ces produits à base d'une formulation bactérie/substrat sur des plantes pour ensuite effectuer ce travail sur terrain voir même sur champs.

Beaucoup de recherches se montrent prometteuses à ce sujet, des produits déjà commercialisés ont été utilisés dans de grandes cultures (Mais, Riz, et l`orge) dans plusieurs pays du monde (Brésil, Canada, Japon..). Les résultats obtenus sont très avantageux voir même intéressants du point de vue augmentation du rendement.

De même, il serait intéressant de produire des biofertilisants à base de bactéries localement isolées et d'utiliser des substrats non couteux pour arriver à les commercialiser dans notre pays et cela en mettant en évidence leurs avantages impliquées dans l`augmentation et du rendement des céréales, tout en préservant l`environnement des engrais polluants et assurer ainsi une agriculture durable et un environnement sain pour la génération future.

Chapitre 5 : Valorisation de travail de thèse ; essai de production des biofertilisants : support de conservation

Ce dernier chapitre a été effectué suite aux différents résultats obtenus jusque là et représente la valorisation des travaux effectués dans les chapitres précédents. En effet, la mise en évidence des apports bénéfiques des différentes souches testées a permis d'envisager la possibilité de produire des biofertilisant en testant différents supports de conservation.

Ainsi, cette partie s'attachera à présenter l'utilisation de ces deux supports de conservation pour les inoculer par des PGPR (Azospirillum brasilense, Bacillus sp et Pseudomonas fluorescence). Un test de viabilité de ces souches est effectué ensuite dans le but de déterminer l'efficacité de ses deux supports.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biochimie Génétique et Biotechnologie Végétales (BGGV) dans l'équipe de Biotechnologie et Amélioration des Plantes à l'université Constantine 1.

Dans cette étude, l'ensemble des expériences d'inoculation sur les deux supports ainsi que les tests de culture sur milieu ont été effectuées par la stagiaire LEMOUDDA Rym, et supervisées par moi même, sous la direction du Pr Djekoun Abdelhamid.

1. Problématique

Durant ces deux dernières décennies, beaucoup de travaux ont été consacrés à identifier les rhizobactéries les plus efficaces quant à l'amélioration des cultures. Les données accumulées montrent que l'inoculation de celles-ci à des plantes présente des résultats significatifs en induisant une amélioration de la culture de l`ordre 60 à 70 % des cas avec d`importantes augmentations du rendement allant de 5 à 30% (Okon et Labandera-Gonzalez, 1994).

Ces résultats sur les propriétés des bioengrais, ouvrent la voie à des nouvelles perspectives offrant ainsi une alternative à l'utilisation des engrais chimiques. Cette alternative plus écologiquement durable permet d'accroitre la fertilité des sols dans le cadre d'une production agricole durable et respectueuse des agroécosystèmes.

Actuellement, l'inoculation du sol est réalisée par épandage de tourbe préalablement mélangée à une culture microbienne. Toutefois, l`encapsulation des cellules dans les hydrogels s'est avérée être une technique plus prometteuse (Cassidy *et al*., 1996). En effet, l'encapsulation des cellules protège les microorganismes des agressions de l'environnement et de la flore concurrente déjà présente dans le sol et permet une diffusion progressive des micro-organismes dans le sol (Fage, 1992 ; Bashan, 1998). De plus, la production des biofertilisants est devenu très répondus dans le domaine industriel depuis quelques années ceci est due essentiellement à l'importance consacrée pour augmenter les rendements agricoles tout en respectant l'environnement.

C'est dans cette optique que nous avons valorisé les travaux présentés dans les chapitres précédents et qui montrent les effets bénéfiques des rhizobactéries et leurs rôles dans la croissance et l`amélioration du blé dur ceci nous a poussé à utiliser ces rhizobactéries comme biofertilisants.

A cet effet, nous avons effectué des tests sur deux substrats : Talc (naturel) et le marc de café comme support de conservation de ces rhizobactéries dans le but d`une utilisation éventuelle comme milieu de conservation naturel. Ces tests consistent à inoculer les deux

substrats par ces rhizobactéries ainsi qu'un test de croissance sur le milieu de culture spécifique pour ces souches.

2. Matériels et méthodes

2.1. Utilisation de différents substrats

Les substrats testés afin de conserver les différentes souches sont le marc de café et le silicate de magnésium (Talc), choisis pour leur facilité d'utilisation, leur disponibilité ainsi que pour leur coût réduit. Ces deux substrats sont, stérilisés à l'aide d'un autoclave à une température de 121°C pendant 20 minutes.

2.2. Le Matériel bactérien

Le matériel bactérien utilisé dans cette étude se résume aux trois souches décrites précédemment. Celles-ci sont connues pour être des rhizobactéries ayant d'importants effets sur la croissance des végétaux (*cf.* Partie bibliographique).

Le tableau 13 reprend les caractéristiques principales de ces trois souches ainsi que certaines informations relatives à leur provenance et à leur état de conservation.

Tableau 13: L'ensemble des souches qui ont été utilisées pour ce travail

Souches	Source	Caractéristiques	État de conservation
Azospirillum brasilense	Isolées à partir de la Rhizosphère du blé dans les régions Algériennes	Gram négatif, mobile, aérobie	Dans le glycérol à –80°C
Bacillus.sp		Gram positif, aérobie ou aéro-anaérobie	Dans le glycérol à –80°C
Pseudomonas fluorescence		Gram négatif, mobile	Dans le glycérol à –80°C

2.3. Inoculation des différentes suspensions bactériennes dans le substrat

L'ensemble du matériel utilisé est préalablement stérilisé dans l'autoclave et l'opération d'inoculation des différentes suspensions dans le substrat est réalisée dans des conditions aseptiques, en utilisant une hotte à flux laminaire.

L'inoculation des deux substrats (talc et marc de café) s'est faite par les trois souches rhizobactériennes (*Azospirillum brasilense, Bacillus.sp, Pseudomonas fluorescence*).

2.4. Mesure de la viabilité des substrats

La détermination de la viabilité des substrats s'effectue par ensemencement des inoculas bactériens dans un milieu de culture LB liquide stérile.

La confirmation de la croissance bactérienne s'effectue suite à la lecture des cultures bactériennes par un spectrophotomètre à longueur d'onde de 620 nm.

3. Résultats et discussion

3.1. L'inoculation des différentes suspensions bactériennes dans les substrats (le café et le silicate de magnésium)

L'inoculation des différentes souches bactériennes *Azospirillum brasilense, Bacillus.sp, Pseudomonas fluorescence* dans le talc a induit une bonne croissance des bactéries, avec une absence totale de contaminations après 60 jours d'incubation à température ambiante (environ 25°C). Ceci confirme les données obtenues dans la littérature qui indique un temps de conservation de 60 jours pour *Pseudomonas fluoresces* dans le talc (Bora *et al.,* 2004) et de 45 jours pour *Bacillus subtilis* dans le talc (Amer et Utkhede, 2000).

Les mêmes résultats sont obtenus en ce qui concerne le marc de café. Ainsi, nous observons une bonne croissance des souches bactérienne accompagnée d'une absence totale de contamination pendant 60 jours d'incubation à température ambiante (environ 25 ° C).

La littérature décrit des résultats nettement supérieurs en utilisant d'autres supports tels que la vermiculite ou la tourbe. Ainsi, Vidhyasekaran et Muthamilan ,(1995) ont pu conserver des souches de *Pseudomonas fluorescence* pendant 8 mois. De même, Saleh *et al*., 2001 ont pu conserver des souches d'*Azospirillum* pendant près de 10 mois. D'autres études dirigées par Garcia et Sarmiento, (2000) ont permis la formulation d'*Azospirillum brasilense* à base de tourbe durant une période de 4 mois. Enfin, Nakkeeran *et al*., (2004), ont indiqué que la durée de vie de *Pseudomonas fluorescence* dans la formulation à base de tourbe a été maintenue jusqu'à 8 mois.

L'augmentation de la durée de conservation des souches dans différents supports peut également être améliorée en agissant sur la température de conservation. Ainsi, Sen et ses

collaborateurs (2012) ont montré que *Pseudomonas fluorescence* pourrait bien survivre jusqu'à 180 jours dans la formulation à base de talc conservé à 4 °C.

3.2. Mise en culture

La mise en culture dans un milieu LB liquide des différents substrats inoculés montre une meilleure croissance bactérienne du substrat de talc comparé au substrat de marc de café et ceci après 48h de culture (Figure 22).

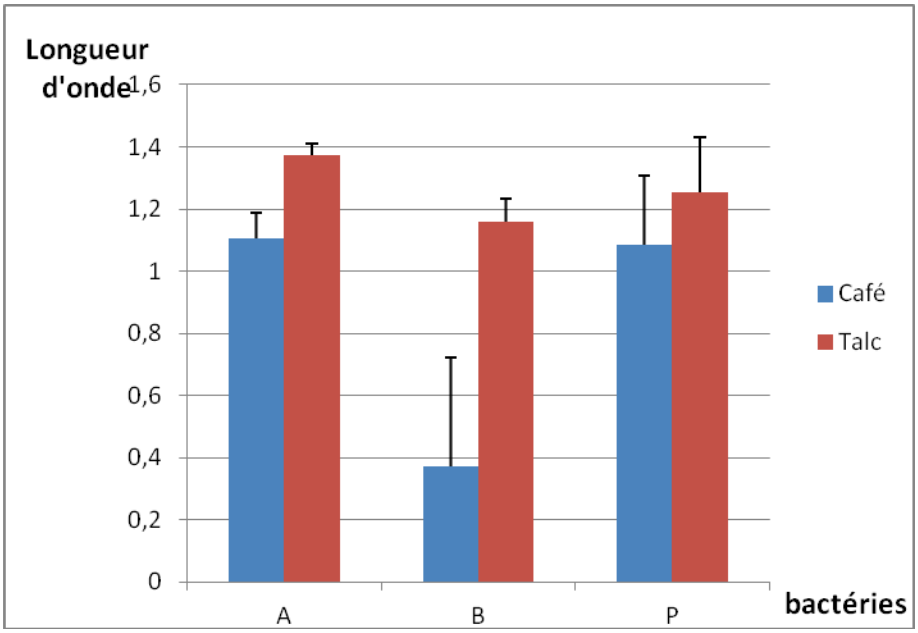


Figure 22 : L'efficacité des deux substrats pour la conservation des rhizobactéries
L'histogramme représente la différence entre les deux substrats utilisés pour la production des biofertilisants à partir des trois souches **A :** *Azospirillum brasilense,* **B :** *Bacillus.sp,* **P:** *Pseudomonas fluorescence.*

Les résultats obtenus montrent clairement que le substrat talc présente une meilleur viabilité quelque soit la souche inoculé. En effet, nous remarquons dans la figure 22 que la densité bactérienne des différentes souche est de 13 à 67 % plus importante au niveau du talc qu'au niveau de la marc de café.

Tableau 14 : Test d'inoculation sur les deux substrats (Talc et Marc de Café)

	Test d`inoculation		Mise en culture sur milieu LB		Observation
	Talc	Marc de Café	Talc	Marc de Café	Apres 2 mois
Témoins	-	-	-	-	Peu de contamination
Inoculé avec *Azospirillum brasilense*	++	++	++	++	Absence de contamination
Inoculé avec *Bacillus spp*	++	++	++	+	Absence de contamination
Inoculé avec *Pseudomonas fluorescence*	++	++	++	++	Absence de contamination

(++) bonne croissance, (+) faible croissance (-) absence de croissance

Nous pouvons déduire des différents résultats obtenus dans ce chapitre que le talc est très efficace en ce qui concerne la formulation des trois souches. Ceci confirme pleinement les données obtenues dans la littérature (Kloepper et Schroth, 1981 ; Bora *et al.,* 2004), selon lesquels l'utilisation du talc comme support pour les rhizobactéries est très prometteur pour la production de biofertilisants.

En revanche, le marc de café reste très peu étudié comme substrat de conservation des bactéries en ce qui concerne la production de biofértilisants.

4. Conclusion

Les résultats préliminaires obtenus jusque là démontrent l'efficacité des deux substrats (marc de café et talc) comme deux intéressants supports de conservation. Ceci laisse envisager la possibilité de les exploiter dans les prochaines études expérimentales dans l'objectif de produire des biofertilisants.

Les premiers résultats obtenus nous laissent penser que le talc présente une meilleure efficacité par rapport au marc de café. Celui-ci pourrait être le support le plus favorable pour la production de biofertilisants.

Dans la perspective de produire des biofertilisants, la confirmation des résultats obtenus passe automatiquement par de plus amples études permettant de confirmer l'efficacité des substrats ainsi que la viabilité des souches. Ceci en effectuant d'autres tests de cultures passant par l'étude de la croissance bactérienne (cinétique bactérienne) avant et après inoculation ainsi que des essais sur plante sous conditions contrôlées pour finir par des tests sur terrains.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abeles FB, Morgan PW, Saltveit Jr ME (1992). Ethylene in plant biology, 2nd edn. San Diego: Academic Press.

Achouak W, Conrod S, Cohen V et Heulint. Phenotypic variation of pseudomonas brassicacearum as a plant root-colonization strategy. Mol. Plant- Microbe Interact.17: 872-879.

Ahmad F., Ahmad I., and Khan M.S (2006). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research, 36: 1-9.

Akhtar. MS. Siddiqui. ZA (2009). Use of Plant Growth promoting rhizobacteria for the biocontrôle of root-rot disease complex chickpea. Australian Plant Pathology.38: 44-50.

Albouchi A., Sebei H., Mezni M. Y. & EL Aouni M. H (2002). Influence de la durée d'une alimentation hydrique déficiente sur la production de biomasse, la surface transpirante et la densité stomatique d'Acacia cyanophylla. Annales de l'INRGREF. 4 : 138- 61.

Amer G.A. et Utkhede R (2000). Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber.Canadian Journal of Microbiology .46: 809-816

Andrianjaka, Z; Bally, R; Lepage, M; Thioulouse, J; Comte, G; Kisa, M; Duponnois, R (2007). Biological control of Striga hermonthica by Cubitermes termite mound powder amendment in sorghum culture. APPLIED SOIL ECOLOGY. 37 :175-183.

Arzanesh .M. H, Alikhani H. A. , Khavazi K, Rahimian .H. A, Miransari. M(2011). Wheat (Triticum aestivum L.) growth enhancement by Azospirillum sp. under drought stress. World J Microbiol Biotechnol . 27:197–205.

Assmus, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, R., Lawrence, J.R., Hartmann, A.(1995). In situ localization of Azospirillum brasilense in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 61 :1013– 1019.

BACA B.E. and Elmerich C (2007). Chapter 6: Microbial Production of Plant Hormones.C.Elmerich and W.E.Newton(eds).Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations,113-143.

Bacon CW, Yates IE (2006). Endophytic root colonization by fusarium species: histology, plant interactions, and toxicity. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, eds. Microbial root endophytes. Berlin: Springer-Verlag :133–152.

Bais H.P., Weir.T.L., Perry L.G., Gilroy S et Vivanco J.M (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu. Rev. Plnt Biol,57: 233-266.

Bajji M., Lutts S. & Kinet J-M (2001). Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (Triticum durum Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. Plant Sci. 160 : 669 -681.

Baldani J. I. and Baldani V. L. D (2005). History on the biological nitrogen fixation research graminaceous plants: spezial emphasis on the Brazilian experience. An. Acad. Brass. Sci. 77: 549- 579.

Bally. R, Elmerich. C (2007). Biocontrol of plant diseases by associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria. In: C. Elmerich, W.E. Newton (eds). Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. Springer. 171-190

Bally, I.S.E (2006). Mangifera indica (mango). In: Elevitch, C.R. (ed.). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), Hōlualoa, Hawai,,i.

Barbieri, P., Bernardi, A., Galli, E., and ZANETTI, G (1988). Effects of inoculation with different strains of Azospirillum brasilense on wheat roots development. In Azospirillum. IV. Genetics, physiology, ecology. Edited by W. Klingmüller. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 181-188.

Barriuso J, Ramos Solano B, Manero Gutierrez FJ (2008). Protection against pathogen and salt stress by four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from Pinus spp. on Arabidopsis thaliana. Phytopathol .98: 666–672.

Barrs H (1968). Determination of water deficit in plant tissues. In: Water Deficit and Plant Growth. Koslowski T. Academy Press. New York. 235-368.

Bartels D, Sunkar R (2005). Drought and salt tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Science.24 : 23–58.

Bashan, Y (1998). Inoculants of plants growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances .16:729-770.

Bashan, Y. and de-Bashan, L.E (2002). Reduction of bacterial speck (Pseudomonas syringae pv tomato) of tomato by combined treatments of plant growth-promoting bacterium, Azospirillum brasilense, streptomycin sulfate, and chemothermal seed treatment. European Journal of Plant Pathology 108:821–829

Bashan, Y. and Levanony, Y (1991). Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by Azospirillum brasilense. Plant Soil. 137:99-103.

Bashan, Y., Harrison, S.K., and Whitmoyer, R.E(1990). Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with Azospirillum brasilense is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. Appl. Environ. Microbiol. 56: 769-775.

Bashan Y., Holguin G. and de-Bashan L. E (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can J Microbiol. 50:521-577.

Bashan, Y., Puente, M.E., Rodriguez-Mendoza, M.N., Toledo, G., Holguin, G., Ferrera-Cerrato, R. and Pedrin, S (1995). Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Applied and Environmental Microbiology. 61 : 1938-1945.

Beauchamp, C. J (1993). Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agents, Phytoprotection 71:19-27

Beck D.P., Materon L.A. et Afandi F(1993). Practical Rhizobium–legume technology manual, .ICARDA (Ed), Syria. 389.

Bélanger P.A., Bissonnette C., Bernèche-D'Amours A., Bellengerb J.P. and Roya S (2011). Assessing the adaptability of the actinorhizal symbiosis in the face of environmental change. Environmental and Experimental Botany.74: 98– 105

Belimov A.A., Safronova V.I. and Mimura T. (2002). Response of spring rape to inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase depends on nutrient status of the plant. Canadian Journal of Microbiology. 48: 189–199.

Benhamou, N., Kloepper, J.W. and Tuzun, S (1998).Induction of resistance aghainst Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterialstrain: ultrastructural and cytochemistry of the host response. Planta 204: 153-168

Bent, E. (2005). Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In Multigenic and induced systemic Resistance in Plants, edited by S. Tuzun and E. Bent: Springer, NY.

Berea J.M, Azcon R et Azcon-Aguilar C (2002). Mycorhyzosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. Anatomy van Leeuwnhoek, 81:343-351.

Blaha, D., Prigent-Combaret, C., Mirza, M.S., and Moënne-Loccoz, Y(2006). Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene acdS in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. FEMS Microbiol. Ecol. 56: 455–470.

Bloemberg, G. V., and B. J. J. Lugtenberg (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr. Opin. Plant Biol. 4:343-350.

Boncompagni E., Ostrerás M., Poggi M. and Le Rudulier D (1999). Occurrence of choline and glycine betaine uptake metabolism in rhizobia. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2072- 2077.

Bora T., Ozaktan H., Gore E. et Aslan E.,(2004). Biological control of Fusarium oxysporum f. sp. melonis by wettable powder formulations of the two strains of Pseudomonas putida. J. Phytopathology 152: 471-475.

Bousba R., Ykhlef N. & Djekoun A (2009). Water use efficiency and flag leaf photosynthetic in response to water deficit of durum wheat (Trticum durum Desf).World Journal of Agricultural Sciences 5. 5: 609 -616.

Bova F (2012). Bilan céréalier & oléo-protéagineux. Les marchés de FranceAgriMer.168-170-173.

Burris, R.H., and Roberts, G.P (1993). Biological nitrogen fixation. Annu. Rev. Nutr. 13: 317–335.

Bushby H.V.A. et Marshall K.C (1977). Water status of rhizobia in relation to their susceptibility to desiccation and to their protection by montmorillonite. Journal of General Microbiology .99: 19-27.

Cassidy, M.B., Lee, H. and Trevors, J.T.(1996). Environmental applications of immobilizedmicrobial cells: a review. Journal of Industrial Microbiology .16: 79-101.

Cechin I., Rossi S.C., Oliveira V.C. & Fumis T.F (2006). Photosynthetic responses and proline content of mature and young leaves of sunflower plants under water deficit. PHOTOSYNTHETICA .44: 143-146.

Charest. MH, Beauchamp. CJ, Antoun.H(2005). Effects of the humic substances of deinking paper sludge on the anatagonism between two compost bacteria and pythium ultimum. FEMS Microbiology Ecology.52: 219-227.

Clarck & Mac-Caig (1982). Excised leaf water relation capability as an indicator of drought resistance of Triticum genotypes. Can.J . Plant Sci . 62: 571-576.

Conn VM, Walker AR, Franco CMM (2008). Endophytic Actinobacteria induce defense pathways in Arabidopsis thaliana. Mol. Plant Microbe Inter. 21:208–218.

Creus, C.M., Graziano, M., Casanovas, E.M., Pereyra, M.A., Simontacchi, M., Puntarulo, S., et al (2005). Nitric oxide is involved in the Azospirillum brasilense-induced lateral root formation in tomato. Planta.221: 297–303.

Croes, C. L., Moens, S., van Bastelaere, E., Vanderleyden, 1. & Michiels, K. W(1993). The polar flagellum mediates Agospirillum brasilense adsorption to wheat roots. J Gen Microbio.l139:2261-2269.

David, J.C. et Grongnet, J.F (2001). Les protéines de stress. INRA Prod. Anim.14: 29-40.

De Freitas, J.R. and Germida, J.J (1992). Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under growth chamber conditions. Soil Biology & Biochemistry .24: 1127–1135.

De Leonardis A.M.D., Marone D., Mazzucotelli E., Neffar F., Rizza F., Fonzo N.D., Cattivelli L. & Mastrangelo A.M (2007). Durum wheat genes up-regulated in the earlyphases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. Plant Sci. 172 : 1005 -1016.

De Troch, P., and Vanderleyden, J. (1996). Surface properties and motility of Rhizobium and Azospirillum in relation to plant root attachment. Microbiol. Ecol. 32:149-169.

De Vleesschauwer, D., Cornelis, P. and Höfte, M (2006). Redox-active pyocyanin secreted by Pseudomonas aeruginosa 7NSK2 triggers systemic resistance to Magnaporthe grisea but enhances Rhizoctonia solani susceptibility in rice. Mol. Plant Microbe Interact. 19:1406-1419.

Dey R., Pal K.K., Bhatt D.M. and Chauhan S.M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (Arachis hypogaea L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. Microbio.Res. 159: 371-394.

Dicko M. H (2006). Travaux pratique biochimie structurale et enzymologie. Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles. Univ. Ouagadougou.

Dilfusa Egamberdiyeva and Gisela Höflich (2002). Root colonization and growth promotion of winter wheat and pea by Cellulomonas spp. at different temperatures.

Djermoun A (2009). La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. Revue Nature et Technologie 1 : 45-53.

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, van de Broek A, 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.

Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003). Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Plant Sci. 22:107-149.

Domenech J, Ramos SB, Probanza A, Lucas GJA, Gutierrez MFJ (2007). Elicitation of systemic resistance and growth promotion of Arabidopsis thaliana by PGPRs from Nicotiana glauca: a study of the putative induction pathway. Plant Soil .290: 43–50.

Downie, JA (2005) Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. Curr Biol. 15: 6.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton P.A., Ruberg A. & Smith F (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry.28:350-356.

Duhoux E. and Nicole M (2004). Atlas de Biologie végétale : associations et interactions chez les plantes. Paris : Dunod. 166

Egamberdieva D, Kucharova Z (2009). Selection for root colonizing bacteria stimulating wheat growth in saline soils. Boil. Fert. Soil. 45 :563–571.

El Jaafari S. (1993). Contribution à l'étude des mécanismes biophysiques et biochimiques de résistance à la sècheresse chez le blé.Thèse de doctorat.Univ.Gembloux.Belgique. 214.

EL Jaafari S. (2000). Durum wheat breeding for abiotic stress resistance : definig physiological trats and criteria. Option mediterranieéene génétique et amélioration variétale. Montpellier (France), 15-17 décembre 1992.

Eliane Cristina G.V., Ivan S., Marcos P., Carlos A.S., Hugo Bruno C.M., Celso J.M. & Ellis R.J (2007). The molecular chaperone concept. Semin. Cell Biol. 1: 1 - 9.

Fages J(1990). An optimized process for manufacturing an Azospirillum inoculant for crops. Applied Microbiology and Biotechnology .32: 473-478.

Farshadfar E., Ghascmpour & Vaezi (2008). Molecular Aspectsof drought tolérance in Bread Wheat (T.aestivum).Pakistan Journal of Biological Sciences 11.1: 118-122.

Fischer Sonia E, Edgardo C. Jofre´ ,Paula V. Cordero , Francisco J. Gutie´rrez Man˜ero ,Gladys B. Mori (2009). Survival of native Pseudomonas in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi. Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU,Boadilla del Monte, Madrid, Espana

Fischer Sonia E, Fischer Sandra I, Soledad Magris, Gladys B. Mori (2007). Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. World J Microbiol Biotechnol :23:895–903.

Gage D.J (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiol Mol Biol.Rev. 68 (2): 280-300.

Garcia O. A. et Sarmiento M (2000).A note on the viability of Azospirillum brasilense in turf used as carrier in inoculated grass seeds. Cuban. J. Agric. Sci. 34: 343-345.

Gholami, A., Shahsavani, S., Nezarat, S (2009). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. International Journal of Biological and Life Sciences.5: 35-40.

Glick BR (2005) .Modulation of plant ethylene levels by bacterial enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiol Lett. 251:1-7.

Glick BR. (2007). Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. Crit. Rev. Plant Sci. 26 :227–242.

Glick BR, Bashan Y (1997) .Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phyto-pathogens. Biotechnol. Adv. 15:353-378.

Glick B. R., Jacobson C. B., Schwarze M. M. K., and Pasternak J. J (1997) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhyzobacterium Pseudomonas putida GR 12-2 do not stimulate canola root elongation. Canadian Journal of Microbiology.40: 911–915.

Glick B.R., Penrose D. and Li J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. Journal of Theoretical Biology. 190: 63-68.

Gough,C et al.1997.Interaction between Bacterial diazotrophs and the non-legume Dicot Arabidopsis thaliana as model plant,Plant soil,Vol 194, nos1-2,pp.123-130.

Graham P. H. (1963). Vitamin requirement of root nodule bacteria. J. Can. Microbiol. 30: 245-248.

Gray and L.M. Smith (2005). Influence of land use on postmetamorphic body size of playa lake amphibians. Journal of Wildlife Management. 69:515-524.

Hadas R, Okon Y (1987) .Effect of Azospirillum brasi- lense inoculation on root morphology and respira- tion in tomato seedlings. Biol Fertil Soils .5: 241-247

Hamel L (2010). Appréciation de la variabilité génétique des blés durs et des blés apparentés par les marqueurs biochimiques. Mem.Magister. Univ.Mentouri Constatntin. 11.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M (2004). Trichoderma species: opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2:43–56

Harrison, MJ (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis.Annu. Rev. Microbiol. 59 :19-42.

Hasky-Günther, K., Hoffmann-Hertargen, S. and Sikora, R.A.(1998). Resistance against the potato cyst nematode Globodera pallida systemically induced by the rhizobacteria Agrobacterium radiobacter (G12) and Bacillus sphaericus (B43). Fundam. Appl. Nematol. 21:511-517.

Herbinger K., Tausz M., Wonisch A., Soja G., Sorger A. & Grill D (2002) . Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. Plant Physiol. Biochem. 40: 691 - 696.

Herman MAB, Nault BA, Smart CD (2008). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. Crop. Protect. 27: 996-1002.

Hireche (2006). Répense de la luzerne Médicago sativa (L) au stress hydrique et à la profondeur du semis. Thèse de Magister.Univ. EL Hadj Lakhdar. Batna :83 .

Hocher V., Gherbi H. and Svistoonoff S (2010). Les arbres actinorhiziens de la famille des Casuarinaceae : utilisations et étude de la plasticité racinaire face aux contraintes abiotiques. 73-78.

Hoft.M et Vos.P (2006). Plant pathogenic Peusomonas species.Dans Plant Association Bacteria PART 3.Springer, Pays-Bas. 507-533.

Holguin G., and Glick B. R (2001). Expression of the ACC deaminase gene from Enterobacter cloacae UW4 in Azospirillum brasilense. Microbial Ecology. 41: 281–288.

Huguet, V., Land, E.O., Casanova, J.G., Zimpfer, J.F., and Fernandez, M.P (2005). Genetic diversity of Frankia microsymbionts from the relict species Myrica faya (Ait.) and Myrica rivas-martinezii (S.) in Canary Islands and Hawaii. Microb. Ecol. 49: 617–625.

Ivanova, E.L (2006). Immobilisation des bactéries fixatrices d' azote pour l' amelioration de laculture des plantes non-legumineuses (blé). In ENITIAA-GPA . 198. Nantes, France:ENSAR

Jacobsen B.J, Zidack .N.K et Larson B.J(2004). The role of Bacillus-based biological control agents in integrated pest management systems: plant disaeses. Phytopathology.94: 1272-1275.

Jain D. K. and Patriauin D. G (1985). Characterization of a substance produced by Azospirillum which causes branching of wheat root hairs. Canadian Journal of microbiology 31: 206-210

Jalili F., Khavazi K., Pazira E., Nejati A., Asadi Rahmani H., Rasuli Sadaghiani H., and Miransari M (2009) .Isolation and characterization of ACC deaminase producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (Brassica napus L.) growth. Journal of Plant Physiology.166: 667–674.

Jangpromma N., Kitthaisong S., Daduang S., Jaisil P. & Thammasirirak S (2007). 18 KDa protein accumulation in sugarcane leaves under drought stress conditions. Kmitl .Sci. Tech. J.7: 27- 44.

Jasso D., De Rodriguez., Romero-Garcia J., Rodriguez-Garcia R. & Sanchez J. L (2002).Characterisation of proteins from sunflower leaves and seeds: Relationship of biomass and seed yield. Trends in new crops and new uses. ASHS Press. Alexandria.VA.

Jordan D. C (1984). Genus I, Rhizobium. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. ed. Holt, J. G. & Kreig, N. R. 235- 242. London; Williams & Wilkins Co.

Kadouri D, Venzon NC, O'Toole GA (2007). Vulnerability of pathogenic biofilms to Micavibrio aeruginosavorus . Appl Environ Microbiol. 73:605-614.

Karpati E Kiss P, Ponyi T, Fendrik I, de Zamaroczy M, Orosz L. (1999). Interaction of Azospirillum lipoferum with wheat germ agglutinin stimulates nitrogen fixationJ Bacteriol. 181 :3949-3955

Kellou R (2008). Analyse du marché Algérien de blé dur et les opportunités d`exportation pour les céréaliers français dans le cadre du pôle de compétitivité. Mémoire de Master :169 Montpellier.

Kennedy Ivan R.,Lily L.Pereg-Grek,Graig Wood,Rosalind Deaker,Kate Glichrist and Sunietha Katupitiya (1997).Biological nitrogen fixation in non-leguminous field corps:facilitating the evolution of an effective association between Azospirillum and wheat.SUNFix Centre for Nitrogen Fixation,Departement of Agricultural Chemistry and soil Science,University of Sydney,NSW,Australia.

Khavazi K. et Rejali F(2000). Perlite as a carrier for soybean inoculant. X th international colloquium for the optimization of plant nutrition .Cairo, Egypte.

Kim, C., Kecskés, M.L., Deaker, R.J., Gilchrist, K., New, P.B., Kennedy, I.R., Kim, S. and Sa,T (2005). Wheat root colonization and nitrogenase activity by Azospirillum isolatesfrom crop plants in Korea. Canadian Journal of Microbiology .51 :948–956.

Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF, Kishore GM[(1991) Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. Plant Cell. 3: 1187-1193.

Kloepper J.W (1993). Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: Metting FB Jr (ed) Soil microbial ecology-applications in agricultural and environmental management. Marcel Dekker, Inc., New York. 255–274.

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.

Kloepper J.W. et Schroth M.N (1981). Development of a Powder Formulation of Rhizobacteria for Inoculation of Potato Seed Pieces. Phytopathology.71:590-592.

Kloepper, J.W., S. Tuzun, L. Liu and G. Wei (1993). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Inducers of Systemic Disease Resistance. In: Pest Management: Biologically based Technologies, Lumsden, R.D. and J.L. Waughn (Eds.). American Chemical Society Publication, Washington, DC.

Krieg, N.R. and Döbereiner, J (1984). Genus Azospirillum. In Bergey's manual of systematicbacteriology ed. Krieg, N.R.a.J.G.H. 94–104. Baltimore, Md. : Williams and Wilkins.

Kuykendall L. D., Saxena B., Devine T. E. and Udell S. E (1992). genetic diversity in Bradyrhizobium japonicum Jordan 1982 and proposal for Bradyrhizobium elkanii sp. nov., Can. J. Microbiol. 38: 501- 505.

Kuruvadi, S (1989). Stomatal frequency in bread wheat under irrigated and rainfed conditions. Rachis.8 : 22-28.

Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of T4 bacteriophage. Nature. 227: 680-685.

Lee, Y.H., Lee, W.H., Lee, D.K. and Shim, H.K. (2001). Factors relating to induced systemic resistance in watermelon by plant growth-promoting Pseudomonas sp. Plant Pathol. J. 17:174- 179.

Lee S., Reth A., Miletzus D., Sevilla M. and Kennedy C (2000). Characterization of a major cluster of nif, fix, and associated genes in a sugarcane endophyte, Acetobacter diazotrophicus. J. Bacteriol. 182: 7088- 7091.

Lindberg, T., and Granhall, U (1984). Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of temperate cereals and forage grasses. Appl. Environ. Microbiol. 48: 683–689.

Long S.R (1996). Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. Plant Cell 8, 1885–1898

Long S.R (2001). Genes and signals in the Rhizobium-legume symbiosis. Plant growth and physical.125: 69-72.

Loper S.R et Gross H (2007). Genomic analysis of antifungal metabolite production by Pseudomonas fluorescens Pf-5. Eur.J. Plant Pathol. 119: 265-278.

Loretti E., De Bellis L., Alpi A. & Perata P (2001). Why and how do plant cells sense sugars? Ann Bot .88 : 803 - 812.

Lugtenberg B, and Kamilova F (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 63 :541-556.

Lupski J. R. and Weinstock K. H (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. J. Bacteriol. 174: 4525- 4529.

Maplestone P.A. and Campbell R (1989). Colonization of roots of wheat seedlings by bacilli proposed as biocontrol agents against take-all. Soil Bid. Biochem. 21: 543-550.

Macking.H (2007). Phytoremediation of contamined soil on plant efficiency, rhizosphere bacteria and the physical effects of chemical agents. Korea society for Applied Microbiology and Biotechnology. 35: 26-271.

Mauricio I(2010) . Étude de l'encapsulation de rhizobactéries pour la biofertilisation du blé. Thèse de Doctorat. Université de NANTES UFR sciences et techniques.

Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B.R (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistancein tomato plants to salt stress. Plant Physiology and Biochemistry.42: 565-572.

Mebarkia A., Benkohila H.S., Hamza M. and Makhlouf M (2012). Efficacité d'une protéine entomotoxique du type a1b des graines de légumineuses. Agriculture. 3: 1-8.

Meziane, H., van der Sluis, I., van Loon, L.C.., Höfte, M. and Bakker, P.A.H.M (2005). Determinants of Pseudomonas putida WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. Mol. Plant Pathol. 6 :177-185.

Minorsky PV (2008). On the inside. Plant. Physiol. 146: 323-324.

Mittal S (2004). Diversity and taxonomy of speudomonads from wheat rhizospher, Ph. D. Thesis, G. B. Plant Univ. of Agriculture and technol., Pantnagar

Miransari, M., Bahrami, H.A., Rejali, F., Malakouti, M.J(2008). Using arbuscular mycorrhiza to reduce the stressful effects of soil compaction on wheat (Triticum aestivum L.) growth. Soil Biology and Biochemistry .40:1197-1206.

Miransari, M., H.A. Bahrami, F. Rejali, M. J. Malakouti, H. Torabi (2007). Using arbuscular mycorrhiza to reduce the stressful effects of soil compaction on corn (Zea mays L.) growth. Soil Biology and Biochemistry .39: 2014-2026.

Miransari, M., Smith, D.L (2007). Overcoming the stressful effects of salinity and acidity on soybean [Glycine max (L.) Merr.] nodulation and yields using signal molecule genistein under field conditions. Journal of Plant Nutrition .30:1967-1992.

Moenne-Loccoz, Y., Naughton, M., Higgins, P., Powell, J., O'Connor, B. and O'Gara, F (1999). Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrolefficacy of Pseudomonas fluorescens F113. Journal of Applied Micobiology .86:108-116.

Moen, P.; Dempster-McClain, D.; Robison, J. Caregiving and Women's Well-Being: A Life Course Approach. Journal of Health and Social Behavior, 1995, Vol. 36, 259 – 273

Molina-Favero, C., Creus, C.M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., and Lamattina, L (2008). Aerobic nitric oxide production by Azospirillum brasilense Sp245 and its influence on root architecture in tomato. Mol. Plant Microbe Interact. 21: 1001–1009.

Morgan, J.A.W., Bending, G. D. et White, P. J (2005). Biological costs and benefits to plant microbe interactions in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 56: 1729–1739

Morgan PW, and Drew MC(1997). Ethylene and plant response to stress. Physiologia Plantarum, 100: 620-630.

Mylona, P., Pawlowski, K., and Bisseling, T (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. Plant Cell. 7: 869–885.

Murty MG, Ladha JK (1988). Influence of Azospirillum inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. Plant Soil. 108: 281-285.

Nadeem SM., Zahir ZA., Naveed M., Arshad M (2009). Rhizobacteria containing ACC-deaminase confer salt tolerance in maize grown on salt-affected fields. Canadian Journal of Microbiology.55: 1302–1309.

Nagorska.K, Bikowski.M, Obuchowski.M (2007). Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of Bacillus subtilis as a powerful biocontrôle agent. Acta Biochimica Polonica, 54: 495-508.

Nakashima K, Satoh R, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998). A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of Arabidopsis. Plant Physiol. 118: 1233-1241

Nakkeeran S., Dilantha Fernando W. G.et Siddiqui Z.A (2005).plant growth promoting rhizobacteria formulations and itsscope in commercialization for the management of pests and diseases. Springer, Dordrecht, the Netherlands, (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. 257-296.

Nakkeeran S., Kavitha K., Mathiyazhagan S., Fernando W. G. D., Chandrasekar G.et Renukadevi P (2004).Induced systemic resistance and plant growth promotion by Pseudomonas chlororaphis strain PA-23 and Bacillus subtilis strain CBE4 against rhizome rot of turmeric (Curcuma longa L.). Can. J. Plant Pathol. 26: 417-418.

Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Raguchander, T. and Samiyappan, R (2001). Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by Pseudomonas fluorescens. Soil Biol. Biochem. 33:603-612.

Nie,Y;E ,Vesk,M.Kennedy, et al,.1992.Structure of 2,4-D induced Paranodules with Rhizobium on wheat.Phytochemistry,no.11,pp:67-73.

Nikos Hontzeasa,1, Jerome Zoidakisb, Bernard R. Glicka, Mahdi M. Abu-Omar (2004). Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium Pseudomonas putida UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. Biochimica et Biophysica Acta ,1703 :11 –19.

Niranjan S. Raj,H. S. Shetty And M. S. Redd (2005).Plant Growth Promoting Rhizobacteria:Potential Green Alternative For Plant Productivity. Printed in the Netherlands. Z. A. Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization, 197–216.

Nouri L (2002). Ajustement osmotique et maintien de l'activité photosynthétique chez le blé dur (Triticum durum, Desf), en condition de déficit hydrique. Thèse de Magistère en Biologie végétale Univ Mentouri. Constantine. 77.

Okon .Y and Hadar.Y(1987). Microbial inoculants as crop-yield enhancers CRC crit.Rev.Biotechnol. 6:61-85.

Okon, Y. and Labandera-Gonzalez, C.A. (1994) .Agronomic applications of Azospirillum : anevaluation of 20 years worldwide field inoculations. Soil Biology and Biochemistry .26:1591-1601.

Oldroyd, G. E. D., Harrison, M. J., and Paszkowski, U(2009). Reprogramming plant cells for endosymbiosis. Science. 324:753-754.

Ongena, M., Daayf, F., Jacques, P., Thonart, P., Benhamou, N., Paulitz, T. C. and Bélanger, R. R (2000). Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent Pseudomonads. Plant Pathol. 49:523-530.

Oudjani W (2009). Diversité de 25 génotypes de blé dur (Triticum durum Desf.) : étude des caractères de production et d`adaptation. Mémoire de magister : 113 Constantine.

Palleroni, N.J (1984). Familly 1. Pseudomonas. In Bergey`s manual of systematic bacteriology. Volume 1. Biol. Technol. 33: 193-203.

Paul E A, Horwath W R, Harris D, Follett R, Leavitt S W, Kimball B A and Pregitzer K (1993). Establishing the pool sizes and fluxes in CO2 emissions from soil organic matter turnover. In Soils and Global Change. Eds. R Lal, J Kimble, E Levine and B A Stewart. pp 297–304.

Pawlowski, K. and Sprent, J.I (2008). Comparison between actinorhizal and legume symbiosis. In : Pawlowski, K., Newton, W.E. (2008). Nitrogen-fixing actinorhizal symbioses, Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress. Springer. 6: 261-288.

Pereira S.I.A., Lima A.I.G. and Figueira E.M.A.P(2008). Rhizobium leguminosarum isolated from agricultural ecosystems subjected to different climatic influences: The relation between genetic diversity, salt tolerance and nodulation efficiency. In: Soil Ecology Research Developments. Tian-Xiao Liu. 247-263.

Perrig, D., M.L. Boiero, O.A. Masciarelli, C. Penna, O.A. Ruiz, F.D. Cassán and M.V. Luna (2007). Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of Azospirillum brasilense, and implications for inoculant formulation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75:1143–1150.

Perrine-Walker F, Doumas P, Lucas M, Vaissayre V, Beauchemin NJ, Band LR, Chopard J, Crabos A, Conejero G, Péret B, King JR, Verdeil JL, Hocher V, Franche C, Bennett MJ, Tisa LS, Laplaze L (2010). Auxin carriers localization drives auxin accumulation in plant cells infected by Frankia in Casuarina glauca actinorhizal nodules. Plant Physiol.154:1372–1380.

Probanza.A, Lucas Garcia.JA, et a l(2002). Pinus pineal seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR Bacillus. Applied Soil Ecology, 20: 75-84.

Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. and Samiyappan, R (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Protect. 20 :1-11.

Ramdani N., Kaci Y., Boulila A,. Bellal M.M. and Benallaoua S (2002). Effet de l'inoculation du blé dur (Triticum durum var. Hedba3) par Azospirillum. Annales de l'institut national agronomique El Harrach. 23 : 85-100.

Ramette, A., Moënne-Loccoz, Y., and Défago, G (2006). Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to Thielaviopsis basicola-mediated black root rot of tobacco. FEMS Microbiol. Ecol. 55: 369–381.

Ramos-Solano B, Barriuso-Maicas J, Gutierrez-Mañero J (2009). Biotechnology of the Rhizosphere. In: Kirakosyan A, Kaufman PB (eds.) Recent Advances in Plant Biotechnology. 137, Springer Science & Business Media. pp. 137-162.

Renato F, Claudio B (1995). Phylogeny of the genus *Azospirillum* based on 16S rDNA sequence. FEMS. Microbiol. 195-200.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 597–635.

Rasio A., Sorrentinio G., Cedola M.C., Pastore D. & Wittner G (1987). Osmotic and elastic adjustment of durum wheat leaves under stress conditions. Genetic Agr. 41: 427 - 436.

Reva O. N., Smirnov V. V., Petterson B. and Priest F. G (2002). Bacillus endophyticus sp. nov. Isolated from the inner tissues of cotton plants (Gossypium sp.). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 101- 107.

Reyes. M.E.Q, Rohrbach.K.G and Paull. R.E (2004). Microbial antagonists control. postharvest black rot of pineapple fruit. Postharvest Biology and Technology 33, 193–203 Books (Author and Editor)

Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moënne-Loccoz, Y. and Défago, G (2007). Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? New Phytologist, 173: 861- 872.

Rivas R., Velàzaquez E., Willems A., Vizcaino N., Subba-Rao N. S., Mateos P. F., Gillis M., Dazzo F. B. and Martinez-Molina E (2002). A new species of Devosia that forms a unique nitrogen-fixing root nodule symiosis with the aquatic legume, Neptunia natans (L. F.) Druce. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5217- 5222.

Rodriguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim YO, Redman RS (2008).Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. ISME J. 2:404-416.

Sahgal.M, Johri.B.N (2006). Taxonomy of Rhizobia: current status.Current science .90: 488.

Saleh S. A., Mekhemar G. A. A., Abo El- Soud A. A., Ragab A. A. et Mikhaeel F. T(2001). Survival of Azorhizobium and Azospirillum in different carrier materials:inoculation of wheat and Sesbania rostrata. Bull. Fac. Agric. Univ. Cairo. 52:319-338.

Sanchez L, Weidmann S, Arnould C, Bernard A. R., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V (2005).Pseudomonas fluorescens and Glomus mosseae trigger DMI3-dependent activation of genes related to a signal transduction pathway in roots of Medicago truncatula. Plant Physiol. 139: 1065-1077.

Savouré A., Jaoua S., Hua XueJun., Ardiles W., Van Montagu M. & Verbruggen N (1995).Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the DELTA 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in Arabidopsis thaliana. FEBS Letters .372: 13 -19.

Scofield T., Evans J., Coook M.G. & Wardlow I.F (1988). Factors influencing the rate and duration of grain filling in wheat.Aust.J. Plant physiol. 4: 785 - 797.

Sen S., Biswas G., Kumar Basu S. et Acharya K (2012).Management of leaf spot disease of Stevia rebaudiana Bertoni with antagonistic bacteria. AJCS 6:350-356.

Siddiqui, Z (2006) .PGPR: Biocontrol and Biofertilization .Dordrecht, The Netherlands:Springer.

Smith, R.S (1995). Inoculant formulations and applications to meet changing needs. In Nitrogen fixation: fundamentals and applications ed. Tikhinivich, I.A., Provorov, N.A., Romanov, V.I., W.E. Newton .635-657.

Smith S.E. et Read D.J (1997). Mycorrhizal symbiosis. 2nd edition. Academic Press, san Diego, CA, USA, 605 p.

Steenhoudt, O., and Vanderleyden, J (2000). Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol. Rev. 24: 487–506.

Stephan M. P., Oliveira M., Teixeira K. R. S., Martinez-Drets G. and Döbereiner J(1991). Physiology and dinitrogen fixation of Acetobacter diazotrophicus. FEMS Microbiol. Lett. 77: 67- 72.

Svistoonoff, S (2003). Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes. Thèse de doctorat : Université de Montpellier II. 62

Tamimi S., Timko M.P (2003). Effects of ethylene and inhibitors of ethylene synthesis and action on nodulation in common bean (Phaseolus vulgaris L.). Plant Soi. 257: 125–131.

Tanaka Y., Sano T., Tamaoki M., Nakajima N., Kondo N., and Hasezawa S (2005). Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. Plant Physiology.138: 2337–2343.

Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M.R., Jiménez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J. and Fuentes-Ramírez, L.E (2000). Natural endophytic occurrence of Acetobacter diazotrophicus in pineapple plants. Microbial Ecology .39: 49-55.

Tjamos SE, Flemetakis E, Paplomatas EJ, Katinakis P(2005). Induction of resistance to Verticillium dahliae in Arabidopsis thaliana by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. Mol. Plant Microbe Inter. 18: 555–561.

Tilak K. V. B. R., Ranganayaki N., Pal K. K., de R., Saxena A. K., Nautiyal C. S., Mittal S., Tripathi A. K. and Johri B. N (2005). Divesity of plant growth and soil health supporting bacteria. Curr. Sci. 89: 136- 150

Trotel-Aziz P, Couderchet M, Biagianti S, Aziz A (2008). Characterization of new bacterial biocontrôle agents Acinetobacter, Bacillus, Pantoea and Pseudomonas spp. mediating grapevine resistance against Botrytis cinerea. Environ. Exp. Bot. 64: 21–32.

Trujillo S. K., Willems A., Abril A., Planchuelo A. M., Rivas R., Ludena D., Mateo P. F., Martinez-Molina E. and Velazquez E (2005). Nodulation of Lupinus albus by strains of Ochrobactrum lupine sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1318- 27.

Tuberosa R, Grillo S, Ellis RP (2003). Unravelling the genetic basis of drought tolerance in crops. In: di Toppi LS, Pawlik-Skowronska B, eds. Abiotic stresses in plants. London: Kluwer Academic Publishers: 71–122.

Vandamme P., Goris J., Chen W. M., De Vos P. and Willems A (2002). Burkholderia tuberum sp. nov. and Burkholderia phymatum sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. Syst. Appl. Microbiol. 68: 1132- 1136.

Vandamme P. B., Grillis P. D. V., Kersters K. and Swing J (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. Microbiol. Rev. 60: 407- 438.

Van den Broek, P., Fletcher, C. R., & Risden, K. (1993). Investigations of inferential processes in read- ing: A theoretical and methodological integration. Discourse Processes.16: 169–180.

Van Elsas, J.D., Jansson, J.K. and Trevors, J.T (2007). Modern soil microbiology. Boca Raton,FL: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Van Hulten M, Pelser M, Van Loon LC, Pieterse CMJ, Ton J (2006). Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA .103:5602–5607.

Van Loon L C (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis‑related proteins. European Journal of Plant Pathology.103: 753–765.

Van Loon .LC (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European J. Plant Pathol.119 : 243–254.

Van Loon, L.C., Geraats, B.P.J. and Linthorst, H.J.M (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. Trends Plant Sci. 11:184-191.

Van Peer, R. and Schippers, B (1992). Lipopolysaccharides of plant-growth promoting Pseudomonas sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to Fusarium wilt. Neth. J. Plant Pathol. 98 :129-139.

Verma, J.P., J. Yadav and K.N. Tiwari, (2010). Application of Rhizobium sp. BHURC01 and plant growth promoting rhizobactria on nodulation, plant biomass and yields of Chickpea (Cicer arietinum L.). Int. J. Agric. Res., 5: 148-156.

Versadovic J., Koeuth T. and Lupski J. R (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucl. Ac. Res. 19: 6823-6831.

Verslovic J. T., Schneider M., de Bruijn F. J. and Lupski J. R (1994). Genomic fringerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods Mol. Cell. Biol.5: 25- 40.

Vessey J K (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil .255:571-586.

Vessey J. K. et Heisinger K. G (2001). Effect of Penicillium bilaii inoculation and phosphorus fertilization on root and shoot parameters of field-grown pea. Can. J. Plant Sci. 81:361-366.

Vidhyasekaran P. et Muthamilan M (1995). Development of formulations of Pseudomonas fluorescens for control of chickpea wilt. Plant. Dis. 79: 782–786.

Vieille C, Elmerich C (1990) Characterization of two Azospirillum brasilense Sp7 plasmid genes homologous to Rhizobium meliloti nod PQ. Mot Plant Microbe Interact 3:389- 400.

Wall L.G (2000). The Actinorhizal Symbiosis. J.Plant Growth Regul.19: 167-182.

Walsh C, Pascal RA Jr, Johnston M, Raines R, Dikshit D, Krantz A, Honma M (1981). Mechanistic studies on the pyridoxal phosphate enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from Pseudomonas sp.

Wang C., Knill E., Glick B.R. and Defago G (1999). Effect of transferring 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into Pseudomonas fluorescens strain CHA0 and its gacA derivative CHA96 on their growth promoting and disease suppressive capacities. Can. J. Microbiol. 46: 898-907.

Wang, H. et Clarke, J.M (1993). Genotypic, intraplant and environmental variation in stomatal frequency and size in wheat. Can. J. Plant Sci. 73 : 671-678.

Watt M., McCully M. E. and Jeffree C. E (1993). Plant and bacteria mucilage of the maize rhizosphere: comparison of their soil binding properties and histchemistry in model system. Plant Soil. 151: 151- 165.

Welbaum G, Sturz A.V et al (2004). Fertilizing soil microorganism to improve productivity of agro ecosystems. Crit. Rev. Plant Sci. 23: 175-193.

Wood, C. C., Islam, N., Ritchie, R. J., and Kennedy, I. R (2001). A simplified model for assessing critical parameters during associative 15N2 fixation between Azospirillum and wheat. Aust. J. Plant Physiol. 28: 969–974.

Yordanova, R., Christov, K. & Popova, L (2004). Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. Environmental & Experimental Botany .51: 93–101..

Young J. P. W. and Hauka K. E (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. New Phytol. 133: 87- 94.

Zeghida A., Amrani R., Djennadi F., Ameroun R., Khldoun A.A. & Belloucif M (2004). Etude de la variabilité de réponse des plantules de blé dur (Triticum durum Desf) à la salinité. Céréaliculture. ITGC. 42. Constantine : 5.

Zerrad W., Hillali S., Mataoui B., El Antri S. & Hmyene A (2006). Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur. Biochimie, Substances naturelles et environnement. Congrès international de biochimie.

Zhu Y, Dobbelaere S. et Vanderleyden J (2002). Use of the green fluorescent protein to visualize rice root colonization by Azospirillum irakense and A.brsilense. Funct. Plant Biol.29: 1279-1285.

Zhu Y, Pierson L.S et Hawes M.C (1997). Induction of microbial genes for pathogenesis and symbiosis by chemicals from root border cells. Plant physiol. 115: 1691-1698.

Zukas A.A. & Breksa A.P (2005). Extraction methods for analysis of Citrus leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis. Journal of Chromatography A. 1078: 201 -205.

ANNEXES

ANNEXE 01

Préparation des milieux de culture

1. Milieu LB liquide (g/l) (Lurria-Bertani)

Tryptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	10

- ✓ Stérilisation : autoclavage 120°C pendant 20min

2. Milieu LB solide

Milieu LB liquide +15g/l d'Agar

- ✓ Stérilisation : autoclavage 120°C pendant 20min

ANNEXE 02

Solutions nutritive

1. BROUGHTON ET DHLWORTH (BD)

Solutions-mères

1) - $CaCl_2$ 5ml/10L
2) - KH_2PO_4 5ml/10L
3) - $MgSO_4$ 5ml/10L
- K_2SO_4
- $MnSO_4$,
4) - FE, EDTA 12,5 ml/L
5) – Oligoéléments 5ml/10L

2. **N-Free** (g/l)

Malate	10
KH_2PO_4	1
$MgSO_4, 7H_2O$	0.2
NaCl	0.2
$FeSO_4, 7H_2O$	0.2
Mannitol	5
Extrait de levure	0.1
Eau distillée	1000ml

pH : 6.8

Annexe.03

Solutions de l'extraction des protéines totales

Solution de précipitation (placer au froid) (A)

TCA (100%)	10 ml	(10g TCA/100ml acetone) → 10%
β-mercaptoéthanol	70 ml	→ 0.07%
Acetone	qsp 100ml	

Solution de rinçage (placer au froid) (B)

β -mercaptoéthanol	70 ml	→ 0.07%
Acétone	qsp 100ml	

Laemmli (Tampon de dénaturation)

Tris-HCL 6,8	12.5 ml
SDS	2 g
Glycérol	10 ml
β -mércaptoéthanol	2 ml
Bleu de Bromophénol	0.0025 g
Eau	qsp 100 ml

Solution de 20 ml de SDS à 10%:

Peser 2 g de SDS.
Ajouter 18 ml d'eau distillée et chauffer à 68° C.
Ajuster le pH à 7.2 avec du HCl.
Compléter le volume à 20 ml.
Stocker à température ambiante.

Annexe.04

Solutions et tampons utilisés pour SDS-PAGE

Solution mère d'acrylamide à 35% (à préparer avec gants et masque)

Acrylamide 35 g

Eau distillée qsp 100 ml

Solution mère de bis acrylamide à 2% (à préparer avec gants et masque)

Bis acrylamide 2 g

Eau distillée qsp 100 ml

Solution stock de SDS à 10%

Sodium Dodécyl Sulfate 10 g

Eau distillée qsp 100 ml

Solution d'APS (Ammonium Persulfate) à 1% :

APS 0.1 g

Eau distillée qsp 10 ml

Tampon Tris-HCl pH 8.8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

Tris (hydroxyméthyl aminomethan) 60.57 g

Eau distillée 400 ml

Ajuster à pH 8.8 avec du HCl fumant 8 à 10 ml

Eau distillée qsp 500 ml

Tampon Tris HCl pH 6.8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

Tris (hydroxyméthyl aminomethan) 30.285 g

Eau distillée 200 ml

Ajuster à pH 6.8 avec du HCl fumant 19.5 ml

Eau distillée qsp 250 ml

Tampon d'électrophorèse

Glycine 70.55 g

Tris (hydroxyméthyl amino Ethan) 15 g

SDS 5 g

Eau distillée qsp 5000 ml

Solution de coloration (pour deux gels)

TCA 60% 100 ml (60gTCA/100ml Eau distillée)

Solution mère de Bleu de Coomassie R-250 25 ml

Eau distillée qsp 500 ml

Solution mère de bleu de Coomassie R250

Bleu de Coomassie R250 10 g

Ethanol 95° qsp 1000 ml

L'éthanol doit être mis en agitation dans l'éprouvette, avec un barreau aimanté. Le bleu de Coomassie est ensuite ajouté (sinon le bleu prend en masse au fond du contenant). Laisser en agitation au moins deux heures, puis filtrer la solution.

Composition du marqueur moléculaire (Kit Low)

Proteines	Poids moleculaire (KDa)
α-Lactalbumine	**14,4**
Inhibiteur de la trypsine	**20,1**
Carbonique anhydrase	**30**
Ovalbumine	**45**
Albumine sérique bovine	**66**
Phosphorylase b	**97**

Annexe 05

Préparation des gels

(Quantités pour une cuve de deux gels)

Gel de séparation (running gel) T= 15% et **C = 0.027%**

Acrylamide à 35%	33.37 ml
Bis acrylamide à 2%	16.20 ml
Eau distillée	8.83 ml
Tris – HCl pH 8.8	18.8 ml
SDS à 10%	0.8 ml
APS à 1%	2.5 ml
Temed	50 µl

Gel de concentration (stacking gel) T= 4%

Acrylamide à 35%	2 ml
Bis acrylamide à 2%	0.6 ml
Eau distillée	20.4 ml
Tris – HCl pH 6.8	3.4ml
SDS à 10%	0.28 ml
APS à 1%	1.4ml
Temed	30 µl

ANNEXE 06

Tab.1 : Evaluation de la longueur racinaire chez le blé dur en fonction des différentes bactéries inoculées.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	4	232,567	58,142	17,798	0,000***
Résidus	10	32,667	3,267		
Total	14	265,233			

***P** ≤ 0,05 significative, ****P** ≤ 0,01, hautement significative, *****P**≤ 0,001 très hautement significative, **P** > 0.05 NS: non significative.

ddl : degré de liberté, **F** : valeur observée de la variable F de Fisher, **P** : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives.

Tab.2 : Test de Dunnett / Comparaison des groupes avec le groupe de contrôle bact0 avec un intervalle de confiance à 95.00% chez le blé dur.

Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique d	Différence critique	Significatif
bact2 ~ bact0	11,50	7,79	2,89	4,26	Oui
bact4 ~ bact0	3,50	2,37	2,89	4,26	Non
bact1 ~ bact0	2,50	1,69	2,89	4,26	Non
bact3 ~ bact0	2,33	1,58	2,89	4,26	Non

Bact0 : Témoin, bact1 : inoculées avec *A.brasilense*, bact2 : inoculées avec *Bacillus sp*., bact3 : inoculées avec *P.fluorescence*, bact4 : inoculées avec *Frankia* CcI3.

Tab.3 : Evaluation de la teneur en eau chez le blé dur (GTA et WAHA) en fonction des différentes bactéries inoculées.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Génotype	1	0,123	0,123	5,721	0,023***
traitement	7	6891,034	984,433	45783,167	< 0,0001***
Génotype*traitement	7	26,214	3,745	174,160	< 0,0001***

***P** ≤ 0,05 significative, ****P** ≤ 0,01, hautement significative, *****P**≤ 0,001 très hautement significative, **P** > 0.05 NS: non significative.

ddl : degré de liberté, **F** : valeur observée de la variable F de Fisher, **P** : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives.

Tab.4: Evaluation de la Fluorescence chez le blé dur (GTA et WAHA) en fonction des différentes bactéries inoculées.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
genotype	1	0,000	0,000	24,066	< 0,0001***
traitement	7	0,002	0,000	94,279	< 0,0001
genotype*traitement	7	0,000	0,000	15,151	< 0,0001

***P** ≤ 0,05 significative, ****P** ≤ 0,01, hautement significative, *****P**≤ 0,001 très hautement significative, **P** > 0.05 NS: non significative.

ddl : degré de liberté, **F** : valeur observée de la variable F de Fisher, **P** : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives.

Tab.5: Evaluation du potentiel osmotique chez le blé dur (GTA et WAHA) en fonction des différentes bactéries inoculées.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
genotype	1	0,021	0,021	51,201	< 0,0001***
traitement	7	0,141	0,020	49,926	< 0,0001***
genotype*traitement	7	0,071	0,010	25,006	< 0,0001***

***P** ≤ 0,05 significative, ****P** ≤ 0,01, hautement significative, *****P**≤ 0,001 très hautement significative, **P** > 0.05 NS: non significative.

ddl : degré de liberté, **F** : valeur observée de la variable F de Fisher, **P** : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives

Tab.6: Evaluation du potentiel osmotique chez le blé dur (GTA et WAHA) en fonction des différentes bactéries inoculées.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
genotype	1	1,435	1,435	10,815	0,002 ***
traitement	7	190,415	27,202	204,977	< 0,0001
genotype*traitement	7	20,346	2,907	21,902	< 0,0001

***P** ≤ 0,05 significative, ****P** ≤ 0,01, hautement significative, *****P**≤ 0,001 très hautement significative, **P** > 0.05 NS: non significative.

ddl : degré de liberté, **F** : valeur observée de la variable F de Fisher, **P** : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives

Tab.7: Evaluation de la résistance stomatique chez le blé dur (GTA et WAHA) en fonction des différentes bactéries inoculées.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
genotype	1	56,724	56,724	2129,146	< 0,0001***
traitement	7	23957,806	3422,544	128465,825	< 0,0001
genotype*traitement	7	288,338	41,191	1546,120	< 0,0001

Tab.8: Evaluation de la tenure en sucre soluble chez le blé dur (GTA et WAHA) en fonction des différentes bactéries inoculées.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
genotype	1	245,572	245,572	929,213	< 0,0001***
traitement	7	36410,420	5201,489	19681,795	< 0,0001
genotype*traitement	7	1763,540	251,934	953,288	< 0,0001

***P** ≤ 0,05 significative, ****P** ≤ 0,01, hautement significative, *****P**≤ 0,001 très hautement significative, **P** > 0.05 NS: non significative.

ddl : degré de liberté, **F** : valeur observée de la variable F de Fisher, **P** : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives

Tab.9: Evaluation de la tenure en proline chez le blé dur (GTA et WAHA) en fonction des différentes bactéries inoculées.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
genotype	1	28,753	28,753	34,465	< 0,0001***
traitement	7	87758,604	12536,943	15027,614	< 0,0001
genotype*traitement	7	103,149	14,736	17,663	< 0,0001

***P** ≤ 0,05 significative, ****P** ≤ 0,01, hautement significative, *****P**≤ 0,001 très hautement significative, **P** > 0.05 NS: non significative.

ddl : degré de liberté, **F** : valeur observée de la variable F de Fisher, **P** : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives

Tab 1: Diagramme présence absence des bandes dans les racines de blé dur (GTA/DUR) témoins et inoculer soumis à un stress hydrique.

Valeurs P.M.	Marqueur	T	TS	IA	IAS	IB	IBS	IF	IFS
7.935	0	0	0	0	0	0	0	1	0
14.400	14.400	0	0	0	0	0	0	0	0
15.799	0	1	0	0	0	0	0	0	0
16.484	0	0	0	1	0	1	1	0	0
16.559	0	0	1	0	1	0	0	1	0
16.634	0	0	0	0	0	0	0	0	1
16.709	0	1	0	0	0	0	0	0	0
19.188	0	0	0	0	1	1	1	0	0
19.249	0	0	1	1	0	0	0	1	0
19.309	0	1	0	0	0	0	0	0	1
20.100	20.100		0	0	0	0	0	0	0
21.592	0	1	1	1	1	0	0	0	0
21.810	0	0	0	0	0	0	0	0	1
21.886	0	0	0	0	0	0	1	1	0
21.966	0	0	0	0	0	1	0	0	0
22.399	0	0	0	1	0	0	0	0	0
22.494	0	1	1	0	1	0	0	0	0
22.693	0	0	0	0	0	0		1	1
22.797	0	0	0	0	0	0	1		
22.904	0	0	0	0	0	1	0	0	0
24.963	0	1	0	1	1	1	1	1	1
25.135	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27.133	0	1	1	0	0	0	0	0	0
27.363	0	0	0	1	1	0	0	0	0
28.342	0	0	0	0	0	1	0	1	1
28.602	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30.000	30.000	0	0	0	0	0	0	0	0
30.606	0	1	0	0	1	1	1	1	1
30.918	0	0	0	1	0	0	0	0	0
31.893	0	0	0	0	0	0	0	0	1
32.230	0	0	0	0	1	0	0	1	0
33.631	0	1	0	0	0	0	0	0	0
33.994	0	0	0	1	0	0	0	0	0
35.491	0	0	0	0	1	1	1	1	0
37.052	0	1	1	0	0	0	0	0	0
37.451	0	0	0	1	0	0	0	0	0
40.322	0	0	1	0	0	0	0	0	0
40.741	0	1	0	0	0	0	0	0	0
41.162	0	0	0	1	0	0	0	0	0
41.584	0	0	0	0	0	0	0	0	0

42.008	0	0	0	0	1	1	1	0	0
42.859	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44.143	0	0	1	0	0	0	0	0	0
44.571	0	1	0	1	0	0	0	0	0
45.000	45.000		0	0	0	0	0	0	0
48.220	0	1	0	0	1	0	0	1	1
49.600	0		1	1	0	0	0	0	0
53.993	0	1	0	0	0	0	0	0	0
60.285	0	0	0	1	0	0	0	0	0
61.907	0	1	0	1	1	1	0	1	1
66.000	66.000	0	0	0	0	0	0	0	0
97.000	97.000	0	0	0	0	0	0	0	0
131.647	0	0	1	0	0	0	0	0	0

1 : présence de bande ; **0** : absence de bande.

Tab 2: Diagramme présence absence des bandes dans les racines de blé dur (WAHA) témoins et inoculer soumis à un stress hydrique.

Valeurs P.M.	Marqueur	T	TS	IA	IAS	IB	IBS	IF	IFS
8.270	0	0	1	0	0	0	0	0	0
14.400	14.400	0	0	0	0	0	0	0	0
16.305		1	0	0	0	0	0	0	0
16.669		0	0	0	0	0	1	0	0
16.742		0	0	0	0	1	1	0	1
16.814		0	0	0	1	0	0	0	0
16.887		0	1	1	0	0	0	0	0
17.610		1	0	1	1	1	1	1	1
17.682		0	1	0	1	0	0	1	1
19.735		0	1	0	1	0	0	0	0
19.804		0	0	1	0	0	0	0	0
19.874		1	0	0	0	0	0	0	0
20.424		0	0	0	0	0	0	0	1
20.492		0	0	0	1	0	1	0	1
20.560		0	1	1	0	1	0	0	0
21.033		1	0	0	0	0	0	0	0
21.100	21.100	0	0	0	0	0	0	0	0
21.841		0	0	1	1	1	0	0	0
21.910		0	0	0	0	0	1	0	0
21.979		0	0	0	0	0	0	1	0
22.049		0	0	0	0	0	0	0	1
23.847		1	0	1	0	1	0	0	0
24.466		0	0	1	0	1	0	1	0
24.576		0	0	0	0	0	0	0	1
26.527		1	0	0	0	0	0	0	0
26.835		0	1	0	0	0	0	0	0
26.994		0	0	1	1	0	0	0	0
27.488		0	0	0	0	0	0	0	1
27.660		0	0	0	0	0	0	1	0
28.013		0	0	0	0	1	0	0	0
28.763		1	0	0	0	0	0	0	0
29.364		0	1	0	0	0	0	0	0
29.784		0	0	1	1	0	0	1	1
30.000	30.000	0	0	0	0	0	0	0	0
31.379		0	1	0	0	0	0	0	0
32.371		0	0	0	0	0	0	1	1
34.787		0	0	1	1	0	1	1	1
35.931		0	0	0	0	1	0	0	0
36.517		0	0	1	0	0	0	0	0

37.412		0	0	0	1	1	0	0	0
37.714		0	0	0	0	0	1	1	0
38.018		0	0	0	0	0	0	0	1
40.504		0	0	1	0	1	0	0	0
40.821		0	0	0	1	1	0	0	0
41.139		0	0	0	0	0	1	1	0
41.457		1	0	0	0	0	0	0	1
42.739		0	1	1	0	0	0	0	0
43.061		0	0	0	1	0	0	0	0
43.383		0	0	0	0	1	0	0	0
43.706		0	0	0	0	0	1	1	0
44.029		0	0	0	0	0	0	0	1
44.353		1	0	1	0	0	0	0	0
45.000	45.000	0	0	0	0	0	0	0	0
48.152		0	1	1	0	0	0	0	0
48.827		0	0	0	1	1	1	1	1
50.931		1	0	0	0	0	0	0	0
57.803		1	0	0	0	0	0	0	0
58.605		0	1	0	0	0	0	0	1
59.413		0	0	1	1	1	1	1	1
66.000	66.000	0	0	0	0	0	0	0	0
97.000	97.000	0	0	0	0	0	0	0	0
99.004		1	1	0	0	0	0	0	0
99.742		0	0	1	1	1	0	0	0
100.000		0	0	0	0	1	0	0	0
100.321		0	0	0	0	0	1	1	1
100.755		0	1	0	0	0	0	0	0
101.056		0	0	1	1	1	0	0	0
101.239		0	0	0	0	0	1	1	0
101.315		0	0	0	0	0	1	0	1

1 : présence de bande ; **0** : absence de bande.

Tab 3: Diagramme présence absence des bandes dans les Feuilles de blé dur (GTA/DUR) témoins et inoculer soumis à un stress hydrique.

Valeurs P.M.	Marqueur	T	TS	IA	IAS	IB	IBS	IF	IFS
14.400	14.400	0	0	0	0	0	0	0	0
15.799	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16.484	0	0	0	1	0	1	1	0	0
16.559	0	0	1	0	1	0	0	1	0
16.634	0	0	0	0	0	0	0	0	1
16.709	0	1	0	1	0	0	0	0	0
18.188	0	0	0	0	1	1	1	0	0
19.249	0	0	1	1	0	0	0	1	0
19.309	0	1	0	0	0	0	0	0	1
20.100	20.100		0	0	0	0	0	0	0
21.592	0	1	1	1	1	0	0	0	0
21.810	0	0	0	1	1	1	1	1	1
21.886	0	0	0	0	1	0	1	1	0
21.966	0	0	0	0	0	1	0	0	0
22.399	0	0	0	1	0	0	0	0	0
22.494	0	1	1	0	1	0	0	0	0
22.693	0	0	0	0	0	0		1	1
22.797	0	0	0	1	0	0	1		
22.904	0	0	0	0	0	1	0	0	0
24.963	0	1	0	1	1	1	1	1	1
25.135	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27.133	0	1	1	0	0	0	0	0	0
27.363	0	0	0	1	1	0	0	0	0
28.342	0	0	0	1	0	1	0	1	1
28.602	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30.000	30.000	0	0	0	0	0	0	0	0
30.606	0	1	0	0	1	1	1	1	1
30.918	0	0	0	1	0	0	0	0	0
31.893	0	0	0	0	0	0	0	0	1
32.230	0	0	0	0	1	0	0	1	0
33.631	0	1	0	0	0	0	0	0	0
33.994	0	0	0	1	0	0	0	0	0
35.491	0	0	0	0	1	1	1	1	0
37.052	0	1	1	0	0	0	0	0	0
37.451	0	0	0	1	0	0	0	0	0
40.322	0	0	1	0	0	0	0	0	0
40.741	0	1	0	0	0	0	0	0	0
41.162	0	0	0	1	0	0	0	0	0
41.584	0	0	0	0	0	0	0	0	0

42.008	0	0	0	0	1	1	1	0	0
42.859	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44.143	0	0	1	0	0	0	0	0	0
44.571	0	1	0	1	1	1	1	1	1
45.000	45.000		0	0	0	0	0	0	0
48.220	0		0	1	1	0	0	1	1
49.600	0		0	1	1	1	1	0	0
53.993	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60.285	0	0	0	1	0	1	0	1	0
61.907	0	1	0	1	1	1	0	1	1
66.000	66.000	0	0	0	0	0	0	0	0
97.000	97.000	0	0	0	0	0	0	0	0
108, 376	0	0	0	1	1	0	0	0	0
118,700	0	0	1	0	0	0	0	0	0
120,767	0	0	0	0	0	0	1	0	0
122,833	0	0	0	0	0	0	0	1	1

1 : présence de bande ; **0** : absence de bande.

Tab 4: Diagramme présence absence des bandes dans les feuilles de blé dur (WAHA) témoins et inoculer soumis à un stress hydrique.

PM	Marqueur	T	TS	IA	IAS	IB	IBS	IF	IFS
13.359		0	1	1	1	0	0	0	0
13.360		1	0	0	0	0	0	0	0
13.362		0	0	0	0	1	1	0	0
13.365		0	0	0	0	0	0	1	1
14.248		1	0	0	0	0	0	0	0
14.400	14.400	0	0	0	0	0	0	0	0
14.916		0	0	0	0	0	1	1	0
16.577		1	0	1	1	1	1	0	0
16.670		0	1	0	0	0	0	1	0
18.026		0	0	0	1	1	0	0	0
18.142		0	1	0	0	0	1	0	0
18.260		0	0	0	0	0	0	1	1
18.379		1	0	0	0	0	0	0	0
20.100	20.100	0	0	0	0	0	0	0	0
21.851		1	0	1	0	1	0	1	0
22.215		0	0	0	0	0	0	1	0
22.598		0	0	0	0	0	0	0	1
23.426		0	0	0	0	1	0	0	0
24.593		0	0	0	0		0	1	0
25.932		1	0	0	0	1	0	0	0
26.223		0	0	0	0	0	0	0	1
27.468		0	0	0	0	1	0	1	0
29.609		0	0	1	1	0	0	0	1
30.000	30.000	0	0	0	0	0	0	0	0
32.104		0	0	1	0	1	0	0	0
33.945		1	0	0	0	0	0	0	0
34.424		0	1	0	0	0	0	0	0
39.006		0	0	0	0	0	0	0	1
45.000	45.000	0	0	1	1	0	0	1	1
66.000	66.000	0	0	0	0	0	0	0	0
97.000	97.000	0	0	0	0	0	0	0	0

1 : présence de bande ; **0** : absence de bande.

PGPR, paranodules, stimulating growth and tolerance to water deficit in durum wheat (*Triticum durum* Desf.): Molecular and Genetic Aspects

Benmati Mahbouba, Department of Biology vegetal and Ecology, Faculty of nature science and life, University Constantine 1

Abstract

The use of PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) a biological approach seems promising solution to improve the production of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) in Algeria. Recent research has shown that the use of PGPR as an inoculant is a sustainable alternative to organic crop production.

Characterization of isolated from the rhizosphere of several regions in eastern Algeria (Ain El bey Constantine, El Khroub-Constantine (zoneA), El Khroub-Constantine (zoneB), El Khroub-Constantine (El Baraouia zone1), El Khroub-Constantine (El Baraouia zone2), Mila, Souk Ahrass, Setif, Batna and Tebessa) bacterial strains was performed to determine their morphological and physiological properties. All isolates, except those isolated regions Mila, Batna and Ain El Bey(Constantine), showed significant growth regardless of the medium composition and carbon culture conditions in temperature and pH. In addition, it was found that most of the isolates showed good tolerance to high concentrations of NaCl (700mM), unlike for other.

These strains were also tested for their PGPR effects by biochemical studies, the results clearly show that these isolates belong to the genus *Azospirillum*; to confirm these results a molecular study was performed to sequence the 16S rDNA gene. The phylogenetic tree obtained includes six strains in the same close group of *Azospirillum brasilense*.

Our study has then been to highlight the effects of inoculation of durum wheat with *Azospirillum brasilense* in controlled conditions in a greenhouse. The results show the importance of *A.brasilense* paranodules in training and in the growth of root and aerial part of durum wheat.

Thereafter, the inoculation of durum wheat with actinomycete *Frankia CcI3* has shown the beneficial effects on root growth and on the formation of paranodules considered seats nitrogen fixation.

Further studies on two varieties of durum wheat (GTA / DUR and WAHA) in the presence of one water deficit (12% DC) also showed the ability of PGPR (*Azospirillum brasilense, Bacillus sp. CcI3* and *Frankia*) to restore growth.

Keywords: PGPR, Durum wheat, Azospirillum brasilense, Frankia CcI3, Paranodules, water deficit

PGPR, paranodules تحفيز النمو والتسامح لنقص المياه في القمح القاسي: لجوانب الجزيئية والجينية

بن معطي محبوبة, شعبة بيولوجيا النبات و الإكولوجيا, كلية علوم الطبيعة الحياة, جامعة قسنطينة 1

الملخص

كمنهاج بيولوجي يعتبر الحل الأنسب من أجل تحسين إنتاج القمح الصلب في الجزائر. وقد أظهرت عدّة بحوث حديثة أن إستعمال استخدام PGPR هذه البكتيريا كلقاح يعتبر البديل المستدام لإنتاج المحاصي

التعرف على البكتيرية المعزولة من محيط البدور لعدة مناطق بالشرق الجزائري (عين الباي قسنطينة ،الخروب قسنطينة (المنطقة أ الخروب قسنطينة (المنطقة ب) الخروب قسنطينة (البعراوية منطقة 1) الخروب. الخروب(البعراوية المنطقة 2) ،ميلة، سوق الأهراس، سطيف، باتنة وتبسة) والتي تم دراستها لتحديد خصائصها الفيزيولوجية و المرفولوجية . كل المعزولات عدى (باستثناء) تلك المعزولة من المناطق ميلة، باتنة و عين الباي (قسنطينة). أظهرت نمو كبير بغض النظر عن تركيبة الوسط من كربون وشروط الزرع من درجة الحرارة و درجة الحموضة. وعلاوة على دلك قد وجد ان معظم العزلات أظهرت مقاومة جيدة للتراكيز المرتفعة من حمض كلور الصوديوم ، عكس الشيء عن البعض الآخر.

كما تم اختبار تكثير لهده السلالات من خلال دراسة بيوكيميائية . اظهرت النتائج المتحصل عليها بوضوح ان هده العزلات تنتمي الى جنس ، ولتأكيد هده النتائج تم اجراء الدراسة الجزيئية لتسلسل البنيات للمورثة .الشجرة الفيزيولوجية المتحصل عليها تضم ستة سلالات في نفس المجموعة القريب من و ثم كانت دراستنا لتسليط الضوء على آثار التلقيح للقمح الصلب في ظروف محكمة في البيت البلاستيكي . النتائج المتحصل عليها تبين اهمية في تكوين (تشكيل) (شبه العقود) وفي نمو الجزء الجدري والجزء الهوائي للقمح الصلب .

كما أن تلقيح القمح الصلب ب أمكن من اظهار تأثيرها النافع على نمو الجدور وكدلك على تشكيل شبه عقد والتي تعتبر مقر تثبيت الآزوت الجوي.

دراسات أخرى على صنفين من القمح الصلب في وجود الاجهاد المائي (12 من السعة الحقلية). قد بينت قدرة على المحافظة على مواصلة النمو في وجود هده الظروف.

كلمات المفتاح PGPR, paranodules القمح الصلب ، شبه عقد، الاجهاد المائي

Nom : BENMATI Prénom : MAHBOUBA	Nature du diplôme : Doctorat 3ème cycle LMD Date de soutenance : 11 mai 2014

Titre : **PGPR, paranodules, stimulation de la croissance et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : Aspects moléculaires et génétiques.**

L`utilisation des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) comme une approche biologique semble être la solution prometteuse afin d`améliorer la production de blé dur (*Triticum durum* Desf.) en Algérie. Des recherches récentes ont prouvé que l'utilisation des PGPR comme inoculant constitue une alternative biologique soutenable pour la production végétale.

La caractérisation des souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère de blé dur à partir de plusieurs régions dans l'Est Algérien (Ain El bey Constantine, El Khroub- Constantine (zone A), El Khroub-Constantine (zone B), El Khroub-Constantine (El Baraouia zone1), El Khroub-Constantine (El Baraouia zone2), Mila, Souk Ahrass, Setif, Batna et Tebessa) a été effectué pour déterminer leurs propriétés morphologiques et physiologiques. Tous les isolats, a l`exception de ceux isolés des régions de Mila, Batna et Ain El Bey(Constantine), ont montré une croissance significative peu importe la composition du milieu en carbone et les conditions de culture en température et pH. En outre, il a été constaté que la plupart des isolats présente une bonne tolérance aux concentrations élevées de NaCl (700mM), contrairement à d`autres.

Ces souches ont été également testées pour leurs effets PGPR par des études biochimiques. Les résultats obtenus montrent clairement que ces isolats appartiennent au genre *Azospirillum,* pour confirmer ces résultats une étude moléculaire a été effectuée afin de séquencer le gène 16S rDNA. L'arbre phylogénétique obtenu regroupe 6 souches dans le même groupe proche d'*Azospirillum brasilense*.

Notre étude a consisté ensuite à mettre en évidence les effets de l'inoculation de blé dur avec *Azospirillum brasilense* dans des conditions contrôlé sous serre. Les résultats obtenus montrent l'importance d'*A.brasilense* dans la formation des paranodules et dans la croissance de la partie racinaire et la partie aérienne de blé dur.

Par la suite, l'inoculation de blé dur avec l'actinomycète *Frankia CcI3* a permis de montrer ces effets bénéfiques sur la croissance racinaire ainsi que sur la formation des paranodules considérés comme sièges de la fixation d'azote atmosphérique.

D'autres études sur deux variétés de blé dur (GTA/DUR et WAHA) en présence d`un déficit hydrique (12% de CC) ont montré également la capacité des PGPR (*Azospirillum brasilense*, *Bacillus sp*. et *Frankia CcI3*) a restaurer leur croissance.

Mots clés : PGPR, Blé dur, Azospirilum brasilense, Frankia CcI3, Paranodules, Déficit hydrique.

Membres de jury

Présidente de jury :	YKHLEF N.	*Professeur à l'université Constantine1, Algérie.*
Directeur de thèse :	DJEKOUN A.	*Professeur à l'université Constantine 1, Algérie.*
Examinateurs:	BEDDIAR A.	*Professeur à l'université Badji M. de Annaba, Algérie.*
	GHERBI H.	*Docteur (CR1) à l'IRD de Montpellier, France.*
	HAFSI M.	*Professeur à l'université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie.*
	HAMIDECHI A.	*Professeur à l'université Constantine 1, Algérie.*