

EFFET DE L'INOCULATION DU BLE DUR (*Triticum durum* var. Hedba3) PAR AZOSPIRILLUM

RAMDANI N.¹, KACI Y.², BOULILA A.¹,
BELLAL M.M.³ et BENALLAOUA S.¹

- (1) : Laboratoire de microbiologie appliquée - Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira, Béjaïa,
(2) : Laboratoire de Biologie des Sols - Faculté des Sciences de la Nature, USTHB, Alger
(3) : Institut National Agronomique El Harrach Alger

RESUME

L'inoculation du blé dur (*Triticum durum* var. Hedba3) par une souche d'*Azospirillum* sp., en présence ou en absence d'engrais azotés, s'est traduite par des augmentations significatives des poids de matière sèche des feuilles (+28%), des racines (+ 29%) et de la longueur des feuilles (+ 12%). En outre, les teneurs d'azote total et du phosphore accumulés dans la partie supérieure des plantes se sont accrues respectivement de (+30%) et (+24%). Ces effets sont observés par l'emploi d'une dose modérée de 40 unités d'N / ha en même temps que l'inoculation.

ABSTRACT

The inoculation of durum wheat (*Triticum durum* cv. Hedba3) by *Azospirillum* sp., in presence or absence of nitrogen fertilizers, has lead to significant increase dry matter weights of the leaf (+28%), the dry matter of roots (+ 29%) and length of the leaf (+ 12%). In addition, the contents of total nitrogen and phosphorus accumulated in the upper part of plants increased respectively (+30%) and (+24%). These effects were observed by the use of a moderate amount of 40 units of N/ha at the same time as the inoculation.

Mots clés : *Azospirillum*, blé dur, fixation d'azote, inoculation, PGPR

INTRODUCTION

La solution prometteuse pour la régénération de la fertilité des sols appauvris, sans faire appel aux importations massives d'engrais chimiques, consiste à utiliser le potentiel de la fixation biologique de l'azote atmosphérique. La découverte d'une association très active dite " symbiose associative " entre *Azospirillum* et certaines plantes autres que les légumineuses, a retenu l'attention des chercheurs dans la perspective d'améliorer la productivité agricole (JÖBEREINER et DAY, 1974 ; OKON, 1985 ; OMAR et al, 1989). Il s'agit d'une fixation libre ou associée à la rhizosphère des graminées et dans ce dernier cas, elle est plus performante (OKON, 1985). En effet, les essais d'inoculation sur diverses graminées par les souches d'*Azospirillum*, réalisés de part le monde, ont permis d'améliorer substantiellement les rendements des cultures et de réduire au maximum l'utilisation des engrais azotés chimiques qui sont non seulement onéreux mais sont également responsables, par suite de lessivage, de la pollution des eaux de rivières et des nappes phréatiques (OKON, 1983 ; VLASSAK et al.1983).

Afin d'apprécier le rôle des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique dans le développement des cultures céréalières et dans la perspective d'inoculation sur champs, nous avons étudié l'effet de l'inoculation d'une souche d'*Azospirillum* sur le développement du blé dur. La première étape de cette étude consiste à sélectionner, *in vitro*, le couple " bactérie fixatrice d' N_2 -cultivar de blé " le plus performant du point de vue activité fixatrice d'azote atmosphérique (N_2). Dans la deuxième étape, des essais en pots du couple " plante - bactérie " déjà sélectionné, conduisent à évaluer les effets de l'inoculation d'*Azospirillum* sur la croissance et la nutrition minérale du blé dur.

MATERIEL et METHODES

1. Sélection du couple «*Azospirillum*-blé» destiné à l'inoculation

La comparaison de la capacité fixatrice d' N_2 des *Azospirillum* associées aux cultivars de blé dur a été effectuée en «modèle spermosphère », selon la technique de réduction d'acétylène préconisée par THOMAS-BAUZON et al. (1982).

1.1. Matériel bactérien

Nous avons retenu dans le cadre de cette étude deux souches d'*Azospirillum* (photo 1). La souche X1F isolée pour la première fois en Algérie de la rhizosphère de blé dur dans la région de Tiaret (KACI, 1987) et la souche SD3, *Azospirillum brasilense*, provient du laboratoire d'écologie microbienne de la rhizosphère (LEMIR-CNRS de NANCY-FRANCE) (HEULIN, 1983).

1.2. Matériel végétal

Deux variétés locales de blé dur ont été retenues pour étudier l'association plante -*Azospirillum*. Il s'agit de : *Triticum durum* var. Hedba 3 et *Triticum durum* var. Waha.

1.3. Mesure de l'activité nitrogénasique (Test ARA)

Nous avons fait germer, à l'obscurité et dans des tubes de PANKHURST (PANKHURST, 1967), renfermant au préalable 6 ml du milieu RCV (WEAVER et al., 1975), exempt de toute source de carbone et d'azote, une semence stérile de chacune des deux variétés de blé. Chaque plantule a été inoculée par 10^7 cellules bactériennes. Les tubes ainsi préparés sont incubés, sous 10% d'acétylène à 30°C. Dans ces conditions, les bactéries fixatrices d'azote se multiplient aux dépens des substrats carbonés exsudés par les racines des plantes. Ce dispositif de germination est appelé « **modèle spermosphère** » (Figure 1).

Les mesures d'ARA sont effectuées après 3 ; 5 ; 7 et 9 jours d'incubation. Chaque cultivar et/ou chaque souche a été caractérisé par la moyenne des vitesses maximales (**Vmax**) de dégagement d'éthylène observé pour 20 répétitions.

2. Inoculation du blé dur par *Azospirillum*

Les résultats des comparaisons des **Vmax** des couples « cultivar végétal- bactérie fixatrice d' N_2 » nous ont conduit à sélectionner la combinaison (*Azospirillum* X1F - blé dur var. Hedba 3) qui a montré une activité fixatrice maximale.

1.1. Matériel bactérien

Nous avons retenu dans le cadre de cette étude deux souches d'*Azospirillum* (photo 1). La souche X1F isolée pour la première fois en Algérie de la rhizosphère de blé dur dans la région de Tiaret (KACI, 1987) et la souche SD3, *Azospirillum brasilense*, provient du laboratoire d'écologie microbienne de la rhizosphère (LEMIR-CNRS de NANCY-FRANCE) (HEULIN, 1983).

1.2. Matériel végétal

Deux variétés locales de blé dur ont été retenues pour étudier l'association plante -*Azospirillum*. Il s'agit de : *Triticum durum* var. Hedba 3 et *Triticum durum* var. Waha.

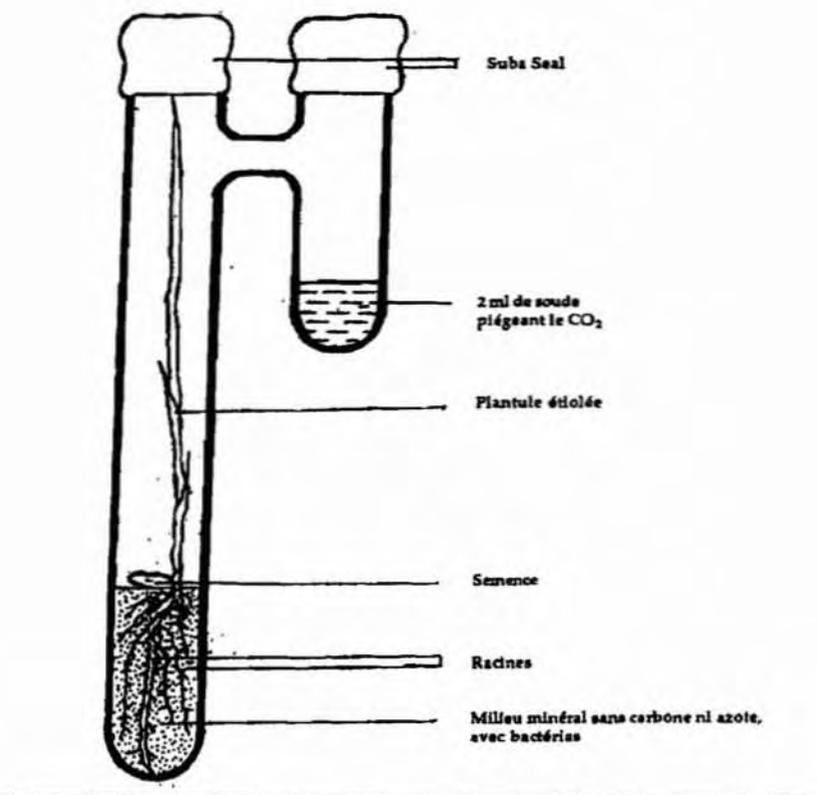
1.3. Mesure de l'activité nitrogénasique (Test ARA)

Nous avons fait germer, à l'obscurité et dans des tubes de PANKHURST (PANKHURST, 1967), renfermant au préalable 6 ml du milieu RCV (WEAVER et al., 1975), exempt de toute source de carbone et d'azote, une semence stérile de chacune des deux variétés de blé. Chaque plantule a été inoculée par 10^7 cellules bactériennes. Les tubes ainsi préparés sont incubés, sous 10% d'acétylène à 30°C. Dans ces conditions, les bactéries fixatrices d'azote se multiplient aux dépens des substrats carbonés exsudés par les racines des plantes. Ce dispositif de germination est appelé « **modèle spermosphère** » (Figure 1).

Les mesures d'ARA sont effectuées après 3 ; 5 ; 7 et 9 jours d'incubation. Chaque cultivar et/ou chaque souche a été caractérisé par la moyenne des vitesses maximales (V_{max}) de dégagement d'éthylène observé pour 20 répétitions.

2. Inoculation du blé dur par *Azospirillum*

Les résultats des comparaisons des V_{max} des couples « cultivar végétal- bactérie fixatrice d' N_2 » nous ont conduit à sélectionner la combinaison (*Azospirillum* X1F - blé dur var. Hedba 3) qui a montré une activité fixatrice maximale.



Tube de Pankhurst et modèle spermosphère. Une semence stérilisée en surface germe à l'obscurité. Une partie des produits d'hydrolyse des réserves de la graine est exsudée et sert de source de carbone et d'énergie aux bactéries fixatrices d'azote.

Figure1 : Schéma du modèle spermosphère

L'étude de l'inoculation du blé dur par *Azospirillum* (X1F) a été réalisée en pots, en présence de quatre niveaux de fertilisation azotée et sur sol de la station expérimentale (I.T.G.C.) d'Oued-Smar- Alger.

Deux types de traitements ont été réalisés :

- Le premier constitue le traitement inoculé : 50 graines de blé enrobées par *Azospirillum* ont été semées dans chaque pot.
- Le deuxième constitue le traitement non inoculé : 50 graines de blé enrobées par des bactéries mortes ont été semées par pot.

La bactérisation (ou enrobage) des graines a été réalisée à l'aide de la gomme arabique. Pour chacun des deux traitements, une fertilisation azotée est apportée sous forme d'ammonitrate, selon 4 modalités : 0 ; 40 ; 80 et 120 unités par hectare (uN/ha). De plus, tous les pots ont reçu une fumure de fond équivalente à 100 Kg/ha de P_2O_5 et de K_2O . Après avoir ajusté la densité du peuplement à 25 plantes/pot, nous avons réalisé une deuxième inoculation en appliquant sur chaque pied 0,1 ml d'inoculum contenant 10^5 bactéries. Les pots sont ensuite placés dans une serre selon un dispositif en randomisation totale. L'irrigation est maintenue à la satisfaction des besoins. Les deux facteurs étudiés (Azote et Inoculation) sont croisés en huit traitements différents. Chaque traitement est étudié avec un nombre de répétition égal à 5. La récolte a été réalisée au bout de 75 jours.

Les paramètres suivants : poids secs des feuilles et des racines ont été déterminés après passage à l'étuve 48 heures à 65°C. La longueur des feuilles du blé a été évaluée par la mesure de la distance entre le niveau du sol et l'extrémité des feuilles. Après séchage et découpage des plantes, le matériel sec est finement broyé puis une partie aliquotée est dosée. Les teneurs en azote des feuilles ont été déterminées par la méthode de Kjeldahl et celles du phosphore par la méthode au vanadate.

Le traitement des résultats a été effectué à l'aide d'une analyse de variance informatisée (test de Fisher), un calcul de la plus petite différence significative (ppds ou LSD) est effectuée pour comparer les traitements 2 à 2 (test de Newman-Keuls) lorsque le test de Fisher révèle un effet.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Comparaison des ARA des couples (blé - *Azospirillum*)

Bien que la souche SD3 présente une ARA notable, la souche X1F associée aux cultivars de blé (Hedba 3 et Waha) est la plus efficiente de point de vue ARA. Par ailleurs, on observe une activité nitrogénasique beaucoup plus importante dans le cas de l'*Azospirillum* X1F associée au cultivar Hedba 3; sa vitesse maximale de réduction d'acétylène est 132 nanomoles de C_2H_4 /jour/plante (Figure 2 et Figure 3).

2. Effet de l'inoculation du blé dur par *Azospirillum*

Il apparaît clairement des résultats de l'essai en pots que l'inoculation du blé (var. Hedba 3) par la souche d'*Azospirillum* (X1F) a entraîné des augmentations significatives de la longueur des feuilles (+12%), des poids de matière sèche foliaire (+28%) et des poids de matière sèche racinaire (+29%) (Tableau 1). On enregistre également des teneurs plus élevées en azote total et en phosphore des feuilles, respectivement de + 30% et de + 24%, dans le cas des plantes inoculées avec la souche X1F par rapport aux plantes témoins (Figure 4 et Figure 5). Par ailleurs, l'azote pris globalement, a un effet significatif. Cet effet est limité le plus souvent à l'apport des premières 40 uN/ha. Notons également que les apports de 40 et 80 unités d'N/ha et l'inoculation simultanée d'*Azospirillum* ont permis d'améliorer toutes les variables étudiées (Figure 6).

Des effets significatifs sur le développement des graminées ont été déjà signalés par plusieurs auteurs (RAI et GAUR, 1982; KAPULNIK et al., 1983; OMAR, 1987; BASHAN et LEVANONY, 1990; RAMDANI, 1998).

Le mécanisme exact du fonctionnement de l'association *Azospirillum*-blé n'est pas encore bien élucidé. C'est probablement la conjonction de tout un ensemble de phénomènes (fixation d'azote, effets des hormones bactériennes sur la croissance des végétaux, solubilisation de certains minéraux, compétition etc...) qui expliquent les effets observés (OKON et al., 1983; BODDEY et al., 1986; BASHAN et al., 1990). Les effets bénéfiques observés sur la plante font que *Azospirillum* est décrit comme une P.G.P.R. « Plant Growth Promoting-Rhizobacteria » c'est à dire une rhizobactérie améliorant la croissance des plantes (OMAR et al., 1989).

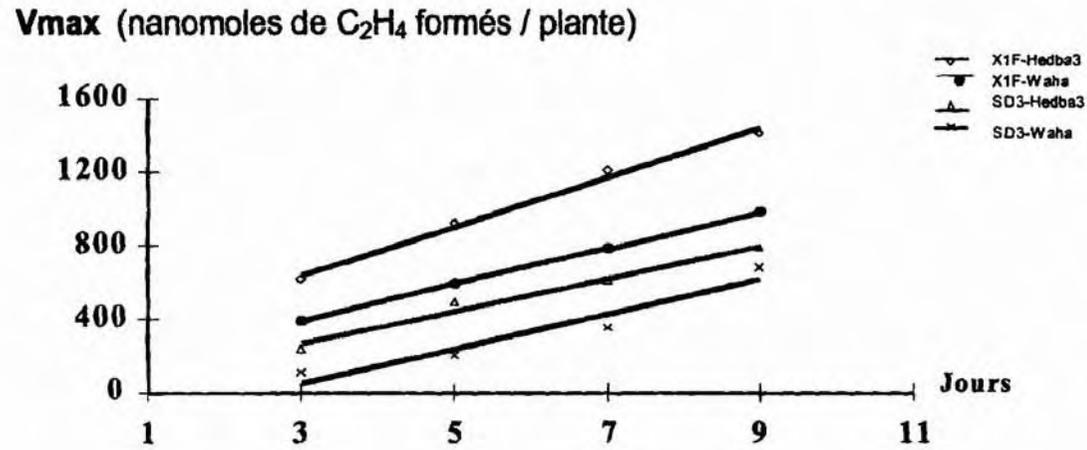


Figure 2 : Cinétiques de production de C₂H₄ des souches d'*Azospirillum* (X1F et SD3), associées aux cultivars de blé dur (*Triticum durum* var. Hedba 3 et var. Waha). Chaque point de la courbe représente la moyenne de 20 répétitions.

V_{max} (nanomoles de C₂H₄ formés/jour/plante)

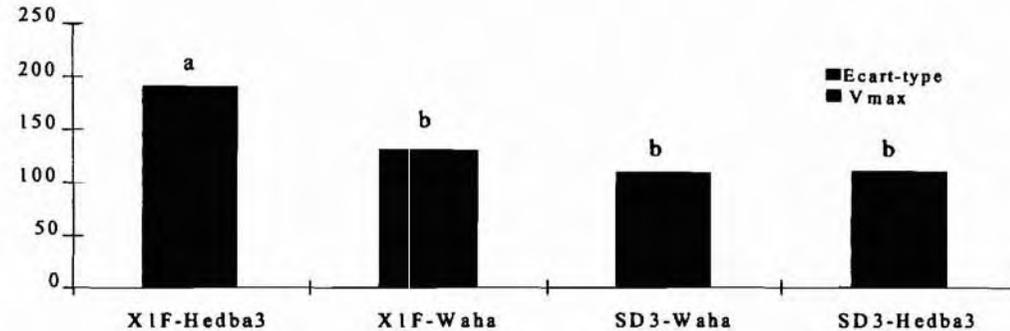


Figure 3 : Classement des V_{max} des souches d'*Azospirillum*- blé (X1F et SD3) associées aux cultivars de blé dur (*Triticum durum* var. Hedba3 et var. Waha). Chaque histogramme représente la moyenne ± écarts-type de 20 répétitions. S'ils portent les mêmes lettres, leurs moyennes ne sont pas significativement différentes (p < 0,05)

TABLEAU 1 : Effet de l'inoculation et de la fumure azotée sur la taille, les PMS foliaires et racinaires des plantes de blé (*Triticum durum* var. Hedba 3).

Doses d'azote (u/ha)	Longueur des feuilles (cm/plante)		PMS foliaire (mg/plante)		PMS racinaire (mg/plante)	
	Témoin	Inoculé	Témoin	Inoculé	Témoin	Inoculé
0	34*	43	72	98	19	24
40	42	45	82	91	24	27
80	45	45	76	95	17	23
120	39	47	53	79	08	14
Moyennes générales	40	45	70	90	17	22
IT (%)	12,5		28,3		29,4	

(*) : représente la moyenne de 5 répétitions ;
 I/T% : Gain dû à l'inoculation;
 PMS : Poids de matière sèche;

uN/ha : unité d'azote par hectare ;
 I : inoculé ;
 T : Témoin.

mg d’N / 100 g de PMS foliaire

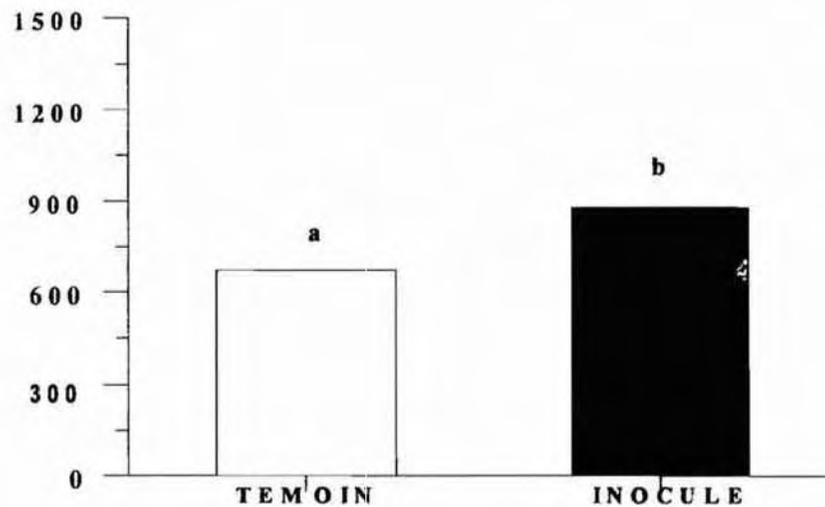


Figure 4 : Effet de l’inoculation, par *Azospirillum* (X1F), sur le contenu azoté des feuilles de blé dur (*Triticum durum* var. Hedba 3)

mg de P / 100 g de PMS foliaire

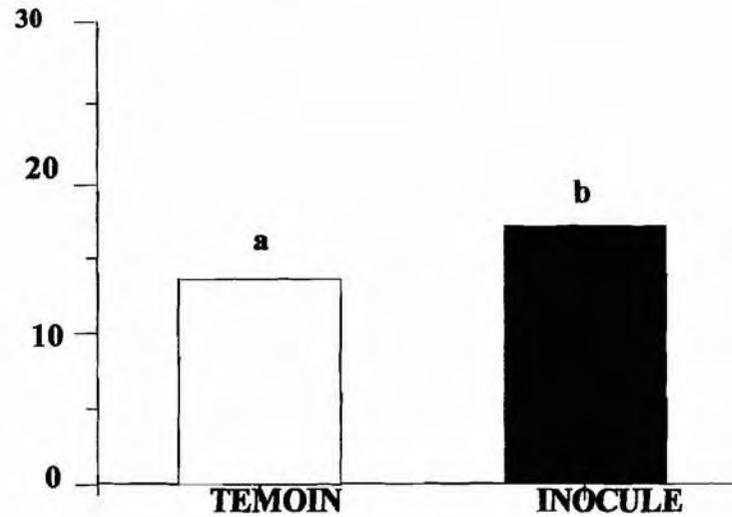


Figure 5 : Effet de l'inoculation, par *Azospirillum* (X1F), sur le contenu en phosphore des feuilles de blé dur (*Triticum durum* var. Hedba 3)

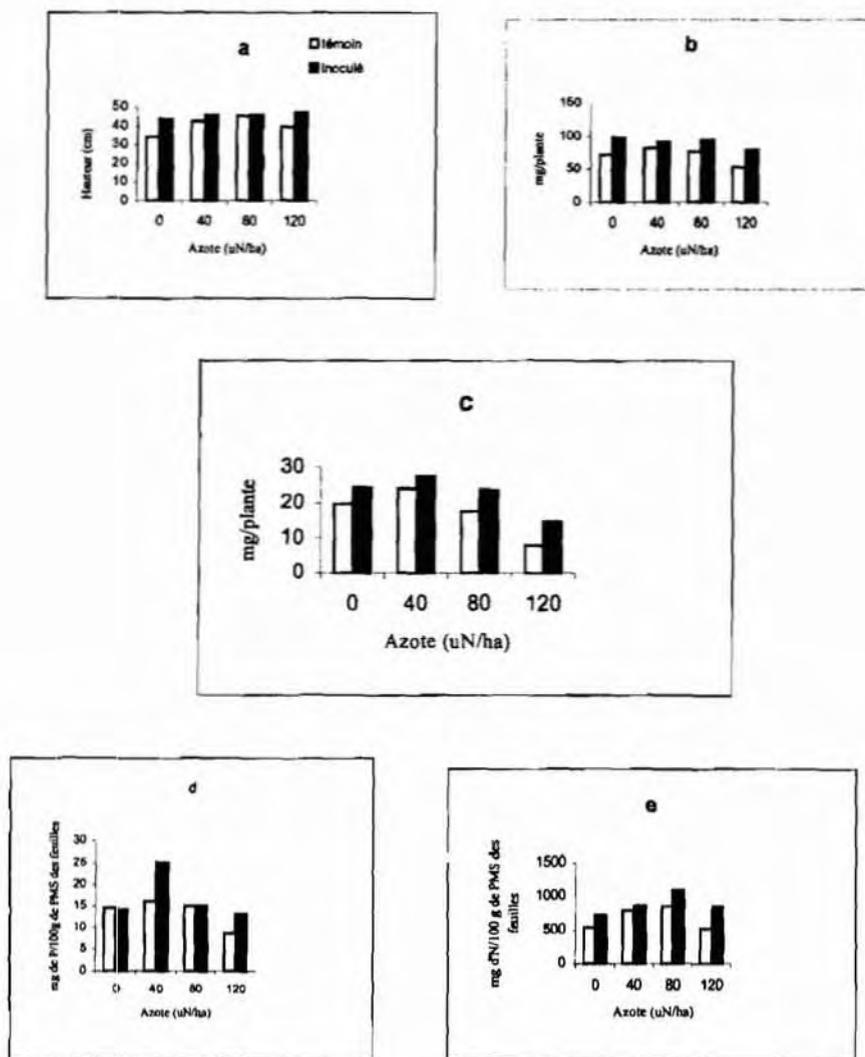


Figure 6 : Effet de l'inoculation par *Azospirillum* (X1F) et de la fertilisation azotée sur (a- Hauteur des tiges; b- Poids secs des feuilles; c- Poids secs des racines; d- Teneurs en phosphore des feuilles; e- Teneurs en azote des feuilles).

CONCLUSION

L'efficience des *Azospirillum* en présence de la plante en "modèle spermosphère", a été la base du choix de la souche à inoculer. Ainsi, la souche d'*Azospirillum* (X1F) apparaît très efficiente en présence de blé dur (*Triticum durum* var. Hedba 3).

Par ailleurs, l'essai conduit en pots a permis de mettre en évidence un effet très net de l'inoculation. Les effets observés sur la hauteur des feuilles, les poids de matière sèche foliaires et racinaires ainsi que les teneurs en N et P des plants de blé sont nettement modifiés par l'inoculation d'*Azospirillum*. En accord avec les données bibliographiques, les effets observés sur les plantes de blé, sont obtenus en absence ou en présence des doses moyennes de fertilisation azotée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BASHAN Y., HARRISON S.K. et 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. *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 769-775.

BODDEY R.M., BALDANI V.L., BALDANI J.I. et DÖBEREINER J., 1986.- Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field grown wheat. *Plant and Soil*, 95. pp. 109-121.

DÖBEREINER J. et DAY J.M., 1974.- Associative symbiosis in tropical grasses. Characterization of micro-organisms and N₂-fixing sites. *Proc. 1st Int. Symp. N₂-Fixation. Washington State University*.

HEULIN T., 1983.- Etude de quelques *Azospirillum* et de leurs effets spécifiques sur l'exsudation racinaire du riz. *Thèse de Doct.-Ingénieur en Sci. Agronomiques*. INPL-ENSAIA, Nancy I, 97 p.

KACI Y., 1987.- Dénombrement, isolement, purification et essai de caractérisation de quelques souches bactériennes fixatrices d'azote associées au blé dur. *Thèse de Magister*, ISN/USTHB, 87 p.

KAPULNIK Y., SARIG S., NUR I. et OKON Y., 1983.- Effect of *Azospirillum* inoculation on yield-grown wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 29: p. 895-899.

OKON Y., HEYTLER P.G. et HARDY R.W.F., 1983.- N₂-fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 694-697.

OMAR N., HEULIN T., WEINHARD P., ALAA EL DIN M.N. et BALANDREAU, J., 1989.- Field inoculation of rice with *in vitro* selected plant-growth promoting rhizobacteria. *Agronomie*. 9 :p. 803-808.

PANKHURST E.S., 1967. - A simple culture tube for anaerobic bacteria. *Lab.Prat.*, 16 : 58-59.

RAI S.N. et GAUR A.C., 1982.- Nitrogen fixation by *Azospirillum* ssp., and effect of *Azospirillum lipoferum* on the yield and N-uptake of wheat crop. *Plant and Soil.* 69: p.233-238.

RAMDANI N., 1998 .- Etude de quelques *Azospirillum* et effet de leur inoculation en pots chez le blé dur (*Triticum durum* var. Hedba 3). *Thèse de Magister, ISN / USTHB*, 118p.

THOMAS-BAUZON D., WEINHARD P., VILLECOURT P.et BALANDREAU J., 1982.- The spermosphere model. I- Its use in growing, counting, and isolation N₂ fixing, bacteria from the rhizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.* 28. p. 922-928.