

# Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc

Abdelaly Hilali, Danielle Prévost, William J. Broughton et Hani Antoun

**Résumé :** Cent souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ont été isolées à partir du blé cultivé en rotation avec le trèfle dans deux différentes régions du Maroc. Les isolats ont été d'abord criblés pour leur effet sur la croissance de la variété Rihane de blé cultivé dans un sol agricole sous conditions de serre. Après 5 semaines de croissance, 14 souches stimulant le rendement en matière fraîche ou en matière sèche des tiges ont été sélectionnées et utilisées dans un deuxième essai de croissance en pots en utilisant deux sols agricoles différents. Les résultats montrent que les souches ont eu un comportement différent selon le sol utilisé. Dans le sable loameux Rabat la souche IAT 168 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* semble avoir un bon potentiel comme rhizobactérie favorisant la croissance des plantes (RFCP) avec le blé. En effet dans ce sol, la souche IAT 168 a augmenté ( $P < 0,1$ ) le rendement de la matière sèche des tiges et le rendement en grains d'environ 24 % par rapport au témoin non inoculé. Dans l'argile limoneuse Merchouch aucune souche ne s'est comportée en RFCP, et 6 souches ont eu un effet délétère significatif ( $P < 0,05$ ) sur le rendement du blé. Ces observations indiquent qu'il est très important dans un système de rotation de choisir une souche de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* à la fois efficace avec le trèfle et RFCP avec le blé, afin d'éviter les effets délétères sur le rendement du blé.

**Mots clés :** bactéries délétères, RFCP (rhizobactéries favorisant la croissance des plantes), *Trifolium alexandrinum*, *Triticum aestivum*.

**Abstract:** One hundred strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* were isolated from roots of wheat cultivated in rotation with clover in two different regions of Morocco. The isolates were first screened for their effect on the growth of the cultivar Rihane of wheat cultivated in an agricultural soil under greenhouse conditions. After 5 weeks of growth, 14 strains stimulating the fresh or dry matter yield of shoots were selected and used in a second pot inoculation trial performed with two different agricultural soils. The results show that the strains behaved differently according to the soil used. In the loamy sand Rabat, strain IAT 168 behaved potentially like a plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), as indicated by the 24% increases ( $P < 0.1$ ) observed in wheat shoot dry matter and grain yields. In the silty clay Merchouch, no PGPR activity was observed, and 6 strains showed a significant deleterious effect on yields. These observations suggest that it is very important in a crop rotation system to choose a *R. leguminosarum* bv. *trifolii* strain that is effective with clover and shows PGPR activity with wheat to avoid deleterious effects on wheat yields.

**Key words:** deleterious bacteria, PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), *Trifolium alexandrinum*, *Triticum aestivum*.

La rhizosphère, zone du sol très riche en nutriments entourant la racine, est colonisée naturellement par plusieurs bactéries et champignons bénéfiques ou pathogènes qui peuvent avoir un impact considérable sur la croissance et le rendement des plantes. Les bactéries colonisatrices de la rhizosphère (rhizobactéries) ayant un effet bénéfique sur la

plante sont appelées rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (RFCP) (Kloepper et Schroth 1978). Le *Rhizobium* et le *Bradyrhizobium* sont des rhizobactéries bien connues pour leurs effets bénéfiques chez les légumineuses, qui résultent de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique. Cependant des études récentes ont révélé que ces

Reçu le 2 octobre 2000. Accepté le 7 mai 2001. Révision acceptée le 7 mai 2001. Publié sur le site Web des Presses scientifiques du CNRC le 13 juin, 2001.

**A. Hilali.**<sup>1</sup> Département des Sciences du Sol, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B. P. 6202 Rabat-Instituts, Maroc.

**D. Prévost.** Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de recherche et de développement sur les sols et les grandes cultures, 2560, Boulevard Hochelaga, Sainte-Foy, QC G1V 2J3, Canada.

**W.J. Broughton.** Laboratoire de Biologie Moléculaire des Plantes Supérieures, Université de Genève, 1, chemin de l'Impératrice, 1292 Chambésy, Genève, CH.

**H. Antoun.** Département des sols et de Génie Agroalimentaire, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Pavillon Charles-Eugène Marchand, Université Laval, QC G1K 7P4, Canada.

<sup>1</sup>Auteur correspondant (courriel : a.hilali@iav.ac.ma).

rhizobactéries symbiotiques possèdent toutes les caractéristiques recherchées chez une RFCP que l'on souhaite développer pour une plante non légumineuse. Plusieurs chercheurs ont montré que des souches de *Rhizobium* peuvent s'attacher, coloniser et survivre dans la rhizosphère des plantes non légumineuses (Terouchi et Syono 1990; Wiehe et Höflich 1995; Chabot et al. 1996b, 1998). Le *Rhizobium* peut aussi inhiber la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes (Antoun et al. 1978; Buonassisi et al. 1986; Ehteshamul-Haque et Gaffar 1993; Malajczuk et al. 1984), produire des phytohormones (Wang et al. 1982), dissoudre les phosphates insolubles dans les sols (Chabot et al. 1996a), ou produire du HCN (Antoun et al. 1998). Dans une étude d'inoculation du radis, faite avec 266 souches de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium*, Antoun et al. (1998) ont observé la présence de souches agissant comme RFCP chez chaque espèce étudiée. D'autre part, dans des essais au champ, la croissance chez le maïs et la laitue a été significativement stimulée par l'inoculation des semences avec des souches de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* qui solubilisent les phosphates inorganiques (Chabot et al. 1996a). En inoculant au champ le maïs et le blé de printemps avec la souche R39 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, Höflich et al. (1994) ont aussi observé une augmentation significative du rendement de la matière sèche de la partie aérienne des plantes variant de 7 à 8 %. Deux isolats endophytes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ont été isolés dans la région du Delta du Nil en Égypte où l'on cultive le riz en rotation avec le trèfle depuis l'antiquité (Yanni et al. 1997). L'inoculation du riz cultivé au champ avec ces isolats a augmenté de façon significative (41 à 45 %,  $P < 0,01$ ) le rendement en grain. L'objectif de ce travail était d'évaluer la possibilité de l'utilisation du *R. leguminosarum* bv. *trifolii* comme RFCP pour le blé cultivé en rotation avec le trèfle au Maroc.

Cent souches de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ont été obtenues à partir de la rhizosphère, du rhizoplan et de racines broyées du blé cultivé en rotation avec le trèfle dans deux différentes régions du Maroc : Gharb (argile limoneuse, pH 8,0; 1,01 % matière organique; 7 kg/ha de P et 285 kg/ha de K) et Benslimane (loam, pH 8,4; 0,95 % matière organique; 22 kg/ha de P et 265 kg/ha de K). L'isolement a été fait à partir de nodosités formées sur les racines de trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) âgé de 4 semaines et cultivé de façon aseptique dans des tubes (25 × 250 mm; diamètre × hauteur) contenant une solution nutritive gélosée dépourvue d'azote (Vincent 1970). Les plants de trèfle ont été inoculés au semis avec des aliquotes de 1 mL prises des dilutions obtenues avec les différentes parties des racines de blé.

Le criblage des isolats de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* pour leur effet RFCP chez le blé a été réalisé dans une première expérience en serre conduite comme suit. Un sol agricole de la région de Rabat (sable loameux, pH 6,6; 0,29 % matière organique; 14 kg/ha de P et 66 kg/ha de K) a été séché à l'air libre, tamisé à 2 mm et fertilisé avec la solution nutritive de Broughton et Dilworth (1971) additionnée de 0,05 % de  $KNO_3$ , puis mis en pot à raison de 3,5 kg de sol par pot. Cent-vingt graines de blé tendre (*Triticum aestivum* variété Rihane) ont été trempées pendant une nuit dans 12 mL d'une suspension de la souche à l'essai dans une solution 0,1 M de  $MgSO_4$ . Chaque pot reçoit 10 graines inoculées. Les pots ont ensuite été placés dans un abri serre

selon un dispositif en blocs aléatoires complets avec 12 répétitions. Après 1 semaine de croissance, quatre plants d'apparences uniformes ont été gardés par pot. La matière fraîche et la matière sèche des parties aériennes ont été déterminées après 5 semaines de croissance. Les 14 souches indiquant un bon potentiel RFCP ont été utilisées dans un deuxième essai en pots, conduits de la même manière.

Les deux sols agricoles Rabat et Merchouch (argile limoneuse, pH 6,4; 1,39 % matière organique; 37 kg/ha de P et 249 kg/ha de K) ont été utilisés, et les plants de blé ont été récoltés après 4 mois pour mesurer le rendement en grains et la biomasse des parties aériennes.

La production de sidérophores (Schwyn et Neilands 1987), de l'acide indolacétique (AIA) et de ses analogues (Bric et al. 1991), de cyanide (HCN) (Bakker et Schippers 1987) et la capacité de dissoudre le phosphate dicalcique (Golstein 1986) ont été testées chez les 14 souches sélectionnées suite au premier criblage.

Le premier essai en serre de criblage des 100 isolats de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* sur le sol Rabat a révélé l'existence de souches à effet délétère, neutre ou bénéfique. En se basant sur le rendement de la matière sèche des parties aériennes (MSPA), 79 % des souches semblent être délétères (26 souches de façon significative  $P < 0,05$ ) et 21 % des souches sont neutres ou montrent un certain potentiel RFCP. Le tableau 1 montre le potentiel RFCP des 14 souches retenues pour la poursuite des travaux. Seules les souches IAT 160 et 152 ont significativement ( $P < 0,05$ ) stimulé le rendement en matière fraîche des parties aériennes du blé âgé de 5 semaines. Les souches IAT 168 et 169 ont augmenté de façon significative ( $P < 0,05$ ) le rendement de la MSPA de 16 et 19 % respectivement, relativement au témoin non inoculé. Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues par de Freitas et Germida (1990) qui ont observé jusqu'à 32 % d'augmentation de la MSPA du cultivar Norstar de blé inoculé avec une souche RFCP de *Pseudomonas fluorescens* et cultivé durant 30 jours dans un sable sous conditions optimales dans une chambre de croissance. Les 4 souches montrant des effets significatifs sur le rendement ont été isolées à partir du rhizoplan (IAT 168 et 169) ou de la rhizosphère (IAT 160 et 152) du blé échantillonné dans le sol Gharb, qui est une argile limoneuse plus riche en matière organique et en K que le sol Rabat utilisé pour le criblage.

Les tests in vitro des caractéristiques associées à l'activité RFCP des 14 souches sélectionnées de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ont révélé que toutes les souches produisent des sidérophores, que deux (IAT 152 et 178) ont la capacité de dissoudre les phosphates inorganiques et qu'aucune souche ne produit ni de phytohormones ni du HCN. Antoun et al. (1998) ont montré aussi que, sur 266 souches de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* étudiées, un grand pourcentage (83 %) produisait des sidérophores, alors qu'un faible pourcentage (3 %) produisait du HCN.

Les résultats du deuxième essai en serre ont montré que l'effet stimulant semble surtout s'exprimer dans le sable loameux Rabat (tableau 2). En effet dans ce sol les 3 souches IAT 168, 169 et 178 ont tendance à stimuler le rendement en MSPA du blé avec des augmentations variant de 23 à 25 % ( $P < 0,1$ ). La souche IAT 168 montre aussi un bon potentiel de stimulation du rendement en grain avec 25 % d'augmentation ( $P < 0,1$ ) par rapport au témoin non

**Tableau 1.** Origine et performance des souches de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* sélectionnées dans le premier essai en serre.

Souches	Partie aérienne, variation par rapport au témoin non inoculé (%)		Source d'isolement des souches chez le blé
	Matière fraîche	Matière sèche	
IAT 178	+9,58	+9,37	Racines broyées*
IAT 168	+9,58	+15,62 <sup>a</sup>	Rhizoplan*
IAT 169	+8,75	+18,75 <sup>a</sup>	Rhizoplan*
IAT 171	-1,25	+9,37	Racines broyées*
IAT 26	+10,00	0,00	Racines broyées*
IAT 45	+3,75	+6,25	Rhizoplan*
IAT 132	+12,08	+6,25	Rhizoplan†
IAT 60	+10,83	+6,25	Racines broyées*
IAT 157	+5,41	+6,25	Rhizosphère*
IAT 139	+7,50	0,00	Rhizoplan†
IAT 159	+5,00	-3,12	Rhizosphère*
IAT 160	+14,16 <sup>a</sup>	+6,25	Rhizosphère*
IAT 162	+2,5	+12,5	Rhizoplan*
IAT 152	+15,41 <sup>a</sup>	+6,25	Rhizosphère*
<b>Rendement du témoin non inoculé (g/pot)</b>			
	24	3,2	

**Nota :** La lettre *a* indique des valeurs significativement différentes de celles du témoin non inoculé aux niveaux de probabilité de 5 % selon le test du LSD (« least significant difference ») protégé de Fisher.

\*Blé récolté dans l'argile limoneuse Gharb.

†Blé récolté dans le loam Benslimane.

**Tableau 2.** Rendement en matière sèche des parties aériennes et en grains de la variété Rihane du blé inoculée avec les souches sélectionnées de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

Sol de Rabat				Sol de Merchouch			
Souches	Rendement en matière sèche (g/pot)	Souche	Rendement en grain (g/pot)	Souches	Rendement en matière sèche (g/pot)	Souche	Rendement en grain (g/pot)
IAT 178	12,4 <sup>b</sup>	IAT 168	5,9 <sup>b</sup>	IAT 178	17,3	IAT 178	8,1
IAT 168	12,3 <sup>b</sup>	IAT 169	5,7	IAT 139	17,0	Témoin	7,7
IAT 169	12,3 <sup>b</sup>	IAT 178	5,6	IAT 60	17,0	IAT 139	7,4
IAT 171	11,8	IAT 171	5,6	Témoin	17,0	IAT 60	7,2
IAT 26	11,1	IAT 26	5,2	IAT 168	15,1	IAT 26	7,1
IAT 45	10,9	IAT 60	5,0	IAT 132	14,9	IAT 152	7,0
IAT 132	10,6	IAT 132	4,8	IAT 26	14,5	IAT 168	6,9
IAT 60	10,5	Témoin	4,8	IAT 152	13,4	IAT 132	6,8
IAT 157	10,1	IAT 139	4,7	IAT 45	13,4	IAT 45	6,3
Témoin	9,9	IAT 159	4,5	IAT 157	11,6 <sup>a</sup>	IAT 157	5,1 <sup>a</sup>
IAT 139	9,8	IAT 45	4,5	IAT 169	11,1 <sup>a</sup>	IAT 171	4,4 <sup>a</sup>
IAT 159	9,4	IAT 160	4,5	IAT 171	9,5 <sup>a</sup>	IAT 169	4,3 <sup>a</sup>
IAT 160	9,3	IAT 157	4,3	IAT 159	7,9 <sup>a</sup>	IAT 159	3,4 <sup>a</sup>
IAT 162	8,8	IAT 162	4,2	IAT 160	7,3 <sup>a</sup>	IAT 160	2,9 <sup>a</sup>
IAT 152	8,2	IAT 152	3,6 <sup>b</sup>	IAT 162	6,1 <sup>a</sup>	IAT 162	2,4 <sup>a</sup>

**Nota :** Les lettres *a* et *b* indiquent des valeurs significativement différentes de celles du témoin non inoculé aux niveaux de probabilité de 5 et 10 % selon le test du LSD protégé de Fisher.

inoculé (tableau 2). Dans l'argile limoneuse Merchouch, aucune souche n'a montré d'effet RFCP significatif. Par contre, 6 souches ont eu un effet délétère significatif ( $P < 0,05$ ) sur le rendement en MSPA et en grain du blé. Plusieurs travaux suggèrent que le blé soit particulièrement sensible à la présence de bactéries délétères (p. ex., de Freitas et Germida 1990). Il est intéressant de noter que le comportement des 14 souches retenues lors du premier

criblage sur le sol Rabat tend à se refléter sur le deuxième essai effectué sur le même sol. En effet la corrélation observée ( $r = 0,48$ ) entre le rendement de la MSPA obtenu avec le blé âgé de 5 semaines lors du premier criblage et celui de la MSPA obtenu avec le blé âgé de 4 mois dans le deuxième essai sur le sol Rabat est significatif à un niveau de probabilité de 10 %. Une corrélation semblable est obtenue avec le rendement en grain ( $r = 0,44$ ). Par contre

aucune corrélation significative n'est observée entre le premier criblage et le deuxième essai sur le sol Merchouch, relativement plus riche. Il est donc possible que le premier criblage ait sélectionné des souches compétitives en sable loameux relativement pauvre, mais peu compétitives dans une argile limoneuse plus riche. Ce phénomène pourrait être exclusif aux organismes fixateurs d'azote. En effet, de Freitas et Germida (1990) ont observé que l'activité RFCP des souches ATCC 9043 d'*Azotobacter chroococcum* et ATCC 29729 d'*Azospirillum brasilense* chez le blé était beaucoup plus marquée dans le sable Choiceland relativement pauvre que dans le loam sableux Asquith qui est un mollisol plus riche. Les autres isolats RFCP appartenant surtout au genre *Pseudomonas* ont eu un comportement identique sur les deux sols utilisés. Des études de colonisation des racines par les souches de *Rhizobium* choisies permettront d'élucider les différences de comportement observées.

En conclusion, ce travail souligne l'importance du choix de la souche de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* qui sera utilisée dans un système de rotation blé-trèfle surtout pour éviter les effets délétères observés. Idéalement, il faudrait utiliser une souche très efficace avec le trèfle et montrant un bon comportement RFCP avec le blé.

## Remerciements

Ce travail a été réalisé avec l'appui du Fonds international de coopération universitaire-FICU (AUPELF-UREF, Agence universitaire de la Francophonie). Nos remerciements vont également à Marie-Hélène Charest pour son aide dans l'analyse in vitro des caractéristiques liées à l'activité RFCP.

## Références

- Antoun, H., Bordeleau, L.M., et Gagnon, C. 1978. Antagonisme entre le *Rhizobium meliloti* et le *Fusarium oxysporum* en relation avec l'efficacité symbiotique. *Can. J. Plant Sci.* **58** : 75–78.
- Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R., et Lalande, R. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil*, **204** : 57–67.
- Bakker, A.W., et Schippers, M. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.* **19** : 451–457.
- Bric, J.M., Bostock, R.M., et Silverstone, S.E. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 535–538.
- Broughton, W.J., et Dilworth, M.J. 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.* **125** : 1075–1080.
- Buonassisi, A.J., Copeman, R.J., Pepin, H.S., et Eaton, G.W. 1986. Effect of *Rhizobium* spp. on *Fusarium* f.sp. *phaseoli*. *Can. J. Plant Pathol.* **8** : 140–146.
- Chabot, R., Antoun, H., et Cescas, M.P. 1996a. Growth promotion maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant Soil*, **184** : 311–321.
- Chabot, R., Antoun, H., Kloepper, J.W., et Beauchamp, C.J. 1996b. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 2767–2772.
- Chabot, R., Beauchamp, C.J., Kloepper, J.W., et Antoun, H. 1998. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Soil Biol. Biochem.* **30** : 1615–1618.
- de Freitas, J.R., et Germida, J.J. 1990. Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Can. J. Microbiol.* **36** : 265–272.
- Ehteshamul-Haque, S., et Gaffar, A. 1993. Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra, soybean, and mungbean. *J. Phytopathol.* **138** : 157–163.
- Golstein, A.H. 1986. Bacterial solubilisation of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* **1** : 51–57.
- Höflich, G., Wiehe, W., et Kühn, G. 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia*, **50** : 897–905.
- Kloepper, J.W., et Schroth, M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Dans Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Vol. 2. Institut national de la recherche agronomique (INRA), Angers, France. pp. 879–882.
- Malajczuk, N., Pearse, M., et Litchfield, R.T. 1984. Interactions between *Phytophthora cinnamoni* and *Rhizobium* isolates. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **82** : 491–500.
- Schwyn, B., et Neillands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160** : 47–56.
- Terouchi, N., et Syono, K. 1990. *Rhizobium* attachment and curling in asparagus, rice and oat plant. *Plant Cell Physiol.* **31** : 119–127.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP No. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wang, T.L., Wood, E.A., et Brewin, N.J. 1982. Growth regulators, *Rhizobium* and nodulation in peas. Indole-3-acetic acid from the culture medium of nodulating and non-nodulating strains of *R. leguminosarum*. *Planta*, **155** : 343–349.
- Wiehe, W., et Hoflich, G. 1995. Survival of plant growth promoting rhizosphere bacteria in the rhizosphere of different crops and migration to non-inoculated plants under field conditions in north-east Germany. *Microbiol. Res.* **150** : 201–206.
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., Philip-Hollingsworth, S., Orgambide, G., de Bruijn, F., Stoltzfus, J., Buckley, D., Schmidt, T.M., Mateos, P.F., Ladha, J.K., et Dazzo, F.B. 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil*, **194** : 99–114.