



المعهد الوطني للبحث الزراعي
Institut National de la Recherche Agronomique

PROJET DE FIN D'ÉTUDES
PRESENTÉ EN VUE D'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER SCIENCES ET TECHNIQUES
GESTION ET CONSERVATION DE LA BIODIVERSITE

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES
BACTERIES PGPR DU FRAISIER (*Fragaria ananassa*)

Présenté par : IZEM Badr

Encadré par : Pr. BEKHTI Khadija

Dr. HAMIM Ahlam

Soutenu le : 18/07/2022

Devant le jury composé de :

- Pr. BAHAFID Wifak**
- Pr. HALOTI Said**
- Pr. FADIL Fatima**
- Pr. BEKHTI Khadija**
- Dr. HAMIM Ahlam**

Année universitaire : 2021/2022

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de l'institut national de la recherche agronomique de Tanger sous la direction de **Dr. Hamim Ahlam**, responsable du laboratoire et sous l'encadrement pédagogique du **Pr Bekhti Khadija** de la FST de Fès. Ce travail est un projet de fin d'étude il est effectué dans le but d'obtenir un master Gestion et Conservation de la Biodiversité de la faculté des sciences et techniques de Fès.

DEDICACES

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail à :

Mes très chers parents pour leur soutien et leurs sacrifices consentis.

Aucune dédicace ne serait exprimée la reconnaissance, le respect et l'estime. Que dieu vous donne bonne santé et longue vie.

À mes chers frères et sœurs pour leur véritable et sincère amour.

Tous mes amis et collègues et particulièrement les plus intimes Je leur souhaite une vie pleine de succès et de bonheur.

À mes formateurs Qui m'ont dirigé vers le chemin du succès par leur compréhension et leurs conseils.

REMERCIEMENTS

On ne saurait entamer ce rapport sans remercier **ALLAH** le Tout Puissant, le très Miséricordieux, qui nous a donné grâce et bénédiction pour mener à terme ce projet.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à Madame le professeur **Bekhti Khadija** pour son intérêt, sa serviabilité et son suivi pendant l'élaboration de mon projet, ainsi que son assistance pour la rédaction du rapport.

Je remercie spécialement **Dr. Hamim Ahlam** pour son encadrement fructueux, son aide, ses conseils et sa disponibilité lors de la réalisation de ce travail.

Aussi bien, je remercie les honorables **membres de jury**, Mr **Haloti Said** et Mme **Fadil Fatima** et Mme **Bahafid Wifak** d'avoir eu l'amabilité d'accepter d'évaluer et de juger ce travail et **tous mes professeurs de la FST**.

Je remercie également Mme **Imane Saibari** pour ses encouragements et ses soutiens et pour ses valeureux conseils.

Je tiens aussi à remercier ma collègue **El Mezdeghi Basma** d'avoir pris le temps de m'aider dans mon projet de fin d'étude.

Enfin, que tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail trouvent l'expression de nos remerciements les plus chaleureux.

Liste des figures

Figure 1: Le mode d'action des rhizobactéries pour favoriser la croissance des plantes ..	7
Figure 2: Interactions entre plantes et bactéries coopératives dans la rhizosphère	8
Figure 3: Rôle d'AIA dans la promotion de la croissance des plantes	12
Figure 4: Evolution des exportations marocaines de la fraise jusqu'au 2019.....	15
Figure 5: Schéma de l'appareil végétatif du fraisier	16
Figure 6: les échantillons du sol conservés dans des sacs	22
Figure 7: quelques isolats bactériens	27
Figure 8: Test qualitatif de solubilisation de phosphate tricalcique sur milieu PVK	29
Figure 9: Test qualitatif de production d'HCN par les rhizobactéries	30
Figure 10 : Production qualitatif de l'AIA par les isolats traités	32
Figure 11 : Production quantitative de l'AIA par les isolats.....	33

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification du fraisier.....	16
Tableau 2 : Résultats de Test de solubilisation de phosphate tricalcique	28
Tableau 3: Résultats de production de l'HCN par les isolats testés	31

Liste des abréviations

ABA : Acide abscissique

ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase

AIA : Acide indole acétique

COMADER : Confédération Marocaine De L'Agriculture Et Du Développement Rural

Cm : centimètre

HCN : Acide Cyanhydrique

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

Gr : Grossissement

Kg/m² : Kilogramme par mètre carré

g/L : gramme par litre

LB : Luria Bertani

M : Mole

Mm : Millimètre

P : Phosphore

PGPR : Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes

PSB : Bactéries solubilisant le phosphore

PPC : Photopériode critique

Plants/ha : Plants par hectare

PVK : Pikovskaya

RC : Rose clair

RF : Rose foncé

TCP : Phosphate tricalcique

Tm : Témoin

Rpm : rotation par minute

µl: microlitre

µg : microgramme

RESUME

L'utilisation des PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) s'est avérée être un moyen écologique d'augmenter les rendements des cultures en facilitant la croissance des plantes par des mécanismes directs ou indirects.

Elles offrent des applications intéressantes en agriculture comme la bio-fertilisation et la lutte biologique ainsi que d'autres applications environnementales, leur exploitation est donc une alternative prometteuse pour réduire les intrants chimiques vu les différents effets néfastes de ces derniers. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés de caractériser 75 isolats bactériens à partir du sol rhizosphérique de la fraise récoltés à partir de trois sites différents : Témoin, rose clair, et rose foncé de la région de Larache. La caractérisation phénotypique a montré que la plupart des isolats sont des bactéries à Gram- de forme (Cocci, Cocci en amas), spécifiquement ceux du site rose foncé. L'évaluation du potentiel PGPR des bactéries (phytostimulation, bio-fertilisation et biocontrôle), a montré que 100% des bactéries traitées sont capables de produire l'auxine à différentes concentrations. Parmi les soixante-quinze isolats étudiés, 47 isolats (63%) sont capables de solubiliser le phosphate tricalcique sur milieu PVK solide, avec des diamètres d'halo compris entre 0,1 et 1,5cm. De plus, pour évaluer leur effet de biocontrôle, 29% des bactéries ont été capables de produire, à différents niveaux, l'acide cyanhydrique en présence de glycine.

En somme, les bactéries issues du site rose foncé semblent être les meilleures vu leurs performances par rapport aux bactéries d'autres sites.

Mots clés : PGPR, PSB, Rhizosphère, activité PGPR, isolats, fraisier.

ABSTRACT

The use of PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) has proven to be an ecological way to increase crop yields by facilitating plant growth through direct or indirect mechanisms. They offer interesting applications in agriculture such as bio-fertilization and biological control as well as other environmental applications, their exploitation is therefore a promising alternative to reduce chemical inputs given the various adverse effects of the latter. It is in this context that we were interested in characterizing 75 bacterial isolates from strawberry rhizosphere soil collected from three different sites : Control, light pink, and dark pink from the Larache region. Phenotypic characterization showed that most of the isolates were Gram-form bacteria (Cocci, Cocci in clusters), specifically those from the dark pink site. Evaluation of the PGPR potential of the bacteria (phytostimulation, biofertilization and biocontrol), showed that 100% of the treated bacteria are able to produce auxin at different concentrations. Among the seventy-five isolates studied, 47 isolates (63%) are able to solubilize tricalcium phosphate on solid PVK medium, with halo diameters ranging from 0.1 to 1.5cm. Furthermore, to evaluate their biocontrol effect, 29% of the bacteria were able to produce, at different levels, hydrocyanic acid in the presence of glycine.

In sum, the bacteria from the dark pink site seem to be the best in terms of performance compared to the bacteria from other sites.

Key words : PGPR, PSB, Rhizosphere, PGPR activity, isolates, strawberry.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
I. Partie REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I.1 Rhizosphère	4
I.1.1 Définition du sol	4
I.1.2 Définition de la rhizosphère	4
I.1.3 Les rhizobactéries promotrices	5
I.1.4 Rôle de la rhizosphère	5
I.1.5 Les interactions dans la rhizosphère	6
I.1.5.1 Interactions entre les microorganismes	6
I.1.5.2 Interactions plantes- microorganismes	6
I.1.6 Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR).....	7
I.1.7 Effet des PGPR	8
I.1.8 Modes d'action directs des bactéries PGPR.....	9
I.1.8.1 Amélioration de la disponibilité de Phosphore	9
I.1.8.2 Effet des bactéries solubilisant le phosphate (PSB)	10
I.1.8.3 Production des hormones de croissance	10
I.1.9 Modes d'action indirects des PGPR.....	12
I.1.9.1 Production d'acide cyanhydrique	12
I.2 Généralités sur la fraise	13
I.2.1 Importance de la culture au Maroc.....	14
I.2.1.1 Importance socio-économique	14
I.2.1.2 Evolution des exportations	14
I.2.1.3 Impact de la pandémie sur l'exportation marocaine	15
I.2.2 Description botanique.....	15
I.2.3 Classification botanique	16
I.2.4 Différents types de fraisier	16
I.2.5 Multiplication végétative du fraisier	17
I.2.6 Exigences agro-climatiques	17
I.2.7 Importance nutritionnelle	19
I.2.8 Effet des bactéries PGPR sur la croissance de la fraise	19
II . Partie MATERIEL ET METHODES.....	21
II.1 Matériel végétal et conservation des échantillons	22
II.2 Méthodes.....	22
II.2.1 Isolement des bactéries du sol.....	22

II.2.1.1 Préparation des dilutions et mise en culture	22
II.2.1.2 Conservation des souches.....	22
II.2.2 Identification macroscopique et microscopique.....	23
II.2.2.1 Identification macroscopique	23
II.2.2.2 Identification microscopique.....	23
II.2.3 Mesure des activités promotrices de la croissance végétale.....	24
II.2.3.1 Test de solubilisation du phosphore	24
II.2.3.2 Production d'acide cyanhydrique (HCN).....	24
II.2.3.3 Production de l'acide indole acétique	25
III . Partie RESULTATS ET DISCUSSION.....	26
III.1 Caractérisation phénotypique des isolats.....	27
III.1.1 Isolement et purification des bactéries à partir de la rhizosphère de la fraise.....	27
III.1.2 Caractérisation macroscopique et microscopique.....	27
III.2 Mesure des activités promotrices de la croissance végétale.....	27
III.2.1 Solubilisation des phosphates	27
III.2.2 Production de l'acide cyanhydrique	30
III.2.3 Production de l'acide indole acétique.....	32
CONCLUSION.....	34

Introduction

La fraise (*Fragaria × ananassa Duch.*) étant l'une des espèces les plus importantes parmi les baies et sa culture gagne en popularité en tant que culture fruitière économique très appréciée. Au Maroc, la production de la fraise est localisée dans la région du Gharb et le Loukkos (Nord-ouest). La demande croissante de production végétale avec une réduction significative de l'utilisation d'engrais chimiques synthétiques et de pesticides est un grand défi de nos jours. De plus, l'un des problèmes les plus fréquemment rencontrés à l'échelle national, est la faible disponibilité du phosphore(P) pour les plantes, qui est l'un des constituants essentiels pour la plante. Cette faible disponibilité est due au fait que la grande majorité de P présent dans le sol se trouve sous des formes insolubles, tandis que les plantes ne peuvent l'absorber que sous deux formes solubles : ions monobasiques ($\text{H}_2\text{O}_4\text{P}^-$) et dibasiques (HPO_4^{2-}). Outre, la conversion de la forme gazeuse de l'azote sous une forme assimilable pour la plante. De plus, l'attaque du fraisier par l'agent pathogène *Botrytis cinerea* provoquant des maladies de la pourriture grise.

Afin de répondre aux critères de production durable de fruits, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont utilisées comme biofertilisants à la place des produits chimiques synthétiques, qui améliorent la croissance des plantes grâce à l'apport d'éléments nutritifs pour les plantes et peuvent aider à maintenir la santé de l'environnement et la productivité des sols. Ces derniers font partie de type de microorganismes, qu'ils n'établissent pas une relation de symbiose mutualiste, mais favorisent la croissance des plantes auxquelles elles sont associées. La sélection d'une souche PGPR efficace est liée à la caractérisation de ses propriétés favorisant la croissance végétale comme : la solubilisation du phosphate, la production de sidérophores et de phytohormones, la capacité à fixer l'azote, et la lutte biologique contre les maladies des plantes.

Ces bactéries sont capables de faciliter la croissance des plantes directement en aidant à l'acquisition des ressources (azote, phosphore et minéraux essentiels) ou par modulation des niveaux d'hormone végétales, ou indirecte par production des antibiotiques ou par induction de système de résistance et production des acides cyanhydriques. Cependant, le mode d'action des PGPR diffère, toutes les rhizobactéries ne possèdent pas les mêmes mécanismes ce qui poussent les scientifiques à être en perpétuelles recherche de PGPR.

C'est dans ce contexte que notre étude s'insinue, elle a pour objectif générale d'isoler et de caractériser les rhizobactéries à partir des échantillons du sol du fraisier collectés auprès du domaine de Larache (Maroc).

Pour ce faire notre mémoire s'organise autour d'une partie I de revue bibliographique où l'essentiel concernant la rhizosphère, le fraisier et les PGPR est documenté, une partie II où le matériel et les méthodes de l'étude sont exposés, les résultats sont révélés dans la partie III et discutés. A la fin dans la conclusion sont exprimé les éventuelles perspectives de cette étude.

I. Partie REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Rhizosphère

I.1.1 Définition du sol

Le sol, ou encore « épiderme vivant de la terre » est la couche supérieure de la croûte terrestre, composée de matière minérale, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes. Il n'est qu'une infime pellicule à la surface de la croûte terrestre où s'ancrent les racines des plantes pour puiser l'eau et les éléments minéraux nécessaires à la croissance végétale. Il dispose de son atmosphère interne, ainsi que d'une flore et d'une faune spécifiques. Les micro-organismes présents dans le sol sont impliqués dans le recyclage de nombreux éléments chimiques (carbone, azote, phosphore, soufre, fer, et autres). Il s'agit surtout de ceux impliqués dans la formation et la dégradation de l'humus. Ainsi que ceux jouant un rôle important dans la solubilisation des composants organiques et inorganiques inaccessibles aux plantes.(Arif, 2015; Ladjabi, 2019).

I.1.2 Définition de la rhizosphère

La rhizosphère comprend la région du sol liée aux racines des plantes, prolongeant souvent quelques mm de la surface de la racine. Cette région du sol est beaucoup plus riche en bactéries que le reste du sol (Achkouk, 2016). C'est un environnement écologique dynamique où les microorganismes et les plantes interagissent pour l'exploitation des micros et macronutriments du sol présent en quantité limitées affectant ainsi la croissance des plantes. Dans le sol, les bactéries sont souvent limitées par l'énergie, et par conséquent, les exsudats racinaires qui renferment une grande quantité d'acides organiques, de sucres, d'acides aminés, de régulateurs de croissance ainsi que des enzymes fournissent aux bactéries de l'énergie stimulant leur croissance et leurs activités métaboliques qui à leur tour influencent les cycles biogéochimiques des nutriments dans les sols, ce qui rend ce micro-environnement un endroit d'une remarquable activité biologique et d'une richesse naturelle en vers de terre, nématodes, protozoaires, champignons, algues et bactéries.(Bakkali Bouarrakia, 2018)

Ces êtres vivants sont impliqués dans le processus de la décomposition et le recyclage des nutriments dans la rhizosphère. Par ailleurs, la communauté microbienne joue un rôle notable dans l'amélioration et la stabilisation de la structure du sol ainsi que dans l'état de santé des plantes. La rhizosphère varie en taille de à quelques millimètres de la surface des racines, où les nutriments solubles tels que les nitrates et les composés volatils sont impliqués, à moins d'un mm, et lorsque des nutriments non mobiles tels que le phosphate sont présents. Dans le sol, les bactéries sont les organismes les plus variés et les plus nombreux, leur densité est de

l'ordre de 10⁹ UFC par gramme du sol. Cependant, la densité des populations de la microflore associées aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu. (Ladjabi, 2019)

I.1.3 Les rhizobactéries promotrices

Par rapport aux racines, la rhizosphère peut être divisée en trois zones distinctes :

- La rhizosphère est la zone de sol influencée par les racines grâce à la libération de substrats affectant l'activité microbienne.
- Le rhizoplan est la surface de la racine, comprenant les particules de sol adhérant fortement.
- La racine est elle-même une partie du système, car certains micro-organismes endophytes sont capables de coloniser les tissus des racines internes.

Par leur activité et leurs exsudats, les racines sont qualifiées de « ingénieurs biologiques du sol ». Elles permettent le maintien des communautés microbiennes. (Arif, 2015)

La plante va donc libérer au sein de la rhizosphère divers éléments carbonés, dont les photosynthétats, regroupés sous le terme de rhizodépôts. Les rhizodépôts sont composés des exsudats racinaires (ou photosynthétats : sucres, acides aminés, acides organiques, hormones, vitamines), de sécrétions de mucilage (sucres polymérisés, enzymes) et de cellules sénescents (cellules de la coiffe racinaire, cellules corticales et épidermiques), puis de l'ensemble de la racine à la mort de la plante. (Ladjabi, 2019)

I.1.4 Rôle de la rhizosphère

La rhizosphère, C'est la zone de vie, où les exsudats racinaires, d'une part, permettent le développement d'une faune et d'une flore spécifiques et d'autre part, permettent le développement d'une flore symbiotique qui assure une bonne croissance aux plantes, en produisant de substances organiques carbonées et azotées (polysaccharides, acides organiques et protéines) bénéfiques à la croissance comme les phytohormones et les antibiotiques assurant la protection contre des phytopathogènes (Ladjabi, 2019). Ces exsudats favorisent le développement de la microflore pathogène ou non. Ainsi, en réponse à l'apport énergétique représenté par les exsudats racinaires, des propagules fongiques se développent de façon saprophytique jusqu'à la racine qu'elles peuvent infecter et éventuellement parasiter. De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines : il s'agit de « l'effet rhizosphère ». La quantité et la composition des exsudats racinaires conditionnent également la nature des activités bactériennes. Ces activités résultent

de la synthèse de métabolites tels que les sidérophores, antibiotiques, substances de croissance, acide cyanhydrique, lipopolysaccharides.(Abdesselam et Latache, 2017)

En général, c'est une niche écologique qui éveille et stimule diverses activités microbiennes, en participant ainsi, au fonctionnement des cycles des nutriments majeurs et des oligoéléments comme le carbone, l'azote, le phosphore, le fer, etc.(Ladjabi, 2019)

I.1.5 Les interactions dans la rhizosphère

Il existe différentes interactions dans la rhizosphère. Les processus racinaires impliqués dans ces interactions sont entre autres la rhizo-décomposition, la respiration de la racine, l'absorption d'eau et des nutriments. (Ladjabi, 2019)

I.1.5.1 Interactions entre les microorganismes

Il existe une multitude d'interactions non génétiques entre les microorganismes, en particulier les bactéries y sont fréquemment impliquées notamment au niveau de la rhizosphère. Ces interactions sont souvent nutritionnelles pour assurer leur survie. Un substrat peut être une source de nutrition, d'où les microorganismes sont en compétition à le consommer. Dans d'autres cas, un microorganisme peut exercer un effet nuisible sur les autres microorganismes, par exemple par la production d'antibiotiques ou de composés toxiques. Les interactions entre populations microbiennes peuvent être reconnues comme des interactions négatives (compétition, amensalisme), positives (commensalisme, synergie et mutualisme), ou positives pour l'un et négatives pour l'autre population (parasitisme ou prédation).(Ladjabi, 2019)

I.1.5.2 Interactions plantes- microorganismes

L'existence de tout groupe microbien dans l'écosystème a permis de développer des fonctions importantes. Cependant, la plupart des études sur la rhizosphère microbiologique, en particulier celles décrivant les coopératives interactions plantes – microbiens, se sont concentrés uniquement sur bactéries. En conséquence, cet examen portera sur ces deux types de microbes. Les bactéries ont des habitudes trophiques / de vie différentes, et une variété de relations saprophytes ou symbiotiques, soit nuisibles (pathogènes), soit bénéfiques (mutualistes), ont été signalés. Parmi les interactions qui sont bénéfiques aux plantes, on trouve les symbioses fixatrices d'azote, les associations avec les bactéries promotrices de croissance. Alors que les effets nuisibles sont souvent liés à l'action des bactéries ou champignons pathogènes.(Ladjabi, 2019)

I.1.6 Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont définies comme des bactéries de la rhizosphère dont l'interaction avec les plantes favorise la croissance des plantes. PGPR aide divers aspects des cycles de vie des plantes grâce à l'interaction avec les plantes (Figure 1). Cela comprend la promotion de la croissance des plantes en soutenant l'absorption de la nutrition, en antagonisant ou en ajoutant une résistance aux agents pathogènes, la production d'hormones végétales et la modification de la structure physique du sol.(Takeshi et *al.*, 2017)

La rhizosphère est apparue comme un environnement écologique polyvalent et dynamique d'interactions microbiennes végétales intenses exploitant les micros et macro-nutriments essentiels affectant la croissance des plantes. Dans de nombreuses relations rhizosphériques, les PGPR sont des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire des plantes riches en éléments nutritifs, leur abondance dans le sol s'explique par leur multiplication rapide et leur capacité à utiliser une grande variété de substrats comme source d'énergie et d'éléments nutritifs. Le potentiel du PGPR dans l'agriculture est en constante augmentation car il offre un moyen attrayant de remplacer l'utilisation d'engrais chimiques, de pesticides et d'autres suppléments.(Anuradha et *al.*, 2019)

Les PGPR sont divisés en deux grands groupes en fonction de leur relation avec les plantes hôtes : les bactéries libres (non rhizosphériques), vivants dans le sol et n'utilisant pas les exsudats racinaires pour leur croissance et les bactéries symbiotiques à effet direct sur les composés organiques présents dans les racines.(Ladjabi, 2019)

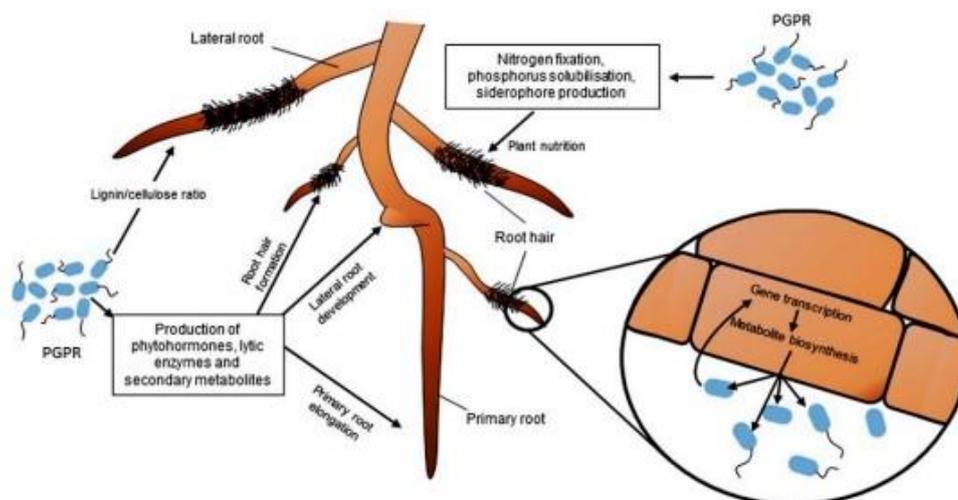


Figure 1: Le mode d'action utilisé par les rhizobactéries (PGPR) pour favoriser la croissance des plantes(Vejan et *al.*, 2016)

I.1.7 Effet des PGPR

Les micro-organismes de la rhizosphère influencent directement et indirectement la composition et la productivité (la biomasse) des communautés végétales naturelles. Par conséquent, la richesse en espèces microbiennes souterraines a été proposée comme prédicteur de la diversité et de la productivité des plantes aériennes. Des chercheurs ont, en outre, suggéré que la diversité souterraine peut agir comme une assurance pour maintenir la productivité des plantes dans différentes conditions environnementales. En raison de leur sensibilité aux petits changements dans les conditions abiotiques, y compris le stress et les perturbations environnementales, le sol et les microorganismes de la rhizosphère sont considérés comme des bioindicateurs de la qualité du sol. (Mendes *et al.*, 2013)

Les bactéries rhizosphériques favorisent la croissance des plantes et les protègent des attaques d'agents pathogènes par une gamme de mécanismes (Figure 2). Celles-ci impliquent la bio fertilisation, la stimulation de la croissance des racines, la rhizoremédiation, le contrôle du stress abiotique et le contrôle des maladies. De plus, l'application de PGPR peut augmenter la concentration de certains composés polyphénoliques dans les fraisiers. (Hosseini *et al.*, 2022a) L'utilisation réussie du PGPR dépend de sa survie dans le sol, de la compatibilité avec la culture sur laquelle il est inoculé, de la capacité d'interaction avec la microflore indigène du sol et des facteurs environnementaux. (Vejan *et al.*, 2016)

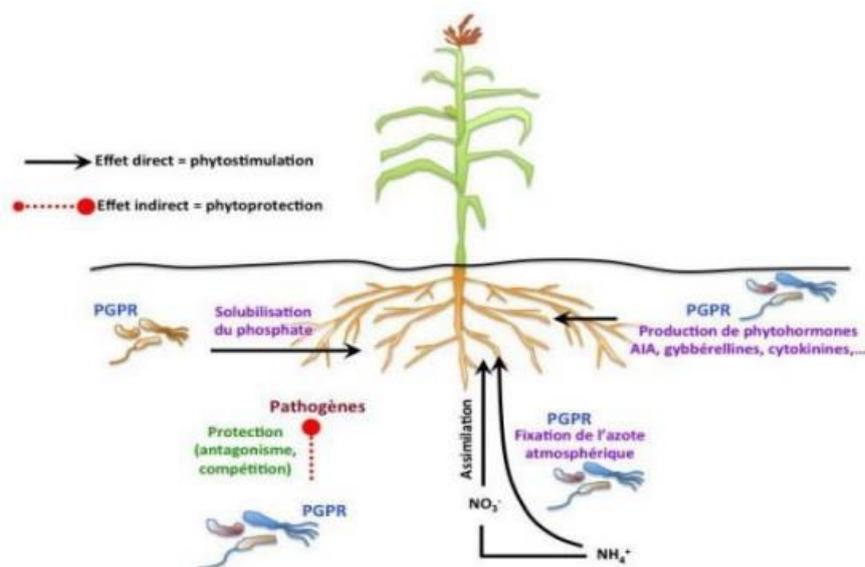


Figure 2: Interactions entre plantes et bactéries coopératives dans la rhizosphère (Abdesselam et Latache, 2017)

I.1.8 Modes d'action directs des bactéries PGPR

Certaines PGPR stimulent la croissance et le développement des plantes par des actions directes. Ces effets renferment les levées accélérées des plantules., les accroissements de la masse aérienne et racinaire, et les élongations racinaires. Ces augmentations s'expliquent généralement par des meilleurs prélèvements et assimilation des éléments nutritifs par la plante, le développement de la résistance induite chez les plantes, et la production des phytohormones.

Diverses bactéries sont capables de solubiliser le phosphore organique par l'action de phosphatase, ou le phosphore inorganique par la libération d'acides organiques. Plusieurs microorganismes ont aussi la capacité de produire des auxines, des gibbérellines.(Bakkali Bouarrakia, 2018)

I.1.8.1 Amélioration de la disponibilité de Phosphore

Le phosphore est considéré comme le deuxième élément nutritif le plus vital pour les plantes ainsi que le deuxième plus déficient après l'azote(Fahsi et *al.*, 2021). Il est très abondant dans la nature sous forme de phosphate naturel. Il joue un rôle pratiquement important dans tous les processus métaboliques majeurs dans les plantes, y compris la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse macromoléculaire et la respiration.

Dans la croissance des cultures, il n'y a pas de substitut au phosphore et le phosphore ne peut pas être fabriqué synthétiquement. Il est disponible pour les plantes sous forme d'ions ortho phosphate $H_2O_4P^-$ et HPO_4^{2-} . Les plantes ont besoin de ce phosphore pour la croissance cellulaire, la formation des fruits et des graines et la maturation. Malheureusement, le phosphore est l'un des nutriments les moins disponibles biologiquement.(Soumare et *al.*, 2020)

Malgré l'abondance du P dans le sol, sous la forme minérale ou organique, il est un nutriment majeur limitant pour l'agriculture car une grande partie de ce P se trouve sous forme insoluble. En plus, la nutrition minérale de plantes est fortement dépendante de la disponibilité de P soluble dans le sol. Pour remédier à ce problème, des applications fréquentes d'engrais phosphatés sont utilisées dans les champs agricoles. Les plantes absorbent moins de quantités d'engrais phosphatés appliquées et le reste est rapidement converti en complexes insolubles dans le sol. Les applications répétées et parfois excessives d'engrais phosphatés provoquent généralement l'augmentation du niveau de saturation en P du sol ce qui est nuisible à l'environnement. De ce fait, l'usage de ces produits chimiques utilisés en agriculture, soit dans le but de fertilisation ou de protection a été mis en cause, et il

a été nécessaire de trouver de nouvelles approches pour améliorer la production agricole dans les sols présentant une carence en P, qui seraient moins polluantes, moins coûteuses et aussi efficaces. Les bactéries solubilisant le phosphate, PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) sont fréquentes dans la rhizosphère et peuvent être utilisées pour résoudre ce problème. Ces micro-organismes permettent la disponibilité du P pour les plantes par minéralisation du P organique du sol et par solubilisation des phosphates précipités. (Bakkali Bouarrakia, 2018; Ladjabi, 2019)

I.1.8.2 Effet des bactéries solubilisant le phosphate (PSB)

Le fait que certains microbes du sol soient capables de dissoudre des composés phosphatés relativement insolubles a ouvert la possibilité d'induire une solubilisation microbienne des phosphates dans le sol.

Les bactéries solubilisant le phosphate (PSB) permettent la disponibilité du P pour les plantes par minéralisation du P organique du sol et par solubilisation des phosphates précipités. La capacité de quelques micro-organismes à convertir le phosphore insoluble en forme accessible est un trait important pour les PGPR. Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient être une source prometteuse comme agent biofertilisant dans l'agriculture.

L'effet solubilisant des BSP est assuré à travers la production des acides organiques tels que l'acide formique, l'acide propionique, acide lactique, l'acide oxalique, l'acide citrique, l'acide acétique et l'acide malique. Ces acides réduisent le pH du sol et provoquent la dissolution du phosphate insoluble. Les BSP sont également en mesure de minéraliser les matières organiques du phosphate insolubles par l'excrétion d'enzymes extracellulaires comme les phosphatases, phytases et C-P lyase. Il convient de noter que ces deux mécanismes (solubilisation et minéralisation) peuvent coexister chez la même BSP. Notons que ces microorganismes produisent des acides organiques et relâchent des protons, qui à travers leurs groupements carboxyliques, chélatent les cations fixés aux phosphates insolubles ce qui permet de les convertir en formes solubles. (Bakkali Bouarrakia, 2018; Ladjabi, 2019)

I.1.8.3 Production des hormones de croissance

Les hormones végétales sont des messagers chimiques élaborées en quantités variables par les plantes, et qui influencent la capacité de la plante à réagir à son environnement. Ce sont des composés naturellement organiques qui sont efficaces à très faible concentration et qui sont principalement synthétisés dans certaines parties de la plante et transportés vers un autre endroit. Il est bien établi qu'il existe deux types de production des phytohormones

naturellement disponibles pour les plantes : production endogène par les tissus de la plante et exogène par des micro-organismes associés, y compris de nombreuses bactéries du sol.

Les hormones végétales, également appelées phytohormones, influencent les processus physiologiques à de faibles concentrations. Les processus influencés comprennent la croissance, la différenciation et le développement ; d'autres processus, tels que le mouvement stomatique, pourraient également être affectés. Il est également important de noter que chaque réponse de plante est souvent le résultat de deux hormones ou plus agissant ensemble. Ainsi, puisque les hormones stimulent ou inhibent la croissance des plantes, elles sont également appelées régulateurs de croissance des plantes produits à partir de PGPR. Quelques hormones végétales notables telles que les auxines, l'éthylène, les gibbérellines, l'acide (+) -abscissique (ABA) et les cytokinines pourraient bien réguler la croissance et le développement des plantes, en outre, ils peuvent affecter la prolifération cellulaire dans l'architecture racinaire par la surproduction de racines latérales et de racines avec un accroissement subséquent de l'apport d'éléments nutritifs et d'eau.(Bakkali Bouarrakia, 2018; Ladjabi, 2019; Vejan et *al.*, 2016)

Production d'acide indole acétique

L'acide indole-3-acétique (AIA) est l'une des hormones les plus importantes physiologiquement chez les végétaux, elle est impliquée dans tous les aspects de leur croissance et de leur développement en affectant la division cellulaire, l'élongation des cellules et leur différenciation. Cette Hormone est très couramment produite par PGPR. Les rhizobactéries synthétisent d'une manière prédominante l'AIA à partir du tryptophane qui est un précurseur commun chez les microorganismes, et qui est présent dans les exsudats racinaires (Figure 3). La concentration d'AIA augmente avec la concentration de son précurseur dans le milieu. En effet, cette hormone produite par les rhizobactéries, est absorbée par la plante, et elle peut stimuler la germination des semences et tubercules ; augmenter le taux de xylème et le développement des racines ; contrôler des processus de la croissance végétative ; affecter la photosynthèse, la formation de pigment, la biosynthèse de métabolites différents, et une résistance à des conditions stressantes.

Cependant, à part cet effet stimulant d'élongation et/ou de prolifération cellulaire, l'AIA d'origine exogène peut avoir un effet inhibiteur sur la croissance des racines. En plus de l'effet de concentration d'AIA exogène, la sensibilité des racines envers cette hormone dépend de l'espèce végétale et aussi de l'espèce bactérienne produisant l'hormone. Cette inhibition peut être expliquée par la production d'ACC, précurseur d'éthylène, car selon la

littérature, l'AIA peut induire la synthèse d'ACC en stimulant l'enzyme ACC synthétase qui va convertir la S-adénosyl méthionine en ACC par la voie de l'acide indole-3-pyruvique. L'auxine produite dans la rhizosphère par les rhizobactéries peut stimuler l'activité de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthétase, une enzyme naturellement utilisée par la plante pour former l'éthylène.(Bakkali Bouarrakia, 2018; Sebihi, 2016)

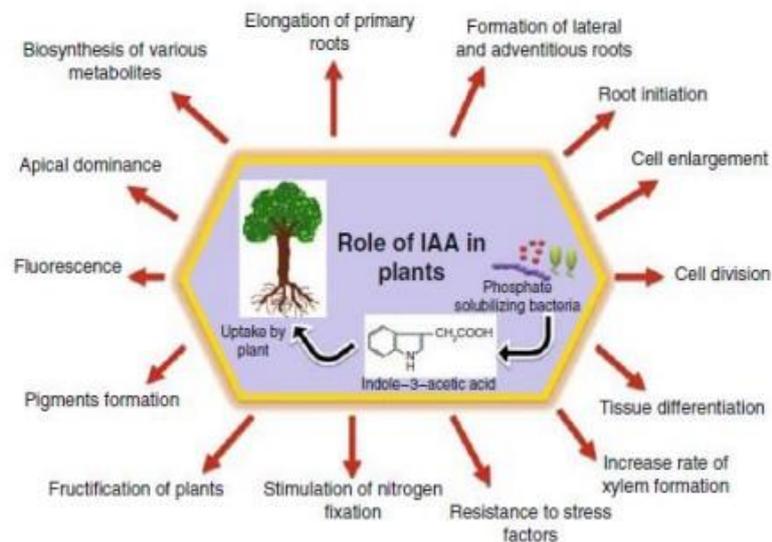


Figure 3: Rôle d'AIA dans la promotion de la croissance des plantes(Achkouk, 2016)

I.1.9 Modes d'action indirects des PGPR

Certaines PGPR produisent des effets bénéfiques sur la croissance des plantes en présence d'un pathogène. Ces modes d'action indirects sont généralement attribuables à la compétition, à la production d'antibiotiques. Par ailleurs, la levée plus hâtive des plantules et la croissance plus rapide des racines liées aux PGPR permettent aux plantes d'échapper plus rapidement aux pathogènes. Les PGPR produisent des métabolites secondaires qui sont toxiques aux pathogènes du sol, dont, le cyanide, les sidérophores, et diverses substances qui ont une gamme d'activités inhibitrices de la croissance des pathogènes. D'autres PGPR produisent des exo enzymes dégradant la chitine, la cellulose ou les R-glucanes lysant la paroi des agents phytopathogènes. (Bakkali Bouarrakia, 2018)

I.1.9.1 Production d'acide cyanhydrique

En se considérant comme un métabolite secondaire produit par de nombreuses bactéries, l'acide cyanhydrique joue un rôle très important dans le biocontrôle car il a un effet antibiotique et antifongique, et confère un avantage sélectif sur les souches productrices. L'HCN provoque l'inhibition du transport des électrons, ainsi le processus qui aboutit à

l'acquisition d'énergie sera perturbé induisant ainsi la mort de l'organisme. HCN ainsi libéré par les PGPR en solution (sous formes d'ions cyanures) peut intervenir dans l'antibiose aussi en inhibant certains enzymes primordiaux du pathogène, comme le cytochrome C- oxydase et est donc très toxique pour tous les micro-organismes aérobies à des concentrations picomolaires. Bien que le cyanure soit un agent phytotoxique capable de perturber l'activité des enzymes impliquées dans les principaux processus métaboliques, son rôle en tant que substance de biocontrôle capable de réduire les infections phytopathogènes est écrasant.(Achkouk, 2016; Bakkali Bouarrakia, 2018)

I.2 Généralités sur la fraise

La culture du fraisier est l'une des cultures horticoles les plus répandues dans le monde. Au Maroc, la production de la fraise est localisée dans les régions du Gharb et le Loukkos (Nord-ouest). Les variétés de fraises les plus cultivées à l'échelle nationale sont d'origine californienne, avec une nette prédominance. *Fragaria x ananassa Duchesne* issu du croisement de *Fragaria chiloensis* et *Fragaria virginiana* est une importante culture commerciale cultivée principalement dans les zones climatiques tempérées, et est considéré comme le fraisier le plus cultivé commercialement. Ce croisement qui fut décrit en premier par Antoine Duchesne, est vigoureux et produit de grosses fraises. Outre, la découverte de nouvelles espèces a permis d'effectuer d'autres croisements mais *Fragaria x ananassa Duch* est actuellement l'espèce la plus cultivée. Sa production dans le monde atteint plus de 7,7 millions de tonnes par an et continue de croître.(Takeshi et al., 2017)

Le fraisier est sujet à plusieurs contraintes phytosanitaires, les conditions climatiques et l'insuffisance des techniques de stockage favorisent l'apparition de plusieurs pathogènes responsables de la dépréciation des fraises. Il peut être attaqué par les virus, les bactéries, les Acariens, les nématodes, les ravageurs, les mauvaises herbes et les champignons.

La physiologie racinaire du fraisier limite l'accessibilité à l'eau disponible dans le sol et le rend sensible à la sécheresse. Le fraisier n'est capable d'extraire que 20 % de la réserve en eau du sol. L'irrigation du fraisier exige une excellente gestion pour maintenir les conditions hydriques optimales. Un apport insuffisant entraîne un stress hydrique tandis qu'un apport excessif peut entraîner une asphyxie racinaire.(Cormier, 2015; Mouden et al., 2013)

I.2.1 Importance de la culture au Maroc

I.2.1.1 Importance socio-économique

I.2.1.1.1 Production mondiale

Dans le classement 2018, la Chine se classe parmi les plus grands producteurs de fraises au monde avec une production de 2 955,453 millions de kilogrammes. Les États-Unis se classent au deuxième rang mondial avec 1 296,27 millions de kilogrammes, suivis du Mexique avec 653,64 millions de kilogrammes. La Turquie occupait la quatrième place avec une production de 440,97 millions de kilogrammes, suivie de l'Égypte (362,64 millions de kilogrammes) et de l'Espagne à la sixième place avec une production de 344,68 millions de kilogrammes.(El habti, 2020)

I.2.1.1.2 Production nationale

La production marocaine de fraises a atteint un record de 200 000 tonnes en 2019, ce qui la place dans le top 20 d'un classement établi par l'agence statistique de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Selon les dernières données de l'agence statistique de la FAO, en 2018, le Maroc était 11e au monde pour la production de fraises sur 3 276 hectares avec un rendement de 143 440 tonnes à 4,38 kg/m². À ce titre, il devance les grands producteurs, dont l'Italie, l'Allemagne et le Royaume-Uni.(El habti, 2020)

I.2.1.2 Evolution des exportations

Les exportations de fraises marocaines surgelées ont augmenté de 2,7% en un an depuis 2014 (Figure 4). Le pays a gagné 86 960 911,34 dollars en 2019, ce qui en fait le cinquième exportateur mondial, selon COMTRADE, l'agence statistique des Nations Unies. Les fraises du Maroc sont réputées pour leur qualité et leurs bons prix. Si le Maroc est actuellement le cinquième exportateur mondial de fraises surgelées, sa position dans les ventes de fraises fraîches est tout aussi importante. En fait, parmi les principaux pays exportateurs de fraises fraîches, le Royaume se classe au 7e rang mondial avec 49,28 millions de dollars, soit plus de 457 millions dirhams.

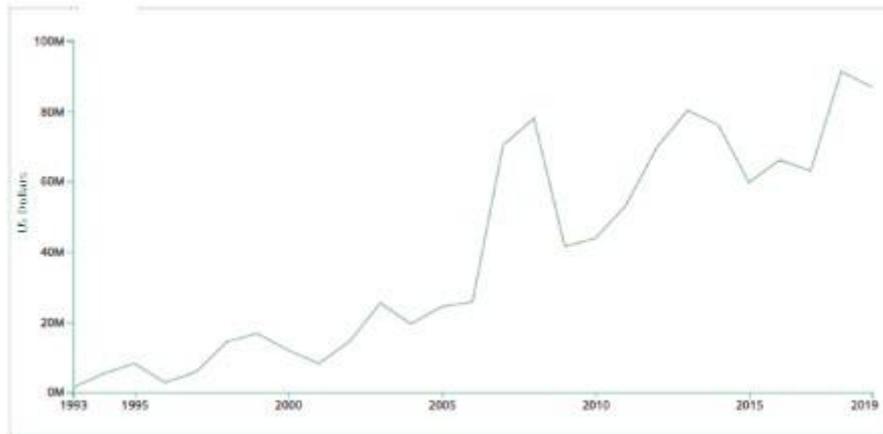


Figure 4: Evolution des exportations marocaines de la fraise jusqu'au 2019(AgriMaroc.ma, 2020)

72% des exportations marocaines de ce produit agricole appartiennent à la catégorie « surgelée » et 28% sont fraîches. En fait, la majorité de ces fruits rouges transitent vers le marché européen.

I.2.1.3 Impact de la pandémie sur l'exportation marocaine

Selon les données statistiques de la campagne 2019/2020 présentées par la Confédération Marocaine de l'Agriculture et du Développement Rural (COMADER), le Maroc a réalisé une hausse de 24% par rapport à la campagne précédente, avec une exportation atteinte plus de 170.000 tonnes de fruits rouges permettant une rentrée de devises de 6,5 milliards de dirhams en augmentation de 32%. (AgriMaroc.ma, 2020)

I.2.2 Description botanique

Le fraisier (Figure 5) est une plante herbacée vivace, de petite taille, de la famille de rosacées, cultivée pour son fruit (ou fraise), mais poussant aussi à l'état sauvage dans certains sous-bois et sur les talus. Caractérisée par une tige très courte portant une rosette de feuilles alternes et trifoliées. La formation de stolons correspond à un type de ramification du plant de fraisier, en effet, certains nœuds de stolons (qui sont des rameaux longs) peuvent s'enraciner, puis devenir à terme indépendants de la plante-mère. Il est d'une grande importance pratique, car il est la base de la multiplication végétative des plants de production.

Ses fleurs blanches, sont composées de cinq sépales, cinq pétales, une vingtaine d'étamines et de nombreux carpelles, et sont pollinisées par le vent ou les abeilles. Après fécondation, les fruits secs et indéhiscent sont des akènes et sont disposés dans des alvéoles plus ou moins profondes du réceptacle floral. Ce dernier va grossir sous l'effet des auxines pour donner le fruit complexe charnu qu'est la fraise. L'inflorescence est une cyme bipare. (Aries, 2019; Laouici et Rida, 2017)



Figure 5: Schéma de l'appareil végétatif du fraisier(Aries, 2019)

I.2.3 Classification botanique

Le fraisier appartient à la classification suivante : (Tableau 1).

Tableau 1: Classification du fraisier(Aries, 2019)

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Trachenobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Rosales</i>
Famille	<i>Rosaceae</i>
Genre	<i>Fragaria</i>
Espèce	<i>Fragariaananassa</i>

I.2.4 Différents types de fraisier

Les fraisiers cultivés sont classés en deux groupes :

- Les fraisiers à petits fruits (*Fragaria vesca semperflorens*), ou fraisiers « des quatre saisons », qui fleurissent de mai à octobre et dont les stolons sont fins et nombreux (les variétés dites « Guillons » sont sans stolons).
- Les fraisiers à gros fruits (*Fragaria grandiflora*), qui se divisent en deux sous-groupes :
 - ✓ Les fraisiers non remontants : qui sont des plantes vivaces de jours courts dont l'induction florale se fait vers la fin de l'été et à l'automne lorsque la durée du jour est inférieure à un seuil critique d'environ 12 à 13 heures associée à des températures fraîches n'excédant pas les 15 °C. Ces variétés fleurissent le printemps suivant en donnant une production groupée unique. Selon l'époque de floraison on distingue des variétés précoces, de saison et tardives. (PPC = 11 heures).
 - ✓ Les fraisiers remontants, qui, l'induction florale se fait lorsque la photopériode est supérieure à 12 h et sous des températures modérées, comprises entre 15 et 20 °C. L'induction commence au mois d'août et le développement des premières hampes florales peut s'achever avant l'hiver. Le nombre d'inflorescences produites augmente au fur et à mesure que la durée du jour s'allonge. (PPC > 15-16 heures).

Contrairement aux fraisiers à jours courts, qui produisent leurs fruits en juin ou plus tard dans l'été, les fraisiers à jours neutres ou à production continue, produisent leurs fruits en continue au cours de l'année de la plantation. (PPC = 13 heures).(Aries, 2019; Haddaoui, 2020)

NB : L'induction florale ne peut avoir lieu que si la longueur du jour est inférieure à sa photopériode critique (PPC).

I.2.5 Multiplication végétative du fraisier

La multiplication du fraisier est asexuée ; elle se fait par des plants. Ceux-ci sont de deux types :

- Plants frais (couvrant leur besoin en froid en pépinière à altitude élevée. Ils sont plantés fin octobre début novembre)
- Plants frigo (triés et stockés dans des chambres froides à 2°C. Le stockage au froid dure en moyenne 6 à 7 mois avant leur utilisation par le fraisiériste).

I.2.6 Exigences agro-climatiques

La fraise est une plante herbacée vivace qui s'adapte bien à une variété de climats. En effet, ses parties végétales sont très résistantes au gel en supportant des températures de -20°C.

Cependant, à des températures autour de 0°C, la structure florale est détruite, tandis que des températures inférieures à 12°C pendant la nouaison peuvent provoquer une déformation des fruits.

Les plants de fraises, quant à eux, sont capables de supporter des températures estivales d'environ 55°C. Cependant, des températures élevées peuvent provoquer une maturation rapide, empêchant le fruit d'atteindre un bon calibre. Les températures annuelles moyennes comprises entre 15°C et 20°C sont optimales, tandis que les zones pluviales nécessitent une pluviométrie minimale d'environ 600 mm.

Froid : La fraise est une rosacée fruitière qui nécessite des températures basses pour sa floraison et une bonne production. Les variétés des régions chaudes ou tempérées (les variétés méridionales), ont des exigences plus faibles pour les basses températures, tandis que les variétés des régions plus froides ont des exigences plus élevées. Si ces besoins ne sont pas satisfaits, la floraison sera très faible et la fructification sera médiocre. Les plants de fraises doivent subir ces basses températures pour fleurir. Lors de la floraison, elles sont défavorables (couleur des fleurs).

Température : La température moyenne pour une bonne floraison est d'environ 10 à 15°C. Une bonne fertilisation nécessite une température de 20°C et une humidité relative inférieure à 60%. La maturation normale des fruits nécessite une température supérieure à 15°C, la température optimale de croissance est d'environ 25°C et la croissance s'arrête lorsqu'elle est inférieure à 5°C.

Luminosité : La culture des fraises est également affectée par la lumière. C'est ainsi qu'en jours longs la plante produit des stolons. La plante a connu deux croissances, la première par temps chaud et de longues journées. Elle se caractérise par une production élevée de feuilles (jusqu'à une par semaine) et un port érigé ; la seconde ayant lieu au début de l'automne, donnant à la plante un aspect trapu. L'initiation florale est déclenchée par l'apparition de jours courts, mais lorsque les jours courts durent plus longtemps, ils provoquent la dormance de la plante. Pour lever cette dormance, les plantes doivent être exposées à des températures basses (2°C-10°C). Plus cette température est basse, plus l'exposition au froid est courte. Les fleurs au centre sont celles des plus gros fraisiers, il faut donc les protéger du gel.

Sol : En ce qui concerne les exigences de la culture du sol, bien que les fraisiers soient adaptés à une large gamme de sols, ils préfèrent les sols plus chauds et à texture plus légère. Ils craignent les sols compacts ou non drainés, et même les chlorures à faible dose autour de 0,5 %.

Le pH optimal du sol doit être compris entre 5,7 et 6,5 et la teneur en calcaire doit être inférieure à 2 %.

Semis : Concernant la plantation, elle peut se faire à plat, mais le plus souvent s'effectue sur buttes (ou une planche à 10-20 cm du sol). Les dates de plantation varient considérablement selon le type de plants utilisées, le climat général de la région et la variété choisie. Au Maroc, les meilleures dates de plantation sont : du 10 novembre au 15 décembre pour les plants frais et du 1er juillet au 15 août pour les plants « Frigo ». La densité de plantation recommandée est de 70 000 plants/ha (4 rangs par planche de 1 m de large, espacement des planches de 0,5 m).(Aries, 2019)

I.2.7 Importance nutritionnelle

La fraise contient des vitamines liposolubles (A, E, K), mais surtout de la vitamine C (60 mg/100 g de fruit frais) et de la vitamine B9 ou folates (24 microgrammes/100 g de fruit frais). La fraise est aussi une bonne source d'iode, magnésium, cuivre, fer et phosphore.

D'autre part, les fraises sont l'un des fruits les plus riches en composés phytochimiques, principalement en phénols. Les flavonoïdes sont les composés phénoliques qui contribuent le plus aux capacités antioxydantes et anti-inflammatoires des fraises, en plus d'être responsables de leur couleur rouge. Parmi les principaux flavonoïdes présents dans les fraises figurent les anthocyanes, qui font partie de la famille des polyphénols. Les fraises contiennent d'autres composés phénoliques, notamment des ellagitannins (comme l'acide ellagique) et des flavonoïdes (comme la quercétine). Tous ces composés phénoliques peuvent jouer un rôle important dans la prévention de certaines maladies, grâce à leurs capacités antioxydantes et anti-inflammatoires. Outre, la fraise augmente l'oxydation du cholestérol des lipoprotéines de basse densité (qui cause les maladies coronariennes) et prévient la dégénérescence cellulaire, aidant ainsi à prévenir certaines maladies dégénératives.(Aries, 2019)

I.2.8 Effet des bactéries PGPR sur la croissance de la fraise

Le traitement PGPR peut être une mesure favorable à la culture des fraisiers car il fournit les nutriments essentiels nécessaires à une bonne croissance des plantes et en même temps diminue les performances du cycle de vie et la croissance de la population de l'herbivore notoire. Des expériences suggèrent que ces trois espèces de rhizobactéries libres (*Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*, et *Pseudomonas brassicacearum*) renforcent le système constitutif et/ou induisent le système de défense anti-herbivore direct des fraisiers.(Hosseini et al., 2022b; Takeshi et al., 2017)

L'application de PGPR dans la production de fraises a été rapportée dans certaines études pour ses effets sur l'augmentation du nombre de stolons ainsi que sur le rendement en fruits. Il a également été rapporté que l'application améliorait la teneur en anthocyanes. Un autre rapport a affirmé que l'application de PGPR dans la production de fraises peut atténuer le stress salin et améliorer les rendements et les facteurs de nutrition des fruits. (Takeshi et *al.*, 2017)

II. Partie MATERIEL ET METHODES

II.1 Matériel végétal et conservation des échantillons

Les échantillons ont été prélevés dans les zones de culture de fruits rouges de Larache, au Maroc. Nous avons sélectionné au hasard trois sites différents représentant trois répétitions de fraisiers de serre (même type de sol, conditions de croissance et système d'irrigation), chaque échantillon comprend quatre sous-échantillons différents. Pour chaque échantillon, nous avons prélevé du sol à une profondeur de 0 à 10 cm. Au total, 12 sous-échantillons de sol ont été prélevés et conservés dans des sacs (3 sites répétés \times 4 sous-échantillons). Ces sacs ont été placés dans une glacière à +4°C et immédiatement transportés à notre laboratoire pour analyse microbienne (Figure 6).



Figure 6: les échantillons du sol conservés dans des sacs

II.2 Méthodes

II.2.1 Isolement des bactéries du sol

II.2.1.1 Préparation des dilutions et mise en culture

10 g du sol humides (égal à 7,92 g de sol sec) ont été transférés dans des flacons de 250 ml contenant 90 ml d'eau physiologique stérile (9g/L NaCl). Le mélange est maintenu sur l'agitateur rotatif à 150 tr/min pendant 30 min.

En utilisant la technique de dilution en série, 70 μ L des suspensions de dilution allant de 10^{-1} à 10^{-9} ont étéensemencées par épuisement sur des boîtes de pétri contenant le milieu LB. Toutes les boîtes de Petri ont été incubées à 28°C pendant 48-72 heures.

II.2.1.2 Conservation des souches

La méthode de conservation des souches consiste à repiquer les souches en boîtes de pétri contenant le milieu LB. Tous les isolats ont été incubés 24 heures et conservés à 4°C.

II.2.2 Identification macroscopique et microscopique

II.2.2.1 Identification macroscopique

La mise en culture des isolats obtenus et le suivi de leur croissance sur milieu LB permet d'avoir une croissance en fonction de temps. Généralement les bactéries PGPR montrent une croissance importante après 2-5 jours d'incubation (croissance rapide), avec des colonies de textures différentes.

II.2.2.2 Identification microscopique

Le principe de ce test se base sur la classification et la distinction des bactéries à travers les propriétés de la paroi bactérienne (Khadija et Hind, 2021). On peut réaliser la classification des bactéries en les divisant en deux groupes : bactéries à Gram + et bactéries à Gram –

Après coloration de Gram, les frottis sont examinés au microscope photonique pour déterminer le Gram, la forme des cellules le mode d'association et la pureté de la culture. Techniquement la coloration de Gram passe par les étapes ci-dessous :

- Conditionnements du frottis

On dépose une goutte d'H₂O sur une lame bien nettoyée à l'alcool, puis on touche une colonie à l'aide d'une pointe jaune ou d'un cure-dent stérile pour prélever des bactéries. Ensuite la pointe est frottée dans la goutte d'eau afin qu'elle soit séchée à l'air. L'échantillon est fixé à la chaleur en faisant passer la lame 3 fois dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen.

- Coloration

On dépose quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) (annexe 2) sur le frottis fixé et laisser agir 1 minute. Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.

Puis on rince très brièvement par l'H₂O sur la lame au-dessus du frottis. Par la suite on met quelques gouttes de Lugol sur le frottis. Ce dernier est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries (laisser agir 1 minute).

Comme précédemment décrit, la solution de Lugol est jetée dans un bécher puis rincée à l'H₂O. Après, on décolore en faisant couler la solution de décoloration sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10s). La solution de décoloration contient un mélange d'alcool et d'acétone. Les pores de la paroi des Gram+ sont fermés par la déshydratation à l'alcool. La paroi est alors imperméable et le colorant violet reste dans les bactéries. La membrane des Gram- est dissoute par le mélange alcool-acétone. La paroi plus

mince et de composition différente laisse alors sortir la coloration Violette (Rincer à nouveau par l'H₂O).

Contre-colorer en déposant la solution de safranine (rose) (annexe 2) pendant 1 min. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+ (rincer à l'H₂O et laisser sécher à l'air).

II.2.3 Mesure des activités promotrices de la croissance végétale

II.2.3.1 Test de solubilisation du phosphore

Les souches ont été testées pour leur capacité de solubiliser le phosphate inorganique sur un milieu Pikovskaya (PVK) solide amendé avec 5 % (p/v) de phosphate tricalcique (TCP) comme seule source de phosphore. Les isolats ont été inoculés dans des tubes contenant le milieu LB liquide et incubés pendant 24h. Après l'incubation, 20µl des suspensions bactériennes ont été ensemencées sur le milieu PVK (Glucose (10 g), (NH₄)₂SO₄ (0,5 g), Na Cl (0,2 g), KCl (0,2 g), Mg SO₄, 7H₂O(0,1 g), Mn SO₄, H₂O (0,002 g), Fe SO₄, 7H₂O (0,002 g), Extrait de levure (0,5 g), Phosphate tricalcique (5 g), Agar (20 g), Eau distillée (1000 ml). (Pikovskaya, 1948).

Après 7 jours d'incubation à 28°C, Le développement de zones claires autour des colonies a été considéré comme un solubilisant positif du phosphate.

Après la période d'incubation, nous avons mesuré le diamètre total (diamètre du halo + diamètre de la colonie) pour chaque colonie, en plus le diamètre de chaque colonie a été mesuré. Le diamètre du halo de solubilisation, pour chacun des isolats, a été déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie de celui diamètre total (Halo + colonie). Ce test est réalisé en duplicata.

II.2.3.2 Production d'acide cyanhydrique (HCN)

La capacité à produire l'acide cyanhydrique par les souches est étudiée selon la méthode de (Bakker and Schippers, 1987).

Nous avons préparé 500 ml du milieu LB mais avant d'ajouter l'agar, il faut ajouter 2,2 g/500ml de glycine. Après stérilisation et solidification du milieu, les boîtes de Pétri ont été ensemencées par 10 microlitres de la culture bactérienne fraîche.

Un papier filtre (Whatman N°1) imprégné d'une solution composée de 0,5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium de couleur jaune, a été déposé dans le couvercle de chaque boîte en position inverse. Les boîtes de Pétri sont ensuite scellés du papier Para film et

incubées à 28°C pendant 7 jours. Le changement de couleur du papier filtre de jaune en orange indique la production de HCN volatile.

Les boîtes sont vérifiées quotidiennement afin d'identifier les souches, HCN+, capables de virer la couleur du papier, du jaune à l'orange.

II.2.3.3 Production de l'acide indole acétique

Afin de déterminer la capacité des souches à produire l'Acide Indole Acétique (AIA), un test de production de cette auxine est réalisé selon la méthode décrite par (Wohler, 1997) en suivant les étapes suivantes :

Etape 1 : culture des souches sur milieu LB liquide (6ml de milieu LB + la suspension bactérienne) et l'incubation a été faite à 28°C en agitation continue (200 t/min) jusqu'à la phase exponentielle de croissance qui apparait par le changement de la couleur du milieu du clair au trouble, puis le volume obtenu est divisé en deux.

Le premier volume de la culture bactérienne (3 ml) a été centrifugé à 12000 rpm pendant 3 min (Sigma 1-14 Microfuge).

Le culot ainsi obtenu a été remis en suspension avec 3ml d'une solution de tampon phosphate (pH 7.1) (Annexe4) et glucose (1%) et 2 ml de L-tryptophane (1%). Cette suspension a été incubée à 28°C pendant 24 h.

Après incubation, 2 ml de l'acide trichloracétique (5%) et 1 ml de chlorure de calcium (0,5M) ont été ajoutés à la solution qui a été filtrée par la suite.

3 ml du filtrat ont été mélangés vigoureusement avec 2 ml du réactif de Salkowski (Annexe 2), puis incubés à l'obscurité pendant 30 min.

Etape 2 : pour déterminer la concentration d'AIA produite par les souches étudiées, nous avons préparé une gamme étalon à partir d'une solution mère d'AIA à 100 µg/ml (Annexe 5).

De la même façon que pour nos souches, 3 ml de chaque solution d'AIA à différentes concentrations 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 µg/ml ont été mélangés avec 2 ml du réactif de Salkowski, puis incubés à l'obscurité pendant 30 min.

L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à $\lambda = 535$ nm et les valeurs obtenues ont été portées sur la courbe d'étalonnage ($A_{535} = f(AIA)$) (Annexe 5).

L'apparition d'une couleur rose indique la production de l'AIA, les teneurs de l'AIA sont déterminées en µg/ml. Ce test est réalisé en triplicata.

III. Partie RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Caractérisation phénotypique des isolats

III.1.1 Isolement et purification des bactéries à partir de la rhizosphère de la fraise

Au total, on a isolé 75 isolats bactériens à partir de la rhizosphère de la fraise *Fragaria ananassa* Dusch, dont 18 isolats ont été prélevés à partir du site (Témoin) obtenus sur milieu LB solide, et 23 isolats appartiennent au site (rose clair), alors que le dernier site (rose foncé) comporte 34 isolats. (Figure 7).



Figure 7: quelques isolats bactériens

III.1.2 Caractérisation macroscopique et microscopique

Le test microbiologique (coloration de gram) a révélé 15 isolats gram positif, alors que les autres isolats sont tous signalés négatif (Annexe 3).

On s'est retrouvé avec des isolats de forme (Cocci, Bacille, Leptospire, Coccobacille, Cocci en amas...). Donc ces résultats nous permettent d'effectuer d'autres tests et de supposer qu'il peut s'agir des bactéries promotrices de la croissance des plantes. D'après ces résultats préliminaires, la forme sphérique (Cocci) est la plus souvent marquée chez les isolats et de type gram -.

En comparant les sites traités, le site rose foncé a signalé un nombre très élevé des isolats gram – par rapport aux autres sites.

III.2 Mesure des activités promotrices de la croissance végétale

III.2.1 Solubilisation des phosphates

Les 75 isolats ont été testées pour leur capacité de solubiliser le phosphate inorganique sur un milieu Pikovskaya solide contenant le phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de

phosphore. En effet, les trois sites du sol différents évalués pendant cette étude renferment des BSP. On compte un total de 47 isolats sur 75 isolats testés (63 %) dans le milieu PVK solide ont été capables de former un halo transparent autour de la colonie bactérienne indiquant la solubilisation de phosphate et dont les diamètres d'halo sont compris entre 0.1 et 1.5cm (figure 8). Il s'agit que la bactérie 21RC2 a donné la meilleure solubilisation de PTC en milieu solide avec un diamètre d'halo 1,5 cm, suivie par les trois bactéries 5RF3 (1,1cm), 5RC2 (1cm), et 11RF2 (0,9cm) (Tableau 2).

Tableau 2 : Résultats de Test de solubilisation de phosphate tricalcique

Souches	D. Halo	IS	Souches	D. Halo	IS	Souches	D. Halo	IS
1 TM3	1,3	0,3	3 RC4	-	-	4 RF2	-	-
1 RC3	1	0,3	3 RF4	-	-	4 TM3	1,1	0,7
2 RF1	1,1	0,3	4 TM1	1,4	0,3	4 RF3	-	-
2 RF3	1,3	0,4	4 RC1	1,6	0,2	4 TM4	-	-
3 TM2	-	-	4 RF1	-	-	4 RC4	1,3	0,2
3 RC3	0,9	0,3	4 TM2	1,3	0,2	4 RF4	-	-
3 RF3	-	-	4 RC2	0,9	0,4	5 TM1	1,4	0,2
5 TM2	0,9	0,5	7 RF2	0,9	0,1	9 TM2	-	-
5 RC2	0,8	1	7 RF3	-	-	9 RF2	1,1	0,4
5 RF2	0,9	0,4	8 RF3	-	-	9 RC3	1,5	0,6
5 RF3	0,9	1,1	8 TM4	1,6	0,2	9 RC4	0,8	0,5
6 RF2	0,8	0,2	8 RC4	-	-	9 RF4	0,9	0,2
11 TM2	-	-	8 RF4	-	-	10 RC1	-	-
11 RF2	0,7	0,9	17 RF2	-	-	10 RF1	1,1	0,4
12 TM1	1,3	0,1	19 RC1	0,9	0,5	10 RC2	0,9	0,2
12 RF1	0,7	0,3	20 RF1	-	-	10 RF2	1	0,5
14 RC4	-	-	20 RC4	-	-	10 RF3	0,9	0,5
15 RC4	-	-	23 TM3	-	-	30 RF4	1,3	0,3
15 RF4	-	-	25 RC1	1,1	0,3	30 TM2	0,9	0,5
16 RF4	1,1	0,2	30 RC3	1	0,1	31 RC4	1,2	0,5
35 RF3	0,9	0,2	34 TM4	1,4	0,6	34 TM2	1	0,9
36 RF4	1,2	0,5	37 RF2	1,3	0,4	34 RF2	1,2	0,4
22 RF2	-	-	33 TM3	0,9	0,3	21 RC2	1	1,5
38 RF3	-	-	33 RC4	-	-	24 RC1	-	-
32 RC1	0,9	0,3	33 RF4	-	-	2TM2	1,5	0,1

La moyenne de l'indice de solubilisation des isolats du site rose clair est (IS =0.46), supérieur à celle du site rose foncé (0.41) et du site témoin (0.37).

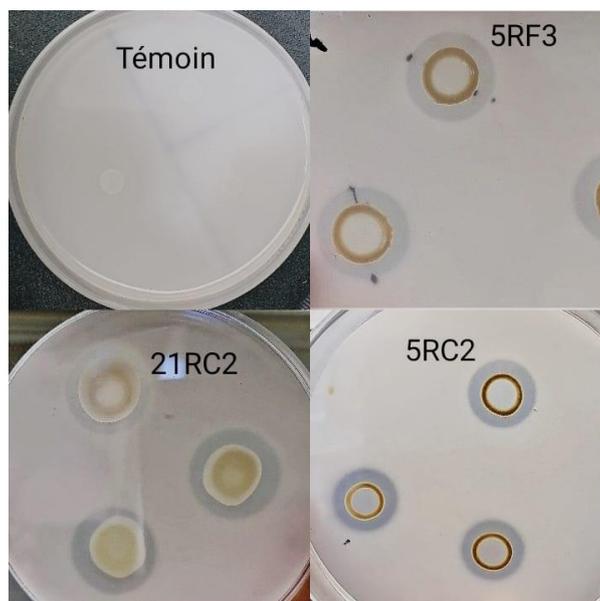


Figure 8: Test qualitatif de solubilisation de phosphate tricalcique sur milieu PVK

Des rapports portant sur l'étude de la solubilisation du phosphore suggèrent que le fait de solubiliser le phosphate inorganique peut être due à une acidification du milieu externe par l'excrétion des acides organiques, soit par des réactions de phosphatases qui transforment les formes insolubles de phosphates en ions de phosphates solubles monobasiques et dibasiques. En fait, (Zaidi et al, 2009) ont expliqué que les différentes bactéries du sol synthétisent des acides organiques de faibles poids moléculaires au but de solubiliser le phosphate inorganique. Ces acides organiques chélatent les ions minéraux ou diminuent le pH du milieu pour l'acidifier. Cette acidification mène à un relâchement des ions phosphates à partir du P minéral en remplaçant le Ca^{2+} par H^+ .

De plus, une étude menée par (Anuradha et al., 2019) ayant comme objectif l'évaluation de l'effet de PGPR sur la fraise *Fragaria x ananassa* sous des conditions de serre à l'Université d'agriculture de Chaudhary Charan Singh Haryana, Inde. Les traitements contenaient l'inoculation avec trois souches de PGPR (*Pseudomonas sp.* Souche MHA75, *Bacillus sp.* Souche RCA3 et *Bacillus sp.* Souche SYB101), tandis que le sol non traité servait de témoin non inoculé. Des études antérieures ont rapporté que tous les trois isolats de rhizobactéries utilisés dans cette étude solubilisent le phosphore, alors que *Bacillus sp.* Souche RCA3 a marqué une solubilisation de phosphore très remarquable par rapport aux autres souches traitées.

D'ailleurs une étude menée par (Bakkali Bouarrakia, 2018) ayant comme objectif de sélectionner des PGPR à partir de la rhizosphère de la légumineuse *Cytisus monspessulanus*, a montré que (30.18%) des rhizobactéries étaient capables de solubiliser le phosphate tricalcique (TCP) sur PVK solide en formant différents diamètres de solubilisation allant de 0.1 cm jusqu'à 0.8 cm.

Des expériences au champ et en serre ont montré des améliorations significatives des rendements des plantes lorsqu'elles sont inoculées avec des micro-organismes solubilisant les phosphates.

Véritablement, plusieurs études au cours de ces dernières années ont confirmé la capacité de différentes souches bactériennes à solubiliser le phosphate tricalcique, surtout les bactéries PGPR, ont un effet positif sur le rendement et la croissance des plantes.

III.2.2 Production de l'acide cyanhydrique

La production de l'HCN est une activité PGP recherchée chez les rhizobactéries du sol et qui est liée surtout au biocontrôle des plantes. Le changement de la couleur du papier Whatman du jaune vers l'orange-brun confirme la production de l'HCN (Figure 9). Pour notre étude, parmi 75 isolats, on a pu sélectionner 22 isolats qui sont capables de produire l'HCN. En effet, 29% des BSP sont des productrices de cet acide.

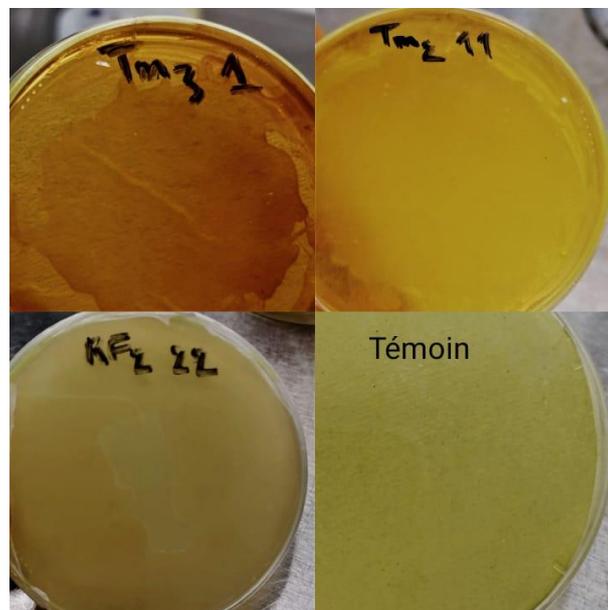


Figure 9: Test qualitatif de production d'HCN par les rhizobactéries

En effet, nos résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par (Bakkali Bouarrakia, 2018) qui a montré que 84% des BSP isolées à partir de la rhizosphère de la légumineuse *Cytisus monspessulanus* étaient positives pour la production d'HCN. De plus, (Achkouk,

2016), a signalé que les Bactéries solubilisant le phosphore de la rhizosphère de *Cytisus monspessulanus* et *Lotus creticus* ont subi une production assez élevée (67%) de ce gaz.

Cependant, dans une autre étude sur l'effet PGPR des souches de *Pseudomonas fluorescens* isolées de la rhizosphère du blé cultivé réalisée par (Sebihi, 2016), a testé 55 souches pour leurs activités PGP. La production du HCN était exprimée chez 11 % des isolats testés.

(Blumer et Haas, 2000) ont signalé que la production de HCN est liée à la présence de l'enzyme HCN synthétase à partir de la glycine. Cette enzyme est associée à la membrane plasmique de certaines bactéries, et indispensable à la formation de HCN, dont la quantité contrôle l'intensité de production de ce gaz. Ce composé volatil agit directement sur les cellules en bloquant la cytochrome C oxydase dans la chaîne respiratoire. Il permet également de piéger certains ions métalliques en formant des complexes avec eux (Blumer et Haas, 2000) et peut agir comme inducteur de résistance des plantes (Kumar et al., 2012).

Cependant, il a été démontré par (Bakker et Schippers, 1987) que l'HCN peut aussi provoquer des effets néfastes sur le développement des plantes par inhibition de la croissance de la partie racinaire.

Tableau 3: Résultats de production de l'HCN par les isolats testés

Isolats	HCN	Isolats	HCN	Isolats	HCN
1 TM3	+++	3RC4	-	4RF2	-
1 RC3	+	3RF4	-	4TM3	-
2 RF1	+	4TM1	+	4RF3	-
2RF3	+	4RC1	+	4TM4	-
3TM2	-	4RF1	-	4RC4	-
3RC3	-	4TM2	-	4RF4	-
3RF3	-	4RC2	+	5TM1	-
5TM2	-	7RF2	-	9TM2	-
5RC2	-	7RF3	-	9RF2	+
5RF2	-	8RF3	-	9RC3	-
5RF3	-	8TM4	-	9RC4	+++
6RF2	-	8RC4	++	9RF4	+++
11TM2	++	8RF4	-	10RC1	-
11RF2	-	17RF2	-	10RF1	-
12TM1	-	19RC1	+++	10RC2	-
12RF1	+++	20RF1	-	10RF2	+
14RC4	-	20RC4	-	10RF3	++
15RC4	-	23TM3	-	30RF4	-
15RF4	++	25RC1	-	30TM2	-
16RF4	-	30RC3	-	31RC4	-

35RF3	-	34TM4	-	34TM2	-
36RF4	-	37RF2	-	34RF2	-
22RF2	+	33TM3	+++	21RC2	-
38RF3	-	33RC4	++	24RC1	-
32RC1	++	33RF4	++	2TM2	-

III.2.3 Production de l'acide indole acétique

La mise en évidence de la production d'AIA a été réalisée sur milieu LB additionné de Tryptophane. L'apparition de la couleur rose traduit la production d'AIA par les isolats. (Figure 10). Les souches testées élaborent de l'AIA à des taux variables. En effet, les quantités d'AIA élaborées par les isolats du sol sont compris entre 10,35 et 110,77 µg/ml, ceux du site rose foncé sont les plus producteurs de l'AIA par rapport aux autres sites (témoin et rose clair).

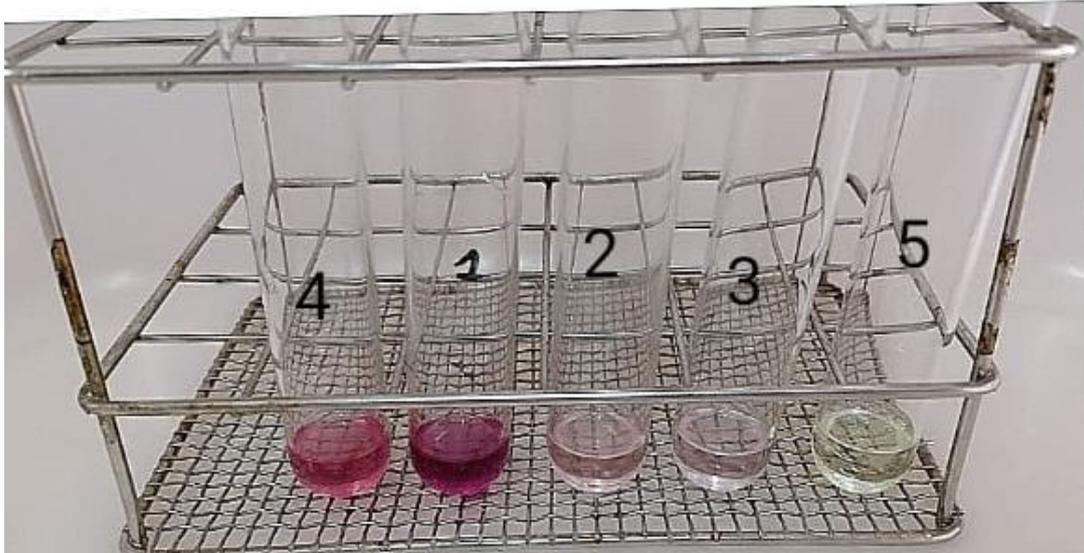


Figure 10 : Production qualitatif de l'AIA par les isolats traités

1 : isolat 1TM3

3 : isolat 7RF2

2 : isolat 2RF2

5 : Contrôle

4 : isolat 14RC4

Les plus fortes concentrations de celle-ci ont été produites par l'isolat 1TM3 suivi de 22RF2 puis 21RC2 en synthétisant respectivement 110.77 µg/ml, 108.91 µg/ml, et 72,85 µg/ml. Tandis que les plus faibles concentrations sont celles produites par l'isolat 7RF2, suivi de 2RF2, puis 6RF2 dont les concentrations sont respectivement de 10.35 µg/ml, 10.50 µg/ml, et 10.93 µg/ml. (Figure 11).

Les résultats de notre étude sont en accord avec ceux de (Bakkali Bouarrakia, 2018) , qui a démontré que tous les isolats de la rhizosphère de la légumineuse *Cytisus monspessulanus* soient producteurs de l'AIA. Ainsi, (Mouna et el Azzouzi, 2021) ont signalé que tous les isolats bactériens testés ont plus ou moins la capacité de produire l'AIA.

L'acide indole acétique (AIA) est résultante du métabolisme du D-tryptophane qu'il demeure le précurseur le plus commun de l'AIA par les bactéries PGPR.

D'ailleurs, (Naik et Sakthivel, 2006) ont suggéré que la production de l'AIA est souvent stimulée par l'induction des enzymes clés impliquées dans la biosynthèse de cette hormone. En outre, Les bactéries produisant une grande quantité d'auxine soit l'AIA, dans le sol induisent une augmentation maximale de la croissance et le rendement des récoltes. De plus, l'IAA bactériennes augmentant la surface et la longueur de la racine et fournit ainsi à la plante un meilleur accès aux nutriments du sol.

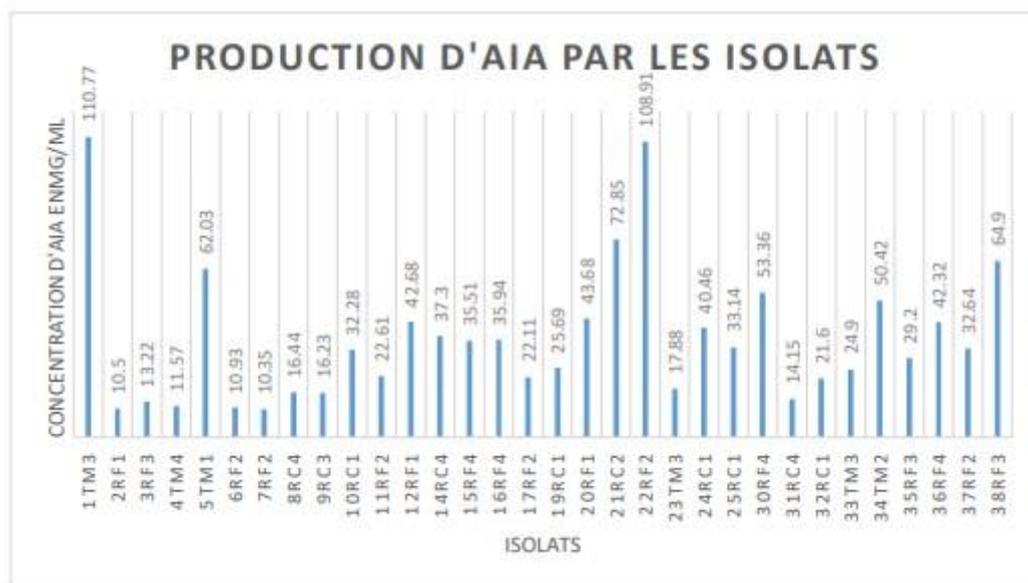


Figure 11 : Production quantitative d'AIA par les isolats

Conclusion

Les études relatives au rôle des rhizobactéries dans la croissance et l'amélioration des espèces végétales constituent à l'heure actuelle un enjeu majeur. Dans ce contexte, la présente étude a conduit à isoler et caractériser des rhizobactéries à partir de la rhizosphère de la fraise récoltées auprès de trois sites différents du domaine de Larache et transférées à l'institut national de la recherche agronomique Tanger pour évaluer ses activités PGP.

Une grande portion de bactéries étudiées se sont avérées solubilisantes de phosphate à des taux variés. Par ailleurs, les meilleures concentrations d'AIA produites permettent de classer les bactéries comme d'excellents agents phytostimulateurs. Un autre aspect important est le biocontrôle des agents phytopathogènes. Certaines bactéries sont productrices de l'acide cyanhydrique, ce qui peut être en relation avec l'attribution d'un pouvoir inhibiteur des bactéries testées contre les agents pathogènes.

Les résultats obtenus, sont extrêmement encourageants dans la perspective d'une utilisation des bactéries PGPR en agriculture pour l'amélioration de croissance et de développement des fraisiers, et leur application deviendra sûrement une réalité et jouera un rôle déterminant dans les processus cruciaux qui assurent la stabilité et la productivité des agroécosystèmes, nous conduisant ainsi vers un système agricole idéal.

En effet, l'utilisation des PGPR rentre dans le contexte de la fertilisation des sols et la stimulation de la croissance et des défenses naturelles des plantes dont la finalité est de réduire l'application de produits phytosanitaires et d'atténuer les effets inhibiteurs des sols pauvres. Ce travail préliminaire pourra se poursuivre par :

- L'isolement et caractérisation d'autres bactéries à partir d'autres cultures des fruits rouges (myrtille).
- Réalisation des études moléculaires plus approfondies pour déterminer le statut taxonomique des PGPR étudiées.
- Test du pouvoir des rhizobactéries isolées à produire d'autres phytohormones (gibbérellines, cytokinines... etc.), et procéder à la caractérisation d'autres activités enzymatiques telles : protéases, lipases.... etc.
- L'inoculation des plantes par les souches sélectionnées, afin de contribuer à la lutte contre l'utilisation intensive des engrais et des pesticides chimiques en agriculture.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Abdesselam, N., Latache, N. el houda, 2017.** IDENTIFICATIONS ET CARACTÉRISATIONS DES BACTÉRIES ISOLEES A PARTIR DE DIFFERENTS SOLS. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. TLEMCEN. Pp. 1-63.
- Achkouk, I., 2016.** Isolement, screening et caractérisation des rhizobactéries solubilisant le phosphate à partir de la rhizosphère de *Cytisus monspessulanus* et *Lotus creticus* pour différentes activités phytobénéfiques. PFE Faculté des sciences et techniques. Tanger. Pp. 1-71.
- AgriMaroc.ma, 2020.** Le Maroc reste le 5ème exportateur mondial de fraises surgelées [WWW Document]. AgriMaroc. URL <https://www.agrimaroc.ma/maroc-exportateur-fraises/> (accessed 7.2.22).
- Anuradha, Goyal, R.K., Sindhu, S.S., Godara, A.K., 2019.** Effect of PGPR on strawberry cultivation under greenhouse conditions. *Indian Journal of Horticulture*. Vol. 76. No. 3. <https://doi.org/10.5958/0974-0112.2019.00064.1>. Pp. 400-404.
- Aries, S., 2019.** Etude d'adaptation des variétés de la culture de fraise aux conditions Agro-climatiques de la Wilaya de Jijel. Faculté des sciences de la nature et de la vie Jijel. Pp. 1-67.
- Arif, F., 2015.** Effets du stress salin et d'osmoprotecteurs naturels sur la germination de blé dur (*Triticum durum*) inoculé par *Pseudomonas fluorescens*. Thèse Faculté des sciences de la nature et de la vie. Microbiologie Appliquée. Sétif. Pp. 1-205.
- Bakkali Bouarrakia, M., 2018.** Isolement et caractérisation des rhizobactéries isolées de la rhizosphère de la légumineuse *Cytisus monspessulanus*. PFE Faculté des sciences et techniques. Tanger. Pp. 1-85.
- Bakker, AW, Schippers, B., 1987.** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. Mediated plant growth stimulation. *Soil Biol. Biochem*. Vol. 19. Pp. 451-7.
- Blumer, C, Haas, D., 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol*. Vol. 173. Pp. 170-177.

- Cormier, M.J., 2015.** Gestion optimisée de l'irrigation du fraisier à jours neutres. Université de Laval. Québec. Pp. 1-72.
- El habti, C., 2020.** Le Maroc 11ème producteur mondial de fraises en 2018 [WWW Document]. Agripeche. URL <http://agripeche.com/4811-fao-le-maroc-11eme-producteur-mondial-de-fraises-en-2018.html> (accessed 7.2.22).
- Fahsi, N., Mahdi, I., Mesfioui, A., Biskri, L., Allaoui, A., 2021.** Phosphate solubilizing rhizobacteria isolated from jujube ziziphus lotus plant stimulate wheat germination rate and seedlings growth. PeerJ Vol. 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.11583>. Pp.1-23.
- Haddaoui, O., 2020.** Étude d'un concept novateur de culture du fraisier en buttes semi-permanentes : évaluation d'un substrat adapté. Université de Laval. Québec. Pp. 1-85.
- Hosseini, A., Hosseini, M., Schausberger, P., 2022a.** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Defense of Strawberry Plants Against Spider Mites. Frontiers in Plant Science. Vol. 12.. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.783578>. Pp. 1-12.
- Hosseini, A., Hosseini, M., Schausberger, P., 2022b.** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Defense of Strawberry Plants Against Spider Mites. Frontiers in Plant Science. Vol. 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.783578>. Pp. 1-12.
- Khadija, T., Hind, H., 2021.** Etude de l'effet de l'irradiation sur le couple symbiotique rhizobia-d'arachide. Faculté des sciences et techniques. Tanger. Pp. 1-53.
- Kumar, A, Devi, S, Patil, S, Payal, C, et Negi, S., 2012.** Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study, Recent Research in Science and Technology, Vol. 4. No. 1. Pp. 1–5.
- Ladjabi, C., 2019.** Isolement et identification des bactéries dans la rhizosphère de 5 variétés de fèves et détermination leurs caractères PGPR. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Constantine. Pp. 1-89.
- Laouici, C., Rida, A., 2017.** Evaluation de la contamination métallique du fraisier cultivé au niveau de la région de Sidi Abdelaziz Jijel. Faculté des Science de la Nature et de la Vie. Jijel. Pp. 1-90.

- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M., 2013.** The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 37. No. 5. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>. Pp. 634-663.
- Mouden, N., Benkirane, R., Ouazzani Touhami, A., Douira, A., 2013.** Mycoflore de quelques variétés du fraisier (*Fragaria ananassa* L.), cultivées dans la région du Gharb et le Loukkos (Maroc). *Journal of Applied Biosciences*. Vol. 61. Pp. 4490–4514.
- Mouna, Y., el Azzouzi, H., 2021.** Evaluation des activités PGP des endophytes isolés à partir des légumineuses fourragères : inoculation du blé. *Faculté des sciences et techniques*. Tanger. Pp. 1-66.
- Naik R.P., Sakthivel N., 2006.** Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res Microbiol*, Vol. 157. doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.009. Pp. 538-546.
- Pikovskaya, R.I., 1948.** Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*. Vol.17. Pp. 362-370.
- Sebihi, F.Z., 2016.** Effet PGPR des souches de *Pseudomonas fluorescens* isolées de la rhizosphère du blé cultivé dans la région de Constantine. *Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département d'Écologie et de Biologie. Génomique et Biotechnologie Avancés*. CONSTANTINE. Pp. 1-113.
- Soumare, A., Boubekri, K., Lyamlouli, K., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Kouisni, L., 2020.** From Isolation of Phosphate Solubilizing Microbes to Their Formulation and Use as Biofertilizers: Status and Needs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00425>. Pp. 1-14.
- Takeshi, K., Sumika, H., Yoshitake, S., Kenji, Y., 2017.** PGPR Improves Yield of Strawberry Species under Less-Fertilized Conditions. *Environ. Control Bio*. Vol. 55. No. 3. Pp. 121–128.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Nasrulhaq Boyce, A., 2016.** Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. *Molecules*. Vol. 21. No. 5. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>. Pp. 1-117.

Wohler I., 1997. Auxin-indole derivatives in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. *Microbiol Res.* Vol. 152. Pp. 399-405.

Zaidi. A, Khan. MS, Ahemad. M, Oves. M, Wani. PA., 2009. “Recent Advances in Plant Growth Promotion by Phosphate-Solubilizing Microbes”. In. *Microbial Strategies for Crop Improvement*, Springer-Verlag. Pp. 23-50.

ANNEXES

Annexe 1 : milieux de culture

Milieu LB (g/l) :

Composition	Quantité
Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de Sodium	10 g
Eau Distillée	1000 ml

Milieu PVK (Pikovskaya) :

Composition	Quantité
Glucose	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
Na Cl	0,2 g
KCl	0,2 g
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
Mn SO ₄ , H ₂ O	0,002 g
Fe SO ₄ , 7H ₂ O	0,002 g
Extrait de levure	0,5 g
Phosphate tricalcique	5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

On fait dissoudre les ingrédients dans 1 L d'eau distillée et ajuster le pH à 6,8. Ensuite, le milieu est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

Annexe 2 : Réactifs et colorants

Réactif de Salkowski :

Composition	Quantité
Acide perchlorique	150 ml
FeCl ₃ , 6H ₂ O, 0,5M	7,5 ml
Eau distillé stérile	250 ml

Réactif de Violet de gentiane phénique :

Violet de gentiane	10g
Phénol	20g
Ethanol (95 °GL)	100ml
Eau distillée	1000ml

Réactif de Safranine

Safranine	25g
Ethanol (95 °GL)	100 ml
Oxalate d'ammonium (25g/L)	800 ml

Décolorant acétone-alcool

Acétone	500 ml
Ethanol ou Méthanol, absolue	475 ml
Eau distillée	25 ml

Annexe 3 : Test de coloration de gram

Isolats	Gram	Forme	Isolats	Gram	Forme	Isolats	Gram	Forme
1 TM3	-	Cocci	3 RC4	-	Cocci en amas	4 RF2	-	Cocci
1 RC3	-	Leptospire	3 RF4	-	Cocci	4 TM3	-	Cocci
2 RF1	-	Cocci	4 TM1	+	Bacille	4 RF3	-	Cocci
2 RF3	-	Cocci en amas	4 RC1	-	Bacille	4 TM4	-	Cocci
3 TM2	-	Cocci	4 RF1	-	Leptospire	4 RC4	-	Cocci
3 RC3	+	Cocci/Leptospire	4 TM2	-	Cocci	4 RF4	-	Cocci
3 RF3	-	Cocci en amas	4 RC2	-	Cocci en chaine	5 TM1	-	Streptococce
5 TM2	-	Cocci	7 RF2	+	Cocci en amas	9 TM2	-	Cocci
5 RC2	-	Cocci	7 RF3	-	Cocci en amas	9 RF2	-	Cocci
5 RF2	+	Leptospire/ bacille	8 RF3	-	Cocci	9 RC3	-	Cocci
5 RF3	-	Cocci/ Cocci en chaine	8 TM4	-	Leptospire	9 RC4	+	Bacille
6 RF2	+	Cocci en amas	8 RC4	-	Cocci en	9 RF4	-	Cocci

					amas			
11 TM2	-	Cocci	8 RF4	-	Cocci	10 RC1	-	Bacille
11 RF2	-	Cocci	17 RF2	-	Cocci	10 RF1	-	Cocci
12 TM1	-	Bacille	19 RC1	+	Cocci en amas	10 RC2	+	Cocci/ Bacille
12 RF1	-	Cocci	20 RF1	+	Cocci	10 RF2	-	Cocci en amas
14 RC4	+	Bacille	20 RC4	-	Cocci	10 RF3	-	Cocci
15 RC4	-	Leptospire	23 TM3	+	Bacile fusiforme	30 RF4	-	Coccobacille
15 RF4	-	Cocci en amas	25 RC1	-	Bacille	30 TM2	-	Bacille
16 RF4	+	Cocci	30 RC3	-	Cocci	31 RC4	-	Cocci
35 RF3	-	Cocci	34 TM4	-	Cocci	34 TM2	-	Cocci en chaine
36 RF4	+	Leptospire	37 RF2	-	Leptospire	34 RF2	+	Cocci
22 RF2	-	Cocci	33 TM3	+	Bacille	21 RC2	-	Cocci
38 RF3	-	Cocci en amas	33 RC4	-	Leptospire	24 RC1	-	Coccobacille
32 RC1	-	Cocci	33 RF4	-	Cocci	2TM2	-	Cocci

Annexe 4 : Préparation d'une solution de tampon phosphate (pH 7.1)

Pour préparer une solution tampon phosphate (pH 7.1), il faut avoir deux solutions, une solution A et une solution B :

Solution A	Solution B
Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) : 8.89 g Eau distillé stérile : 250 ml	Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) : 5.99 g Eau distillé stérile : 250 ml
Additionner les deux solutions l'un sur l'autre puis vérifier le pH 7.1.	

Annexe 5 : La courbe d'étalonnage de l'AIA

On veut à partir d'une solution mère d'AIA de concentration connue (100 µg/ml) obtenir des tubes avec les concentrations suivantes : 0,1,2,3,4,5,7,10,20,30,40,50,60,70,80,90 et 100 µg/ml.

Pipetages Tubes	Concentration d'AIA dans chaque tube en µg/ml	Volume solution mère de concentration 100µg/ml	Volume d'eau distillé ajouté	Volume final (ml)
1	0	0 ml	3 ml	3 ml
2	1	0,03 ml	2,97 ml	3 ml
3	2	0,06 ml	2,94 ml	3 ml
4	3	0,09 ml	2,91 ml	3 ml
5	4	0,12 ml	2,88 ml	3 ml
6	5	0,15 ml	2,85 ml	3 ml
7	7	0,21 ml	2,79 ml	3 ml
8	10	0,3 ml	2,7 ml	3 ml
9	20	0,6 ml	2,4 ml	3 ml
10	30	0,9 ml	2,1 ml	3 ml
11	40	1,2 ml	1,8 ml	3 ml
12	50	1,5 ml	1,5 ml	3 ml
13	60	1,8 ml	1,2 ml	3 ml
14	70	2,1 ml	0,9 ml	3 ml
15	80	2,4 ml	0,6 ml	3 ml
16	90	2,7 ml	0,3 ml	3 ml
17	100	3 ml	0 ml	3 ml

La concentration de l'AIA est mesurée par spectrophotométrie à 535nm.

Concentration d'AIA (µg/ml)	Absorbance (535nm)
0	0.008
1	0.042
2	0.120
3	0.101
4	0.098
5	0.079
7	0.047
10	0.022
20	0.218
30	0.406
40	0.646

50	0.751
60	0.528
70	1.190
80	1.259
90	0.945
100	1.580



Figure 12 : Les différentes concentrations d'AIA en µg/ml

La gamme étalon d'AIA est donc :

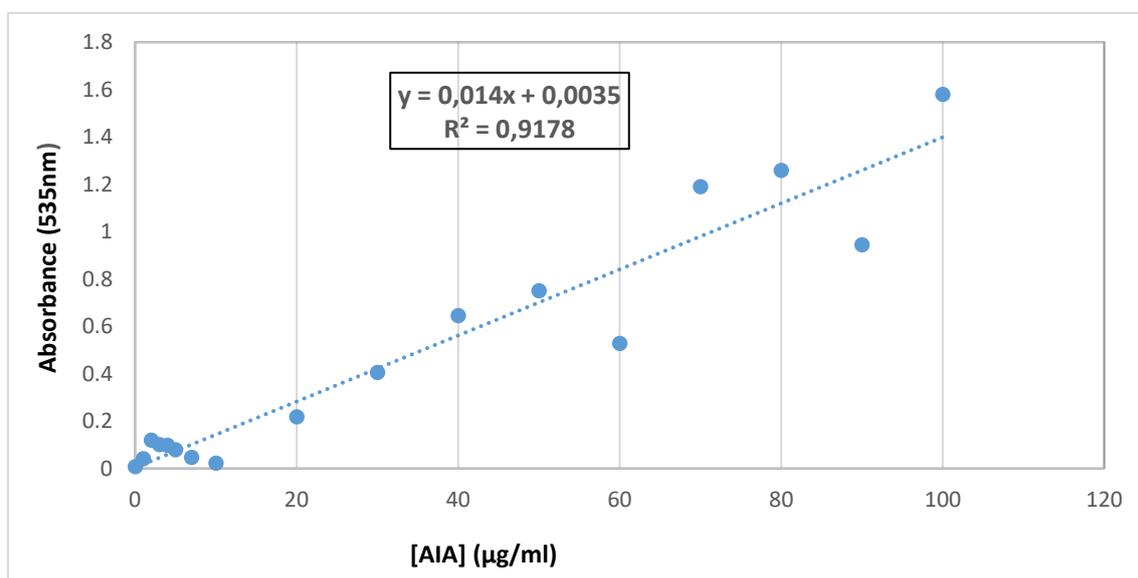


Tableau des résultats de l'absorbance à 535nm des isolats testés

Souches N°	Absorbance dans 535nm						
1TM3	1,549	10RC1	0,454	21RC2	1,020	34TM2	0,707
2RF1	0,150	11RF2	0,319	22RF2	1,523	35RF3	0,411
3RF3	0,188	12RF1	0,599	23TM3	0,253	36RF4	0,594

4TM4	0,165	14RC4	0,524	24RC1	0,568	37RF2	0,459
5TM1	0,869	15RF4	0,499	25RC1	0,466	38RF3	0,909
6RF2	0,156	16RF4	0,505	30RF4	0,748		
7RF2	0,148	17RF2	0,312	31RC4	0,201		
8RC4	0,233	19RC1	0,362	32RC1	0,305		
9RC3	0,230	20RF1	0,613	33TM3	0,351		

Tableau des résultats des concentrations des isolats testés en AIA

Souches N°	Concentration en µg/ml						
1TM3	110,77	10RC1	32,28	21RC2	72,85	34TM2	50,42
2RF1	10,50	11RF2	22,61	22RF2	108,91	35RF3	29,20
3RF3	13,22	12RF1	42,68	23TM3	17,88	36RF4	42,32
4TM4	11,57	14RC4	37,30	24RC1	40,46	37RF2	32,64
5TM1	62,03	15RF4	35,51	25RC1	33,14	38RF3	64,90
6RF2	10,93	16RF4	35,94	30RF4	53,36		
7RF2	10,35	17RF2	22,11	31RC4	14,15		
8RC4	16,44	19RC1	25,69	32RC1	21,60		
9RC3	16,23	20RF1	43,68	33TM3	24,90		