REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليـــم العالـــي والبحـــث العلمـــي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Ecole Nationale Supérieure Agronomique — **المدرسة الوطنية العليا للفلاحة**

Département: Productions végétales — **القسم: الانتاج النباتي**

Spécialité: Ressources génétiques et amélioration des productions végétales — **التخصص: الموارد الوراثية وتحسين الإنتاج النباتي**

Mémoire De Fin D'études
Pour L'obtention Du Diplôme De Master En Sciences Agronomiques

THEME

Amélioration de la performance des semences de blé dur *(Triticum durum)* par des techniques biotechnologiques et l'ingénierie du microbiome.

Présenté par : **GHEZAILI Ines** Soutenu Publiquement le 25 /09/2024

Devant le jury composé de :

Président :	**M. MEFTI Mohammed**	**(Prof - ENSA)**
Promoteur :	**M. RAHMOUNE Bilal**	**(MCA-ENSA)**
Examinateurs :	**Mme. MOUSSAOUI Sawsen**	**(MAA-ENSA)**

Promotion : 2019-2024

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux ……...X
Listes des figures……...XI
Liste des abréviations……..…XIII
Liste des annexes ……XIV
Introduction ……..……...1
Synthèse bibliographique ……..……...3
Chapitre I : Microbiome des plantes et ingénierie du microbiome……..……....4
1. Définition et généralités sur le microbiome……...…….5
2. Importance du microbiome…….6
3. Composition, diversité du microbiome……...……7
4. Définition de l'ingénierie du microbiome……..…….9
5. Objectifs de l'ingénierie du microbiome des plantes……..9
6. Outils de l'ingénierie du microbiome des plantes…….10
7. Méthodes d'ingénierie du microbiome végétale……...……11
8. Application de l'ingénierie du microbiome pour améliorer la performance des semences..12
9. Avenir de l'ingénierie du microbiome dans l'agriculture durable…….....13
10. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria(PGPR)……....13
A. Définition……..……...13
B. Rôle des PGPR……....14
C. Effet des PGPR sur la germination et la qualité des semences…….....…14
D. Resistance aux pathogènes du sol……...…15
11. Microbiome phyllosphèrique……15
1) Définition…….……15
2) Rôle et importance du Microbiome phyllosphèrique…….……..16

Chapitre II : Semences et blé dur……...……18
A. Semences……19
1. Définition et importance des semences ……...……19
2. Facteurs influençant la qualité et la rentabilité des semences……..……19
3. Qualité semencière……..……..20
B. Blé dur (*Triticum durum)* ……..……22
1. Origine et importance du blé……..22
2. Production du blé dans le monde……22
3. Production du blé en Algérie……... 23
4. Principaux genres fongiques rencontrés sur les grains de blé……23
5. Présentation du grain de blé……...……24
5.1. Structure et composition des grains……...……24

Chapitre III : Biotechnologies innovantes appliquées aux semences……..……26
1. Méthodes innovantes récentes de traitement des semences……..…….27
2. Enrobage et encapsulation des semences……...……27
3. Technologies d'enrobage des semences…….……28

4. Équipements d'enrobage……29
5. Matériels d'enrobage……..…31
6. Types d'enrobage……...……33
7. Effets de l'enrobage des semences et amélioration des cultures……34
8. Durée de conservation des semences enrobées……..…36

Matériel et méthodes……..……..37

I. Objectif de travail……...……37
II. Lieu d'expérimentation……..……37
III. Matériel utilisés……..……37
1. Matériel biologique……..……37
2. Matériel végétal……..…37

IV. Méthodes de travail……...……..38
Partie 1 : Isolement et caractérisation des souches PGPB……..……38
1. Isolement et purification des souches PGPB……38
1.1. Isolement des souches PGPB……..38
1.2. Purification des isolats PGPB……..……38
1.3. Conservation des isolats……..……38
2. Identification et caractérisation des PGPB……..……39
2.1. Caractérisation macroscopique……39
2.2. Caractérisation microscopique……39
2.2.1. Coloration différentielle de Gram……..39
3. Caractérisation biochimique……...……40
3.1. Étude des enzymes respiratoires……..…….40
3.1.1. Recherche de la catalase……40
3.1.2. Recherche de l'oxydase……...…40
3.2. Caractérisation biochimique des isolats par les galeries API……..……41
3.2.1. Galerie API 20 E……..……..41
3.3. Analyse des traits PGP des souches……42
3.3.1. Fixation d'azote atmosphérique……..……42
3.3.2. Solubilisation du phosphore……...……42
3.3.3. Solubilisation du zinc……..……42
3.3.4. Test de mannitol-mobilité……...…42
3.4. Recherche de métabolites spécifiques à l'activité antifongique……..……43
3.4.1. Production de Cyanure d'hydrogène (HCN)……..……43
3.4.2. Production d'ammoniac (NH3)……..……43

Partie 2 : Développement et élaboration des formules d'enrobage……..……..…43

1. Étude de l'action antagoniste des isolats bactériens à l'égard des trois champignons par confrontation directe sur boite……..……..43
1.2. Méthode de confrontation directe par stries……43
2. Compatibilité des souches isolées……..……44
3. Extraction d'ADN bactérien ……..;……45
4. Classification et sélection des souches et design des formules d'enrobage……...47

5. Formules d'enrobage……..…48
6. Processus d'enrobage……49

Partie 3 : Évaluation du potentiel des semences enrobées……50
1. Sol agricole utilisé……50
2. Stérilisation et mise en germination……50
3. Protocole de l'expérimentation……51
3.1. Première expérimentation……51
3.2. Deuxième expérimentation……52
4. Paramètres étudiés……52

Résultats et discussion……54
Partie 1 : Isolement et caractérisation des souches PGPB……55
1. Caractérisation et identification des souches……55
1.1. Caractérisation macroscopique……55
1.2. Caractérisation microscopique……55
1.3. Caractérisation biochimique……57
1.3.1. Étude des enzymes respiratoires……57
A. Test catalase……57
B. Test oxydase……57
1.4. Caractérisation biochimique des isolats par les galeries API……58
1.4.1. Galeries API 20 E……58
1.5. Analyse des caractères PGPB……59
1.5.1. Fixation d'azote atmosphérique……60
1.5.2. Solubilisation du phosphore……60
1.5.3. Solubilisation du zinc……61
1.5.4. Test de mannitol-mobilité……63
1.6. Recherche de métabolites spécifiques à l'activité antifongique……64
1.6.1. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)……64
1.6.2. Production d'ammoniac (NH3)……65

Partie 2 : Développement et élaboration des formules d'enrobage……66
1. Étude de l'action antagoniste des isolats bactériens à l'égard des trois champignons par confrontation directe sur boite……66
2. Compatibilité des souches isolées……68
3. Identification moléculaire des souches……69
4. Classification et sélection des souches et design des formules d'enrobage……70
5. Enrobage des semences……71
Partie 3 : Évaluation du potentiel des semences enrobées……72
1. Effets de l'enrobage des consortiums sur la croissance végétative ……72
2. Analyse en composantes principales (ACP)……76
Discussion……78
Conclusion……84
Références bibliographiques……87
Annexes ……105

Résumé

Cette étude vise à explorer le potentiel d'exploitation des ressources microbiennes naturelles, en particulier les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB), isolées de la rhizosphère et de la phyllosphère des plantes, afin de développer des formulations de consortia à appliquer via l'enrobage des semences, dans le but d'améliorer les performances, notamment des semences de blé dur.

Tout d'abord, une caractérisation morphologique et biochimique de six isolats nommés (Ei, L1, Pro, Ri, 17 et 26) a été effectuée à l'aide de divers tests d'analyse appropriés. Tous les isolats se sont révélés être des bactéries à Gram négatif avec des capacités variées de promotion de la croissance des plantes, notamment la solubilisation du phosphore et la fixation de l'azote. Les souches ont également montré un potentiel de contrôle des champignons pathogènes, en particulier la souche S17, qui a pu inhiber la croissance des trois champignons testés : *Fusarium oxysporum*, *Microdochium nivale* et *Microdochium majus*.

Ensuite, pour le développement de formulations intégrant des consortiums de plusieurs souches, la compatibilité entre celles-ci a été évaluée. Les résultats ont montré que toutes nos souches étaient compatibles et pouvaient être combinées en consortiums efficaces pour le biocontrôle et la stimulation de la croissance des plantes. Quatre formulations ont été développées en se basant sur les caractéristiques et la complémentarité des bactéries, avec des combinaisons variant de 2 à 4 souches. Ces consortiums de souches PGPB ont été enrobés sur des semences de blé dur. Deux méthodes d'enrobage ont été employées : une immersion des semences dans une solution bactérienne suivie d'encapsulation, et une incorporation de polymères dans la solution bactérienne avant l'enrobage. L'efficacité des différentes formulations a été évaluée en fonction de la performance des semences

Enfin, l'efficacité de l'enrobage des semences avec des bactéries PGPB sur la germination du blé a été évaluée. Les résultats montrent que les traitements enrichis en PGPB, en particulier les formules F3, F5 et F2, ont significativement amélioré la germination ainsi que la croissance des tiges et des racines du blé dur par rapport au témoin. L'analyse en composantes principales a révélé la relation entre les différents paramètres, mettant en évidence les formulations les plus efficaces.

Cette première étude confirme que les formulations d'enrobage contenant des PGPB sont prometteuses pour améliorer la croissance des semences de blé dur, offrant ainsi une alternative viable pour renforcer la résilience des cultures face aux stress climatiques. Ces résultats ouvrent des perspectives pour des recherches futures visant à optimiser les technologies d'enrobage de semences et à évaluer leur application à plus grande échelle.

Mots clés : PGPB, Enrobage des semences, Consortium de bactéries, Performance des semences, Blé dur.

Abstract

This study aims to explore the potential of utilizing natural microbial resources, particularly plant growth-promoting bacteria (PGPB), isolated from the rhizosphere and phyllosphere of plants, to develop consortium formulations to be applied via seed coating, with the goal of enhancing the performance of durum wheat seeds.

Firstly, a morphological and biochemical characterization of six isolates named (Ei, L1, Pro, Ri, S17, and S26) was conducted using various appropriate analytical tests. All isolates were found to be Gram-negative bacteria with varying plant growth-promoting capacities, including phosphorus solubilization and nitrogen fixation. The strains also showed potential in controlling pathogenic fungi, particularly strain S17, which was able to inhibit the growth of the three tested fungi: *Fusarium oxysporum*, *Microdochium nivale*, and *Microdochium majus*.

Next, to develop formulations incorporating consortia of several strains, the compatibility between them was evaluated. The results showed that all of our strains were compatible and could be combined into effective consortia for biocontrol and plant growth stimulation. Four formulations were developed based on the characteristics and complementarity of the bacteria, with combinations ranging from 2 to 4 strains. The durum wheat seed were coated with PGPB. Two coating methods were used: immersion of the seeds in a bacterial solution followed by encapsulation, and incorporation of polymers into the bacterial solution before coating. The effectiveness of the different formulations was evaluated based on the performance of the seeds.

Finally, the effectiveness of seed coating with PGPB bacteria on durum wheat germination was assessed. The results showed that PGPB-enriched treatments, particularly formulations F3, F5, and F2, significantly improved germination as well as stem and root growth of durum wheat compared to the control. Principal component analysis revealed notable differences between treatments, highlighting the most effective formulations.

This preliminary study confirms that seed coating formulations containing PGPB show great promise in enhancing durum wheat growth, providing an effective alternative to boost crop resilience against climate stress. These findings open the door to future research focused on optimizing seed coating technologies and evaluating their scalability for broader agricultural applications.

Keywords: PGPB, Seed coating, Bacterial consortia, Seed performance, Durum wheat.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى استكشاف إمكانية استغلال الموارد الميكروبية الطبيعية، ولا سيما البكتيريا المحفزة لنمو النباتات (PGPB) المستخرجة من منطقة الجذور وسطح الأوراق، من أجل تطوير تركيبات من التجمعات الميكروبية لتطبيقها من خلال تغليف البذور بهدف تحسين أداء بذور القمح الصلب.

أولاً، تم إجراء توصيف مورفولوجي وكيميائي حيوي لستة عزلات تُدعى (17, 26 ,Ri ,Pro ,L1و Ei) باستخدام اختبارات تحليلية مناسبة. وُجد أن جميع العزلات هي بكتيريا سالبة الجرام ولها قدرات متنوعة على تحفيز نمو النباتات، بما في ذلك إذابة الفوسفور وتثبيت النيتروجين كما أظهرت السلالات إمكانات في مكافحة الفطريات الممرضة، وخاصة السلالة S17 التي تمكنت من تثبيط نمو الفطريات الثلاثة المختبر *Microdochium majus*، *Microdochium nivale* و *Fusarium oxysporum* بعد ذلك، من أجل تطوير تركيبات تضم تجمعات ميكروبية متعددة السلالات، تم تقييم التوافق بينها. أظهرت النتائج أن جميع سلالاتنا كانت متوافقة ويمكن دمجها في تجمعات فعالة للتحكم البيولوجي وتحفيز نمو النباتات. تم تطوير أربع تركيبات استناداً إلى خصائص وتكامل البكتيريا، مع دمج سلالات تتراوح من 2 إلى 4. تم تغليف هذه التجمعات الميكروبية PGPB على بذور القمح الصلب. تم استخدام طريقتين للتغليف: غمر البذور في محلول بكتيري يتبعه تغليف، وإدخال البوليمرات في المحلول البكتيري قبل التغليف. تم تقييم فعالية التركيب المختلفة بناءً على أداء البذور.أخيراً، تم تقييم فعالية تغليف البذور بالبكتيريا المحفزة لنمو النباتات على إنبات القمح الصلب.

أظهرت النتائج أن المعالجات المخصبة بالبكتيريا المحفزة لنمو النباتات، ولا سيما التركيبات F2، وF5، F3 ، حسنت بشكل ملحوظ الإنبات وكذلك نمو السيقان والجذور مقارنة بالعينة الضابطة. كشفت تحليل المكونات الرئيسية عن اختلافات ملحوظة بين المعالجات، مما يبرز التركيبات الأكثر فعالية.

تؤكد هذه الدراسة الأولية أن التركيبات المغلفة التي تحتوي على البكتيريا المحفزة لنمو النباتات تعد واعدة في تحسين نمو بذور القمح الصلب، مما يوفر بديلاً فعالاً لتعزيز مرونة المحاصيل في مواجهة الضغوط المناخية. تفتح هذه النتائج المجال أمام أبحاث مستقبلية تهدف إلى تحسين تقنيات تغليف البذور وتقييم تطبيقاتها على نطاق أوسع.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المحفزة لنمو النباتات (PGPB) ,تغليف البذور, تجمعات البكتيريا، أداء البذور، القمح الصلب.