

UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de  
**MASTER ACADEMIQUE**

**Domaine:** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière:** Sciences Biologique

**Spécialité:** Microbiologie appliquée

**Présenté par:**

GHARIB Aïcha et LABRECHE Latifa

**Thème:**

**Biocontrôle de l'altérnariose et de la curvulariose de la luzerne (*Medicago sativa* L.) par inoculation avec trois souches sinorhizobiennes.**

Soutenu publiquement

Le : 19/06/2022

Devant le jury:

Mme SALHI N.	Pr	Présidente	UKM Ouargla
M. AZIB S.	MCB	Promoteur	UKM Ouargla
Mme ATTAB S.	MAA	Co- promoteur	UKM Ouargla
Mme Beldi N.	MCA	Examinatrice	UKM Ouargla

Année Universitaire : 2021/2022

## REMERCIEMENTS

*Avant tout, Nous remercions noter **DIEU** de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience de réaliser ce modeste travail.*

*Nous remercions plus particulièrement : Monsieur **AZIB Salim** pour l'encadrement, les efforts, les encouragements et les précieux conseils et la confiance qu'il nous a prouvés durant cette période, il nous a ménagé ni son temps ni ces efforts pour me faciliter la tâche.*

*Ainsi, nous remercions vont à l'encontre de Mme **ATTAB Sara** qui a su être patiente avec nous durant les étapes critiques de la réalisation de ce travail où nous étions obligés de nous adapter aux nouvelles situations a chaque fois.*

*Nous souhaitons adresser mes remerciements à professeure **SALHI Nesrine**, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.*

*Nous remercions également madame **BELDI Nadia**, pour le temps qu'elle nous accorde en acceptant d'examiner ce modeste travail.*

*Un immense merci est adressé également à Monsieur **BOUZEGUAGUE S**, du laboratoire Bio Ressources Sahariennes (BRS), nous sont oublier pas toutes les équipes de la laboratoires.*

*Un immense merci est adressé également à Monsieur **Dr. LABRECHE Mahmoud** qui m'a donné conseil et confiance.*

*Nous tenons à exprimer notre gratitude et nos remerciements pour nos chers parents et nos familles et toutes les personnes qui ont participé à l'accomplissement de ce travail, qui nous ont appris une infinité de choses et qui nous ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail:*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père « Mohammed Seghir»*

*A maman «Yamina » pour l'amour qu'elle m'a toujours accordé en témoignage de ma reconnaissance envers sa confiance, ses sacrifices et sa tendresse.*

*Qu'ALLAH les protège et les garde.*

*A mes sœurs, mes frères je leurs souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.*

*A toute la famille «LABRECHE»*

*A Mon cher binôme «Aïcha» et à toute sa famille.*

*A mes amis «Farida», «Chaima», «Hind»*

*J'espère qu'un jour, je pourrai leurs rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que dieu leur prête bonheur et longue vie.*

*Latífa Labreche*

### *Dédicaces*

*A mes chers parents F. Ben Abdallah et belkasma , pour tous leurs sacrifices,  
leur amour.*

*A mes sœurs et mes frères, pour leur soutien infailible, A mes amies Farida*

*A mon binôme Latifa.*

*Aïcha .*

## Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Listes des photo	
Liste des abréviations	
Introduction .....	1
<b>Chapitre I: Synthèse bibliographique</b>	
I.1. Maladies fongiques des plantes.....	3
I.1.1. Groupes des champignons pathogènes.....	3
I.1.2. Développement des maladies fongiques.....	3
I.1.2.1. Triangle de la maladie.....	3
I.1.2.2. Étapes de développement des maladies fongiques.....	4
a. Contact.....	4
b. Pénétration.....	4
c. Infection.....	4
d. Dissémination.....	5
e. Conservation.....	5
I.2. Maladies fongiques de la luzerne.....	5
I.2.1. Généralités sur la luzerne.....	5
I.2.1.1. L'importance de la luzerne.....	6
I.2.1.2. Classification botanique de luzerne.....	6
I.2.1.3. Caractère généraux.....	7
I.2.2. Principales maladies cryptogamiques de la luzerne.....	8
I.2.2.1. Maladies causant des symptômes localisés (taches foliaires).....	8
a. Tache lepto ( <i>Leptoshærulina briosiana</i> ).....	8
b. Tige noire ( <i>Phoma medicaginis</i> ).....	9
c. Tache commune( <i>Pseudopeziza medicaginis</i> ).....	9
d. Stemphyliose.....	10

e. Rouille ( <i>Uromyces medicaginis-orbicularis</i> ).....	11
f. Mildiou.....	11
g. Sclérotiniose ( <i>Sclerotinia trifoliorum</i> ).....	11
I.2.2.2. Maladies causant des symptômes systémiques.....	12
I.2.2.2.1. Maladies affectant les racines.....	12
a. Pourridié phytophthoréen ( <i>Phytophthora megasperma</i> sp. <i>medicaginis</i> ).....	12
b. Pourridié fusarien ( <i>Fusarium</i> spp.).....	13
I.2.2.2.2. Maladies affectant le système vasculaire.....	14
a. Flétrissement verticillien ( <i>Verticillium albo-atrum</i> ).....	14
I.2.2.2.3. Autres maladies.....	15
a. L'anthracnose.....	15
b. L'alternariose.....	16
c. Curvulariose.....	16
I.2.3. Maladies des semences de luzerne.....	17
I.3. Lutte biologique contre les phytopathologies cryptogamiques.....	18
I.4. Utilisation des Rhizobia dans la lutte biologique contre les maladies fongiques.....	18
I.4.1. Caractéristiques des Rhizobia.....	18
I.4.2. Classification des Rhizobia.....	19
I.4.3. Lutte biologique par les rhizobia.....	19
I.4.4. Interaction rhizobia-Légumineuses.....	20
I.4.5. Importance de la symbiose.....	21
I.4.5.1. Importance écologique.....	22
I.4.5.2. Importance économique.....	22

## **Chapitre II: Matériel et méthodes**

II. Matériel et méthodes.....	23
II.1. Matériel biologique.....	23
II.1.1. Matériel végétal.....	23
II.1.2. Matériel microbiologique.....	23
II.1.2.1. Souches de rhizobiennes.....	23
II.1.2.2. Souches fongiques.....	24
II.2. Méthodes d'étude.....	24
II.2.1. Préparation du substrat de culture.....	24
II.2.1.1. Collecte du sable.....	24

II.2.1.2. Déminéralisation et stérilisation.....	24
II.2.1.3. Mesure du pH et de le conductivité électrique ( CE) avant et après traitement.....	25
II.2.2. Préparation de la solution nutritive et des milieux de cultures.....	26
II.2.2.1. Préparation de la solution nutritive de Fâhareus.....	26
II.2.2.2. Préparations du milieu YEM.....	26
II.2.2.3. Préparation du milieu PDA.....	27
II.2.3. Souches rhizobiennes.....	27
II.2.3.1. Isolements des rhizobiums à partir des nodules.....	27
II.2.3.2. .Repiquage des souches.....	29
II.2.3.3. Préparation l'inoculum.....	29
II.2.4. Souches fongiques.....	30
II.2.4.1. Revivification des champignons.....	30
II.2.4.2. Production des spores.....	30
II.2.5. Désinfections et pré-germination des graines.....	30
II.2.6. Plan expérimentale.....	31
II.2.6.1. Inoculation des graines.....	31
II.2.6.2. Remplissage des pots.....	32
II.2.6.3. Semi des graines.....	32
II.2.6.4. Inoculation fongiques.....	33.
II.2.6.5. Description du dispositif expérimentale.....	33
II.2.7. Irrigation et suivre des plantes.....	34
II.3. Paramètres mesurés.....	34
II.3.1. Croissance et de la biomasse des plantes.....	34
II.3.2. Incidence de la maladie.....	35
II.3.3. Agressivité de la maladie.....	35
II.4. Analyses statistiques.....	36

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

III.1. Valeurs de pH et de CE du sable.....	37
III.2. Valeurs de la densité optique (DO) des inoculums.....	37
III.3. Croissance des plantes.....	38
III.3.1. Hauteur de la partie aérienne.....	38
III.3.2. Longueur de la partie souterraine.....	39
III.4. Poids secs.....	40

III.4.1. Poids sec de la partie aérienne.....	39
III.4.2. Poids sec de la partie souterraine.....	40
III.5. Nombre total des nodules.....	41
III.6. Incidence de la maladie.....	42
III.7. Agressivité de la maladie.....	43
Conclusion.....	44
Références bibliographies.....	48
Annexe	
Résumé	
Abstract	
الملخص	

### Liste des tableaux

N°	Titre	Page
<b>Tableau 1</b>	Caractéristiques physiologiques des souches sinorhizobiennes(O152 et E141) étudiées.	22
<b>Tableau 2</b>	Résultats des analyses physicochimiques de sable avant et après traitement.	35
<b>Tableau 3</b>	Résultats obtenus après lecture à 600 nm de la densité optique (DO) des souches.	36

### Liste des figures

N°	Titer	Page
<b>Figure1</b>	Stades de développement de la luzerne.	7
<b>Figure2</b>	Schéma de la distribution des espèces bactériennes nodultrices de légumineuses dans les classes des $\alpha$ et $\beta$ Proteobacteria.	19
<b>Figure3</b>	Processus de nodulation et de la fixation biologique de l'azote.	21
<b>Figure4</b>	Description du dispositif expérimentale	33
<b>Figure5</b>	Croissance des parties aériennes dans les différents traitements.	36
<b>Figure6</b>	Croissance des parties souterraines dans les différents traitements.	37
<b>Figure7</b>	Poids sec de la partie aérienne des plantes dans les différents traitements.	39
<b>Figure8</b>	poids sec de partie souterraines plantes dans les différents traitements.	40



<b>Figure9</b>	Moyenne de nombre de nodule dans des diffèrent traitement.	41
<b>Figure10</b>	Pourcentage d'incidence des maladies sur les plants dans différents traitements.	43
<b>Figure11</b>	Pourcentage d'agressivité des maladies sur les plants dans différents traitements.	43

### Listes des photo

<b>N°</b>	<b>Titer</b>	<b>Page</b>
<b>Photo 1</b>	La tache lepto de feuille de la luzerne.	8
<b>Photo 2</b>	Spring black stem caractérisé par des petites taches noires à brunes.	9
<b>Photo 3</b>	Tache commune des feuilles ( <i>Pseudopeziza medicaginis</i> ).	10
<b>Photo 4</b>	Taches sur feuilles de luzerne causées par le Stemphylium.	10
<b>Photo 5</b>	Les symptômes de mildiou sur les feuilles de la luzerne.	11
<b>Photo 6</b>	Sclérotés sur la tige.	12
<b>Photo 7</b>	Tiges et feuilles de luzerne blanchies par le Phytophthora.	13
<b>Photo 8</b>	Coupe longitudinale d'une racine infectée par le Fusarium présentant une décoloration brune rougeâtre foncée dans la stèle, ou au centre de la racine.	14
<b>Photo 9</b>	Symptômes de la fusariose sur la luzerne.	14
<b>Photo 10</b>	Symptômes de la verticilliose sur la luzerne.	15
<b>Photo 11</b>	Lésions formées par l'anthracnose les tiges.	16
<b>Photo 12</b>	Alternariose de la luzerne.	16
<b>Photo 13</b>	Brûlure des feuilles par Curvularia.	17
<b>Photo 14</b>	Etapes de traitement du sable .	24
<b>Photo 15</b>	Mesures de pH et de la CE.	25
<b>Photo 16</b>	Préparation le milieu YEM .	26
<b>Photo 17</b>	Isolements des rhizobiums.	28
<b>Photo 18</b>	Préparation des inoculums rhizobienne.	28
<b>Photo 19</b>	Préparations des inoculums fongiques.	29
<b>Photo 20</b>	désinfection des grains.	30
<b>Photo 21</b>	Graines prégermer.	30
<b>Photo 22</b>	Inoculation rhizobiennes des graines.	31
<b>Photo 23</b>	Remplissage des pots.	31
<b>Photo 24</b>	Semis des grains.	32
<b>Photo 25</b>	Inoculation fongiques.	32

<b>Photo26</b>	Mesures la longueur des racines et la hauteur tiges et mesures du poids des racines et des tiges	34
----------------	--	----

### Liste des abréviations

%	Pourcentage.
Cu	<i>Curvularia</i> sp.
Al	<i>Alternaria</i> sp.
T-	Témoin sans azote.
T+	Témoin avec azote.
G	Gramme.
C°	Degré Celsius.
Cm	Centimètre.
g/l	Gramme par litre.
l	litre.
(Ds/m )	Décisiemens par mètre.
DO	densités optiques.
Nm	Nanomètre.
Ph	Potential d'hydrogène .
CE	Conductivité électrique .
Tr / min	Tours par minute .
H	Heure.
PDA	Potato Dextrose Agar.
YEM	Yeast Extract Mannitol .
YMB	Yeast Mannitol Broth.
HT	Hauteur des tiges.
LR	Longueur des racines.
PSR	Poids secs des racines.
PST	Les poids secs des tiges .
NN	Nombre de nodules .
PGPR	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria.
PGPRi	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria intra cellulaire.
PGRPe	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria extracellulaire.
N2	Azote atmosphérique.
NH3	L'ammonium.

NH <sub>4</sub>	L'ammoniac.
KNO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Potassium nitrate.
HCN	Cyanure d'hydrogène .
BNL	Bactéries nodulant les légumineuses.
MgSO <sub>4</sub>	Sulfate de magnésium.
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphate de potassium monobasique.
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO	Cyclopentadiene ferrocène.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sodium hydrogen phosphate.
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	L'acide borique.
MnSO <sub>4</sub>	Sulfate de manganèse.
CuSO <sub>4</sub>	Sulfate de cuivre.
S	Souche.

# **Introduction**

## **Introduction**

Les légumineuses sont un groupe diversifié de plantes à fleurs qui comprend un certain nombre d'espèces importantes pour l'alimentation humaine et animale et pour les pâturages. Elles sont également une source de biocarburant (par exemple, le soja, *Pongamia pinnata*, luzerne) et peuvent améliorer la santé des sols et la productivité agricole (Ferguson et *al.*, 2019). Malheureusement ces plantes se caractérisent très souvent par des rendements faibles et instables. Cela s'explique, en particulier, par leur sensibilité aux maladies, ravageurs et autres contraintes abiotiques (froid, chaleur, sols pauvres, etc.) (Baudoin, 2001).

Les champignons constituent le groupe le plus diversifié d'agents pathogènes des plantes et sont responsables de 70 à 80% des maladies des plantes. Plus de 20 000 espèces de champignons sont de nature parasitaire et peuvent causer des maladies dans les cultures et les plantes (Ray et *al.*, 2017). Selon Dabé et *al.* (2017), de nombreuses cultures vivrières font l'objet d'attaque par des champignons phytopathogènes, surtout chez les plantes céréalières, et les légumineuses peuvent être impropres à la transformation et à la consommation.

Les maladies causées par des agents pathogènes fongiques ont un impact négatif sur la croissance et le développement des plantes et diminuent ainsi la productivité de nombreuses cultures économiques dans le monde (Ahammed et *al.*, 2021). Le coût élevé des fongicides, les exigences des marchés internationaux en termes de qualité des produits agricoles, les préoccupations environnementales et la santé des consommateurs sont autant d'éléments qui ne favorisent pas l'application de la lutte chimique. La stratégie est donc de développer une méthode alternative peu onéreuse par l'utilisation de certains agents de biocontrôle qui est compatible avec les préoccupations environnement (Deshwal et *al.*, 2003 ; Dabé et *al.*, 2017 ; Ahammed et *al.*, 2021).

Le sol héberge une grande diversité de communautés microbiennes qui interagissent entre elles et qui, dans la rhizosphère, interagissent aussi avec les racines des plantes (Alabouvette et Cordier, 2018). La rhizosphère est la région qui entoure les racines des plantes et où l'activité microbienne est maximale. Dans la rhizosphère, les activités bénéfiques et nocives des micro-organismes affectent la croissance et le développement des plantes. Les bactéries rhizosphériques mutualistes qui améliorent la croissance et la santé des plantes sont connues sous le nom de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) (Verma et *al.*, 2019). En effet, comme dans le cas des agents pathogènes, il existe une spécificité

d'espèce, c'est-à-dire que différentes espèces de légumineuses forment des associations symbiotiques avec différentes espèces de rhizobiums (Alabouvette et Cordier, 2018).

Les rhizobiums, qui ont été largement étudiés en tant que rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, se sont également avérés importants du point de vue du biocontrôle. Ces bactéries favorisent la croissance des plantes soit directement par la fixation de N<sub>2</sub>, l'apport de nutriments, la synthèse de phytohormones et la solubilisation de minéraux, soit indirectement comme agent de biocontrôle en inhibant la croissance d'agents pathogènes (Deshwal et *al.*, 2003).

Dans cette optique, l'objectif assigné à cette étude est d'évaluer le biocontrôle, *in vivo*, de deux maladies fongiques (*Alternaria sp* et *Curvularia sp.*) recensées récemment dans région de Ouargla, attaquant la luzerne (*Medicago sativa* L.) par inoculation avec trois souches rhizobiennes (O152; OI11;E141) provenant de différentes zones agricoles des régions de Ouargla et d'El Oued.

Afin d'atteindre cet objectif, notre étude sera organisée de la manière suivante :

-Un premier chapitre sera consacré à une synthèse bibliographique présentant les connaissances générales sur les maladies fongiques des plantes, des généralités sur la luzerne et ses principales maladies cryptogamiques. La lutte biologique contre ces maladies sera aussi examinée par l'utilisation des bactéries symbiotiques qui sont les rhizobia.

- Un deuxième chapitre sera celui du matériel et des méthodes adoptées pendant les expérimentations mises en œuvre.

- Un troisième chapitre traitera, quant à lui, les résultats obtenus et leurs discussions.

- En fin, le travail sera achevé par une conclusion générale qui comportera des suggestions et des perspectives.

***Chapitre I:***  
***Synthèse bibliographique***

## **I. Synthèse bibliographique**

### **I.1. Maladies fongiques des plantes**

Les champignons sont des eucaryotes présentant une très grande variété taxonomique du fait de l'organisation complexe de leur appareil végétatif et de leur mode de reproduction (Kerdouci et *al.*, 2020). Une variété de champignons sont connus pour causer d'importantes maladies des plantes, entraînant une perte importante dans les cultures agricoles (Suprpta, 2012).

Les effets d'une maladie sur la plante sont d'abord invisibles, mais peu après les changements deviennent visibles à l'œil nu car les réactions deviennent plus développées. Ces changements visibles sont appelés symptômes et la maladie peut être considérée comme étant toutes les réponses visibles et invisibles des tissus et cellules de la plante aboutissant à une malformation partielle ou totale et la mort de la plante (Abdiche et Bouziane, 2008). Les symptômes observés sont multiples, variés et atteignent tous les organes du végétal : pourritures, nécroses des fleurs, des fruits, des tiges, des feuilles; chancre sur les tissus de protection ; dépérissements, flétrissements des vaisseaux du bois (Pujari et *al.*, 2015). Plus de 10 000 espèces de champignons peuvent causer des maladies chez les plantes (Agrios, 2005 ; *in* Suprpta, 2012).

#### **I.1.1. Groupes des champignons pathogènes**

Les classes de champignons qui causent couramment des maladies des plantes sont les plasmodiophoromycètes (provoquant l'hernie des crucifères, la maladie des racines des céréales et la gale poudreuse de la pomme de terre), les oomycètes (provoquant la fonte des semis, le mildiou et la rouille blanche), les zygomycètes (provoquent la pourriture molle des fruits), les ascomycètes et les deutéromycètes (provoquent des taches foliaires, des brûlures, des chancres, des taches sur les fruits, des pourritures des fruits, des anthracoses, des pourritures de la tige, des pourritures des racines, des flétrissements vasculaires, la pourriture molle) et des basidiomycètes (provoquent des maladies de la rouille et du charbon) (Agrios, 2005 ; *in* Suprpta, 2012).

#### **I.1.2. Développement des maladies fongiques**

##### **I.1.2.1. Triangle de la maladie**



Pour qu'une maladie d'une plante se développe, trois composantes sont nécessaires: la plante et le pathogène doivent se mettre en contact et interagir, et les conditions de l'environnement qui doivent être favorables.

- La plante peut être plus ou moins résistante, sensible, jeune, âgée...etc.
- Le pathogène peut être plus ou moins virulent, actif, dormant ...etc.
- Les conditions de l'environnement peuvent affecter plus ou moins la croissance, la sensibilité et la résistance de la plante hôte, la croissance, la multiplication, le degré de virulence et la dispersion du pathogène... (Nasraoui, 2008).

### **I.1.2.2. Étapes de développement des maladies fongiques**

Le développement des maladies fongiques des plantes froment un cycle. Ce dernier implique des changements chez les plantes et chez les pathogènes qui durent une saison ou plus (Nasraoui, 2008). Les étapes de ce cycle sont :

#### **a. Contact**

Se réalise quand un pathogène se met en contact avec une plante. la propagule de champignon pathogène (spores, sclérotas, fragments mycéliens....) se déposent sur le plante. Cet inoculum en conservation provoque une infection primaire. Le contact réalisé à partir de l'infection primaire provoque les infections secondaires. Dans la plupart des cas, les propagules du pathogène sont transportées passivement, principalement par l'air, l'eau et les insectes (Nasraoui, 2008).

#### **b. Pénétration**

La pénétration des spores ou des fragments mycéliens se réalise directement par les ouvertures naturelles (les stomates, les hydathodes et les lenticelles), ou par les blessures (Nasraoui, 2008).

#### **c. Infection**

L'infection commence lorsque l'agent pathogène s'installe dans les cellules ou les tissus sensibles de la plante hôte et obtient des nutriments. Ainsi, l'agent pathogène se développe et/ou se multiplie pour attaquer plus ou moins rapidement la plante. Lors de l'infection, certains champignons pathogènes, dits nécrotrophes, tuent les cellules puis utilisent leur contenu

; d'autres, dits biotrophes, se nourrissent des cellules vivantes sans les tuer. Ils affectent l'intégrité structurelle et les processus physiologiques des cellules hôtes (Nasraoui, 2008).

#### **d. Dissémination**

Pour la plupart des champignons, les spores sont passivement transportées par différents vecteurs. Elles sont éjectées activement puis transportées par le vent à différentes distances en fonction de la turbulence et la vitesse de l'air.

L'eau est un important facteur de dissémination des spores et des fragments mycéliens. Ces propagules fongiques présentes dans le sol peuvent être transportées par les eaux de pluie ou d'irrigation qui coulent à la surface du sol.

Les animaux, en particulier les insectes sont aussi des vecteurs de dissémination des propagules (Nasraoui, 2008).

#### **e. Conservation**

Dans les conditions défavorables, les pathogènes se conservent principalement sous forme de spores, mais aussi sous forme de fragments mycéliens et de sclérotés. Ils se conservent dans le sol dans les débris des plantes infectées, dans les semences...

Les spores de dissémination (telles que les conidies) se conservent quelques semaines ou mois tandis que les spores de conservation (oospores, chlamydospores, téliospores,...) peuvent se conserver plusieurs années.

Les spores de conservation sont produites par les champignons pour surmonter la saison défavorable (Nasraoui, 2008).

## **I.2. Maladies fongiques de la luzerne**

### **I.2.1. Généralités sur la luzerne**

La luzerne (*Medicago sativa* subsp. *sativa* L.) est la culture fourragère la plus répandue dans le monde (Kesoju et al., 2016; Bouton, 2021). Elle appartient à la famille des *Fabaceae* (Mauriès, 2003). Elle est largement cultivée dans toutes les zones climatiques du monde sauf sous le climat tropical. Les principales régions productrices sont l'Amérique du Nord et du Sud et l'Europe. Seulement 3% de la superficie mondiale est cultivée en Afrique, mais la production est importante dans les pays d'Afrique du Nord où elle est cultivée sous irrigation. En Algérie, la luzerne couvre environ 10 000 ha (Melis et al., 2017).

### I.2.1.1. L'importance de la luzerne

La luzerne est une légumineuse fourragère connue pour sa forte teneur en protéines, en fibres de bonne qualité, en vitamines et en pigments. Elle est principalement utilisée sous forme de foin ou de bouchon déshydraté. Aussi utilisée dans les élevages d'animaux, elle ne contient pas de facteurs antinutritionnels pour les ruminants, mais son utilisation au pâturage peut nécessiter une certaine prudence en raison du risque de météorisation (Melis et *al.*, 2017). Elle est aussi caractérisée par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à une symbiose existant entre la plante et les bactéries qui se développent dans son système racinaire (Mauriès, 2003; Melis et *al.*, 2017). La luzerne a la particularité de s'insérer dans les rotations céréalières (Huyghe, 2014). Les avantages environnementaux de la luzerne par l'amélioration de la structure du sol, l'augmentation de la fertilité des sols par la fixation d'azote, la réduction de l'érosion du sol et une plus grande biodiversité des sols sont des avantages environnementaux obtenus par la culture de la luzerne (Sellahi, 2008 ; Melis et *al.*, 2017).

### I.2.1.2. Classification botanique de luzerne

La luzerne (*Medicago sativa* L) est présente dans la nature sous forme d'espèces cultivées ou sauvages. Elle appartient à l'ordre des *Fabales*, à la famille des *Fabaceae* (Milić et *al.*, 2016). Sur la base de la structure phylogénétique, les *Fabaceae* ont été subdivisés en six sous-familles et la luzerne appartient à la sous-famille de *Papilionoideae*, à la tribu des *Trifolieae* et au genre *Medicago* (LPWG, 2017). Elle appartient au complexe *Medicago sativa* avec deux sous-espèces dominantes (*M. sativa* ssp. *sativa* et *M. sativa* ssp. *falcata*) et une sous-espèce moins développée *M. sativa* ssp. *glutinosa*. Le genre *Medicago* comprend plus de 60 espèces, dont les deux tiers sont des espèces annuelles (Milić et *al.*, 2016).

La taxonomie de la luzerne (*Medicago sativa* L.) est la suivante (Charaba, 2015 ; LPWG, 2017) :

Règne : *Plantae*  
Embranchement : *Spermatophytes*  
Sous- embranchement: *Angiospermes*  
Classe : *Dicotylédones*  
Sous- classe : *Rosidées*  
Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Sous-famille: *Papilionoideae*

Tribus : *Trifolieae*

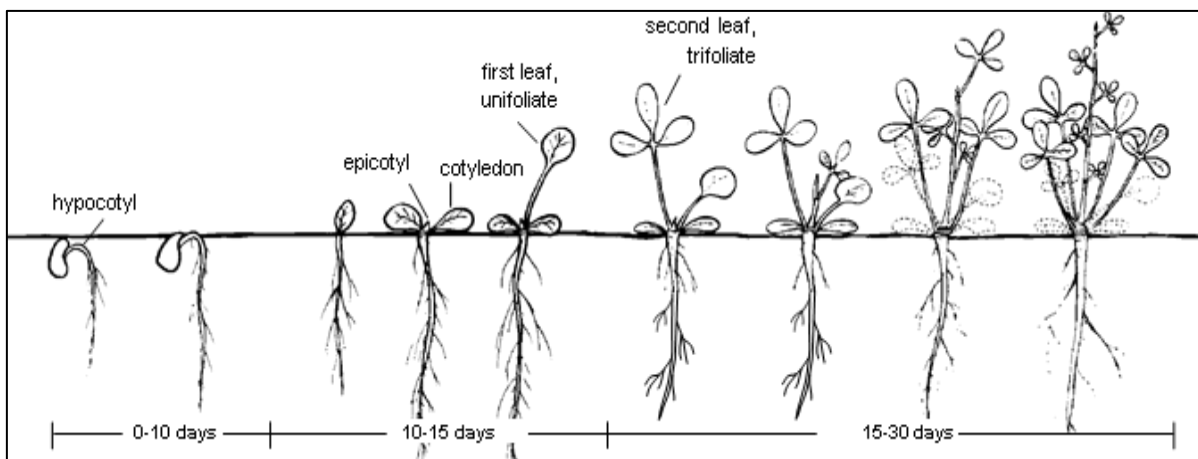
Genre: *Medicago* (L.)

Espèce: *Medicago sativa* L.

### I.2.1.3. Caractère généraux

La luzerne est une plante herbacée vivace (Seppänen et *al.*, 2018) qui mesure de 30 cm à 70 cm de hauteur (Mhamdi, 2011). À maturité, la plante possède une longue racine pivotante. Le collet, a structure complexe situé près de la surface du sol, conserve son activité méristématique d'une année à l'autre et produit des bourgeons qui donnent naissance à de nouvelles tiges. Les feuilles sont alternes et comportent au moins trois folioles. Les fleurs sont de couleur variable mais sont le plus souvent violettes, panachées, jaunes, crème ou blanches (Teuber et Brick, 1988 ; Barnes et Sheaffer, 1995).

La luzerne est une plante de climat modérément chaud. Les graines commencent à germer à 3-4 °C, et la température optimale pour la germination et la croissance est de 20-25 °C. La réaction neutre de la solution du sol (pH 6,6-7,5) est souhaitable pour le développement de la luzerne. Elle a besoin et consomme de grandes quantités d'eau pour sa croissance et son développement, ainsi que pour une production élevée de masse verte et de foin (Milić et *al.*, 2016).



**Figure 1:** Cycle végétative de la luzerne (Undersander et Cosgrove, 2011).

## I.2.2. Principales maladies cryptogamiques de la luzerne

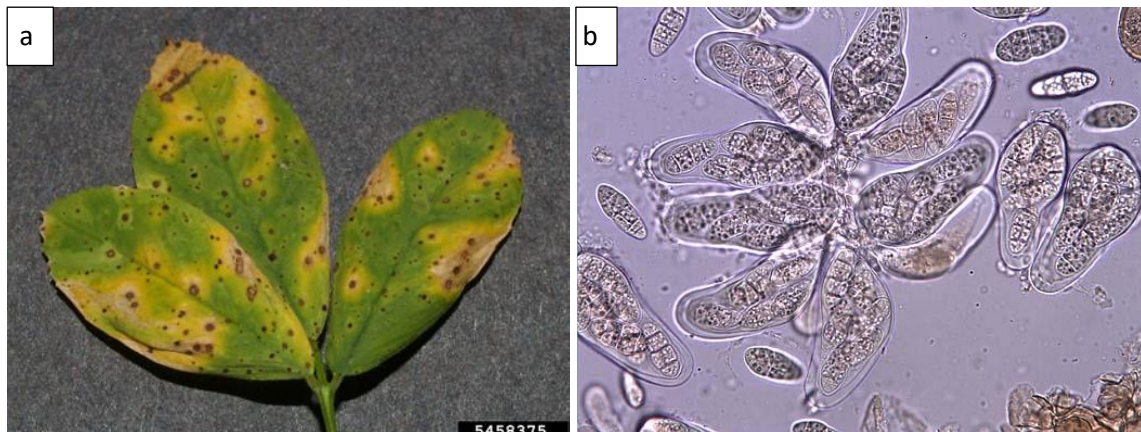
Plusieurs maladies sont présentes dans les populations de luzerne qui peuvent tuer les semis, limiter les rendements et raccourcir la durée de vie des populations. L'apparition et la gravité des maladies dépendent des conditions environnementales, du type de sol et de la gestion des cultures (Undersander et Cosgrove, 2011). Les maladies affectant la luzerne peuvent être divisées en deux groupes principaux:

### I.2.2.1. Maladies causant des symptômes localisés (taches foliaires)

Maladies foliaires qui provoquent des symptômes foliaires peuvent réduire le rendement et la qualité en réduisant la photosynthèse et en défoliant les plantes. La défoliation diminue à la fois le rendement et la qualité.

#### a. Tache lepto (*Leptoshaerulina briosiana*)

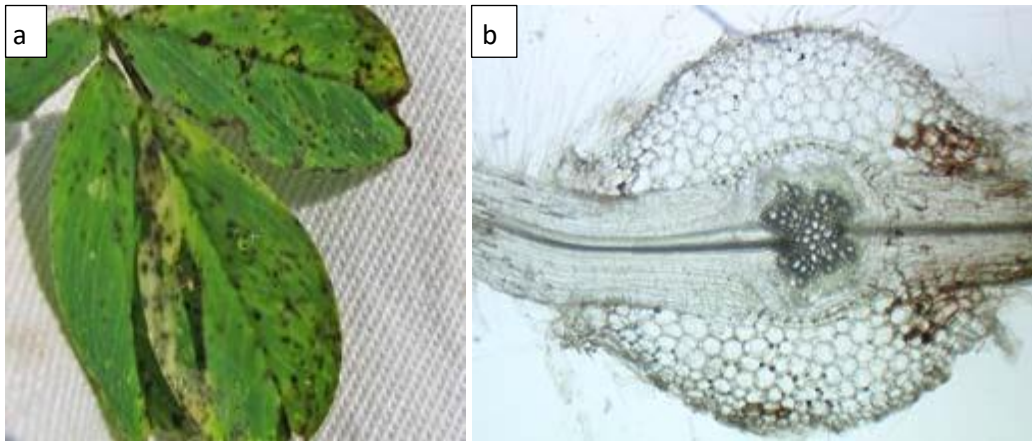
La tache lepto (en anglais *Leptoshaerulina leaf spot*) attaque les jeunes repousses de luzerne au printemps et à l'automne ou au milieu de l'hiver dans les régions du sud. Les lésions commencent généralement par de petites taches noires et s'agrandissent pour devenir des "points oculaires" ovales ou ronds. Elle s'attaque principalement aux jeunes folioles, les pétioles et d'autres parties de la plante (Wise et *al.*, 2010).



**Photo 1:** La tache lepto de feuille de la luzerne(**a:** Macroscopiquement; **b:** Microscopiquement (<https://www.pflanzenkrankheiten.ch/krankheiten-an-kulturpflanzen/krankheiten-an-futterleguminosen/luzerne/leptoshaerulina-trifolii-m>) (Wise et *al.*, 2010).

**b. Tige noire (*Phoma medicaginis*)**

Les symptômes de tige noire (en anglais Spring black stem) peuvent être présents comme des petites taches noires à brunes sur les tiges, les pétioles et les feuilles (Frate et Davis 2007). Les feuilles basales sont les premières à être affectées. Les feuilles affectées viennent à jaunir pour finalement tomber (Miloud, 2018).

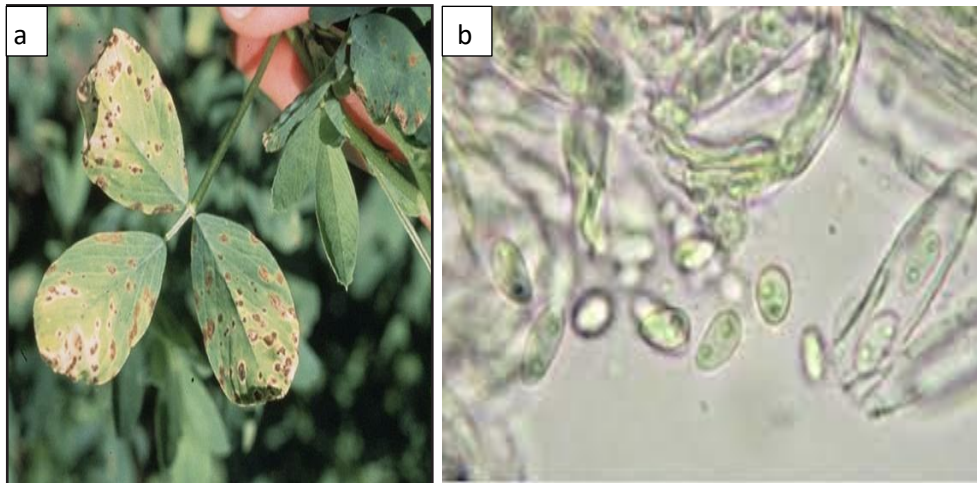


**Photo 2:** Spring black stem caractérisé par des petites taches noires à brunes(**a:** Macroscopiquement; **b:** Microscopiquement) (Abou Al Fadil, 2006; Wise et *al.*, 2010).

**c. Tache commune (Common leaf spot) (*Pseudopeziza medicaginis*)**

Les symptômes (Common leaf spot) apparaissent en premier sur les feuilles basales. Les taches sont circulaires brunes à brun foncé, avec une marge irrégulière (finement denticulée) (Aomari, 2012). La gravité de la maladie dépend des conditions de la luzerne et de la résistance variétale (Undersander et Cosgrove, 2011).

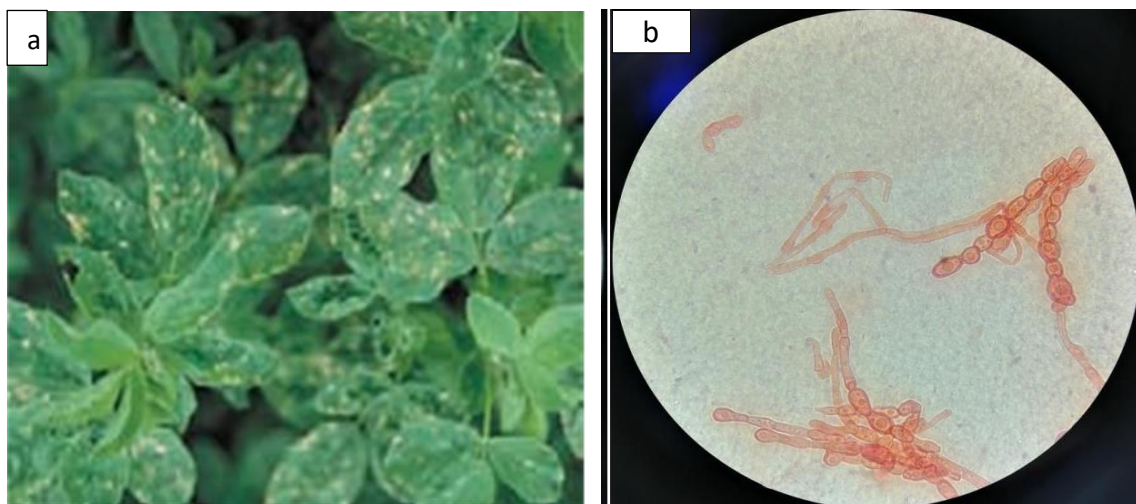




**Photo3:** Tache commune des feuilles (*Pseudopeziza medicaginis*)(**a:** Macroscopiquement; **b:** Microscopiquement) (Vincelli et Smith, 2014; Li et al., 2018).

#### d. Stemphyliose

Un centre bronzé et une bordure sombre autour d'une lésion de forme irrégulière distinguent cette maladie des taches foliaires causée par le champignon *Stemphylium botryosum*. Une fois la bordure formée, la tâche n'augmente pas de taille. Les spores se forment au centre de la lésion. Des températures fraîches (15,5-21°C) et un temps humide favorisent l'infection et la propagation. Comme la défoliation ne se produit qu'en cas de forte pression de la maladie, la tache foliaire de *Stemphylium* n'est pas considérée comme aussi grave que certaines autres maladies foliaires (Frate et Davis, 2007).



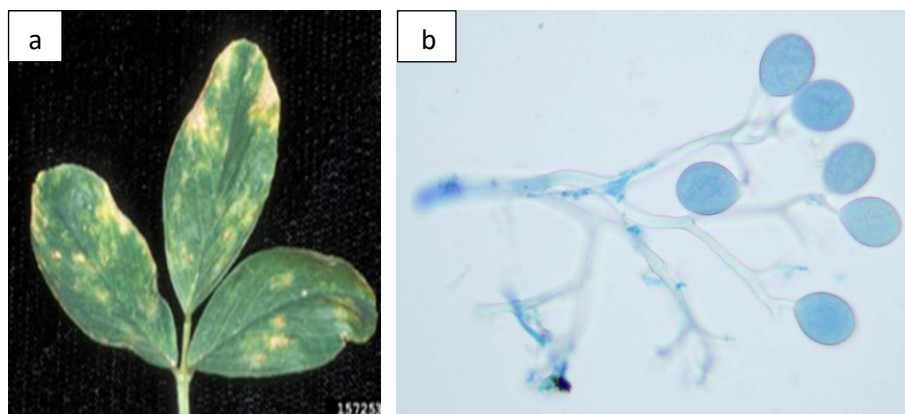
**Photo 4:** Taches sur feuilles de luzerne causées par le *Stemphylium* (**a:** Macroscopique; **b:** Microscopique) (Frate et Davis, 2007; Habhoub et Salhi, 2020).

**e. Rouille (*Uromyces medicaginis-orbicularis*)**

Elles infestent de préférence des plantes affaiblies (manque d'eau). Sur les feuilles et tiges éclatent de nombreuses pustules minuscules libérant une poudre brun-rouge à brun foncé que l'on peut essayer avec les doigts (Aomari, 2012). Les feuilles fortement infectées tombent prématurément, ce qui réduit le rendement et la qualité. La maladie est plutôt rare dans les climats méditerranéens et désertiques, et aucune mesure de contrôle n'est utilisée (Frate et Davis, 2007).

**f. Mildiou**

L'agent causal est *Peronospora trifoliorum* avec apparition des feuilles tachées de vert clair ou de jaune et des jeunes folioles déformées. Un tapis fongique gris violacé foncé recouvre souvent la face inférieure des feuilles. Les tiges des plantes malades sont courtes et trapues. Les tiges infectées de façon systémique peuvent avoir un diamètre supérieur à la normale ; elles produisent souvent une rosette de croissance en grappes à l'extrémité de la tige (Wise et al., 2010). L'attaque commence toujours par les feuilles supérieures (Aomari, 2012).



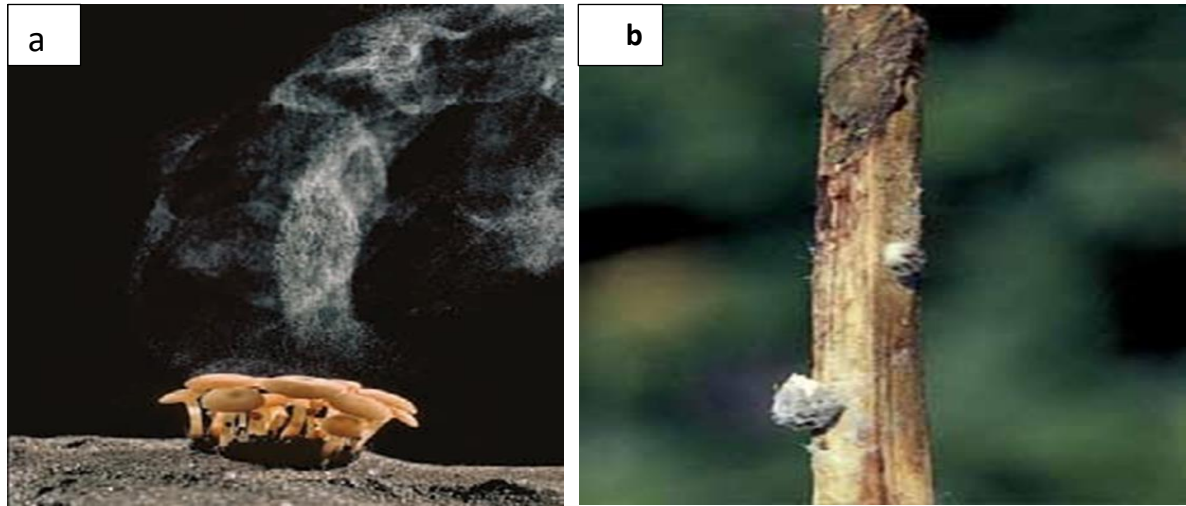
**Photo 5:** Les symptômes de mildiou sur les feuilles de la luzerne(**a:** Macroscopique; **b:** Microscopique(<https://eol.org/pages/1030072/media> ) ) (Wise et al., 2010).

**g. Sclérotiniose (*Sclerotinia trifoliorum*)**

Les plantes infectées apparaissent jaunes et faibles (Wise et al., 2014). La pourriture sclérotique du collet et de la tige est plus dommageable pour les populations de semis, en particulier celles qui sont semées à la fin de l'été. Les premiers symptômes apparaissent à l'automne sous forme de petites taches brunes sur les feuilles et les tiges. Pendant le temps frais et humide du début du printemps, la couronne ou les parties inférieures des tiges individuelles se



ramollissent, se décolorent et se désintègrent. les sclerotia est une masse blanche et pelucheuse avec des corps noirs durs qui se forment sur les parties infectées meurent (Frate ,et Davis, 2007), qui infectant de nouvelles plantes au fur et à mesure de sa croissance (Wise et *al.*, 2014).



**Photo 6:** Sclérotés sur la tige(a: Microscopiquement; b:Microscopiquement) (Frate ,et Davis, 2007; Undersander et Cosgrove, 2011).

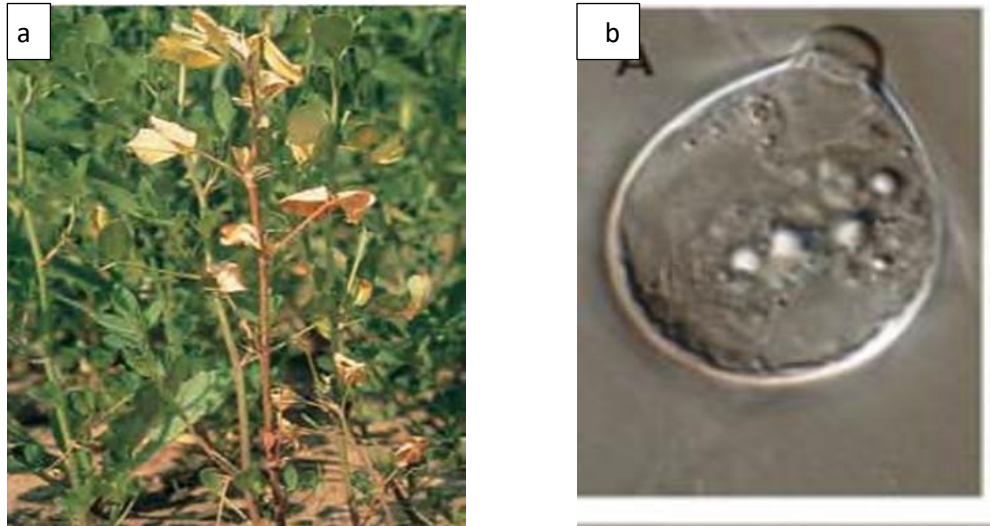
### I.2.2.2. Maladies causant des symptômes systémiques

Les maladies fongiques engendrant le développement de symptômes systémiques (jaunissement, flétrissement, dessèchement et dépérissement du feuillage)chez la luzerne qui peuvent se regrouper comme suit :

#### I.2.2.2.1. Maladies affectant les racines

##### a. Pourridié phytophthoréen (*Phytophthora megasperma f. sp.medicaginis*)

Cette maladie (en anglais Phytophthora root rot) peut toucher les plantules en les infectant au niveau du sol ce qui engendre leur flétrissement. Le symptôme distinctif et le plus caractéristique s'observe sur la racine pivotante. Des taches orangées à brun foncé apparaissent sur la racine pivotante, là où les racines secondaires prennent naissance (Richard et Martin, 1991). Elle est favorisée par les conditions humides et les sols mal drainés causant des problèmes dans les nouveaux semis, mais peut affecter n'importe quel peuplement de luzerne suite à des conditions humides prolongées (Wise et *al.*, 2014).



**Photo 7:** Tiges et feuilles de luzerne blanchies par le *Phytophthora* (a: Macroscopiquement; b: Microscopiquement) (Undersander et Cosgrove, 2011; Martin et al., 2012).

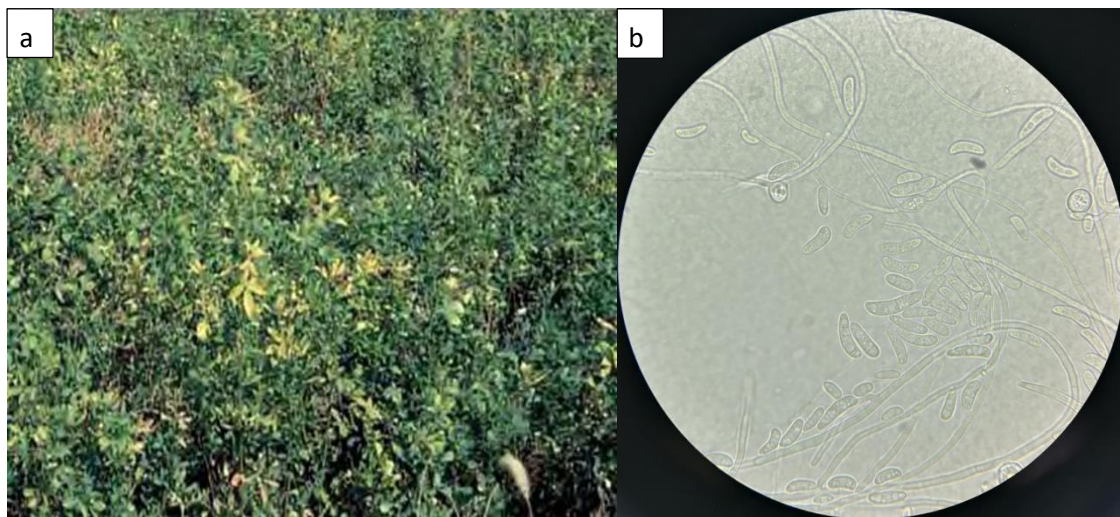
**b. Pourridié fusarien (*Fusarium* spp.)**

Ce champignon, appelé en anglais Fusarium root and crown rot, a de très larges spectres d'hôtes, infecte des plantes herbacées et ligneuses. La majorité des *Fusarium* responsables de flétrissements vasculaires (fusariose) (Miloud, 2018), provoque un éclaircissement progressif des populations (Undersander et Cosgrove, 2011), les symptômes le plus distinctifs sont les pousses desséchées les feuilles et tiges de couleur blanchie (Frate et Davis, 2007).

Il peut également affecter les populations âgées de deux ans ou plus. Une coupe transversale des racines montre des stries ou des anneaux partiels ou complets de couleur brun foncé ou rougeâtre. Les dommages causés à l'extérieur des racines (par exemple par le charançon de la racine du trèfle) favorisent l'apparition de la maladie (Wise et al., 2014).



**Photo 8:** Coupe longitudinale d'une racine infectée par le *Fusarium* présentant une décoloration brune rougeâtre foncée dans la stèle, ou au centre de la racine (Undersander et Cosgrove, 2011).



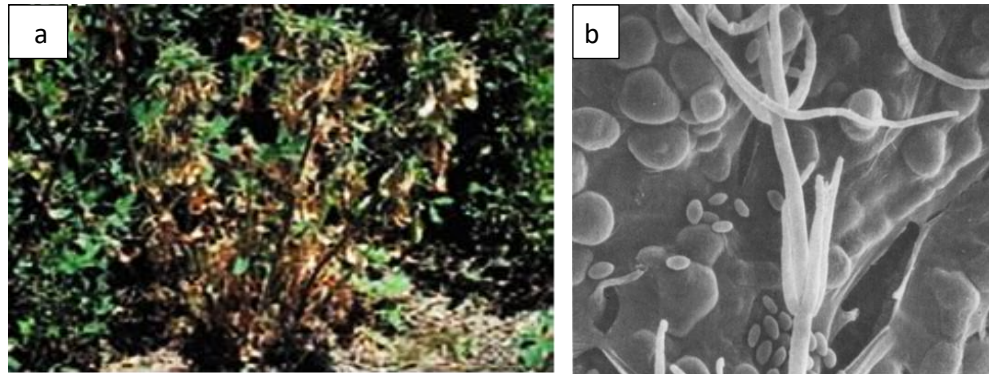
**Photo 9:** Symptômes de la fusariose sur la luzerne (**a:** Macroscopiquement; **b:** Microscopiquement) (Undersander et Cosgrove, 2011; Habhoub et Salhi, 2020).

#### I.2.2.2.2. Maladies affectant le système vasculaire

##### a. Flétrissement verticillien (*Verticillium albo-atrum*)

Ce champignon pathogène est responsable de la verticilliose (en anglais *Verticillium wilt*) (Miloud, 2018). Les premiers symptômes comprennent le jaunissement de l'extrémité des folioles, avec parfois un enroulement des folioles sur leur longueur. La maladie progresse jusqu'à ce que toutes les feuilles soient mortes sur une tige verte. Au début, toutes les tiges

d'une plante ne sont pas touchées. La maladie envahit lentement la couronne et la plante meurt sur une période de plusieurs mois. Les tissus vasculaires des racines peuvent présenter ou non un brunissement interne (Undersander et Cosgrove, 2011). Elle peut être transmise aux champs sains à partir de zones contaminées sur des équipements agricoles (Wise et *al.*, 2014).



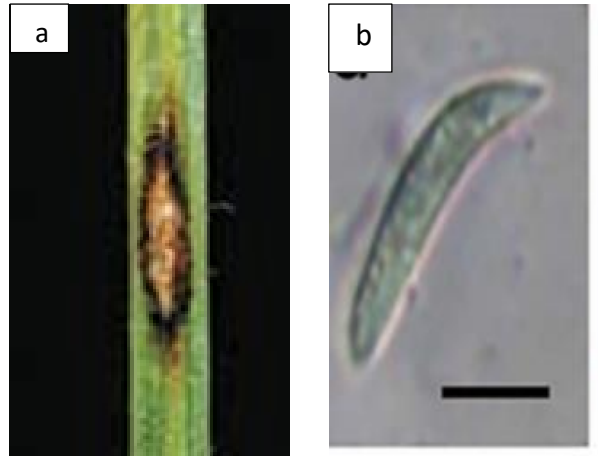
**Photo 10:** Symptômes de la verticilliose sur la luzerne (**a:** Macroscopiquement ; **b:** Microscopiquement) (<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/verticillium-albo-atrum>) (Frate et Davis, 2007).

#### I.2.2.2.3. Autres maladies

##### a. L'antracnose

C'est une maladie causée par le champignon *Colletotrichum trifolii* est un problème courant dans les populations plus âgées de la luzerne (Frate et Davis, 2007). Elle se manifeste par temps chaud et humide et attaque les tiges et les couronnes de la luzerne. Les symptômes au niveau de l'extrémité des tiges provoquent leur flétrissement et recourbement pour former une "crosse de berger". Généralement plus grave après la première récolte (Wise et *al.*, 2014).

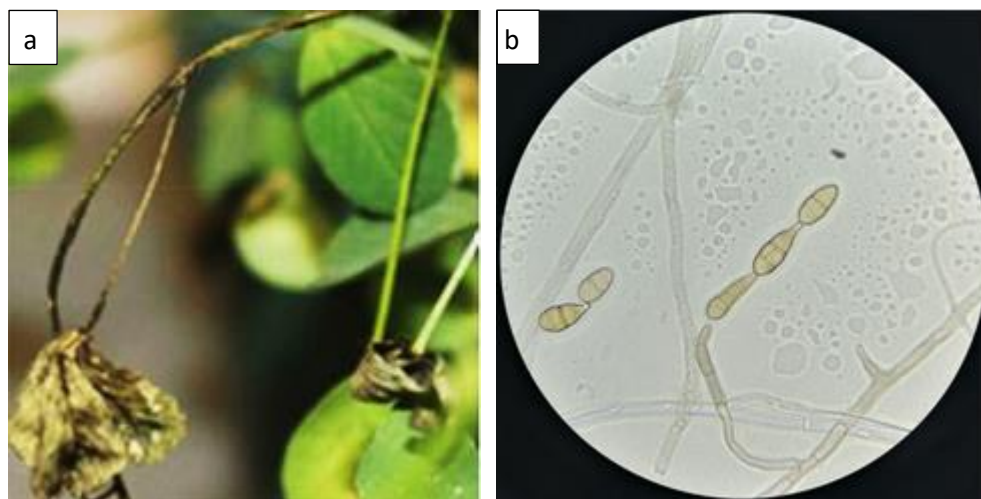




**Photo11:** Lésions formées par l'antracnose des tiges (**a:** Macroscopiquement ; **b:** Microscopiquement) (Undersander et Cosgrove, 2011; Niu *et al.*, 2016).

### **b. L'alternariose**

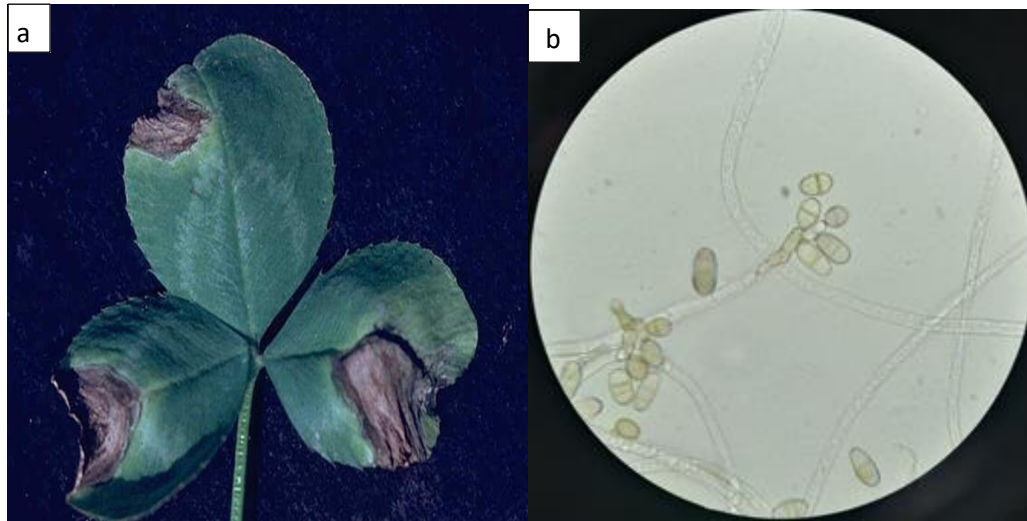
C'est une maladie causée par le champignon *Alternaria sp* qui est un champignon phytopathogène commun dans le monde entier. Il provoque des symptômes distincts sur les feuilles de différents hôtes. Selon Abbassi *et al.* (2018) et Kgatle *et al.* (2020), des symptômes de nécrose et de mildiou sont d'abord apparus sur les feuilles et les tiges, puis il y a eu défoliation. Sur luzerne, l'alternariose est décrite pour la première fois dans la région d'Ouargla par Habhoud et Salhi (2020).



**Photo 12:** L'alternariose de la luzerne ((a) Macroscopique (Abbassi *et al.*, 2018); (b) Microscopique (Habhoud et Salhi, 2020) ).

### c. Curvulariose

Le champignon hyphomycète *Curvularia geniculata* est un pathogène foliaire facultatif pour de nombreuses espèces végétales. Des taches circulaires en forme de V, brun foncé, entourées de bords jaunes sont observé sur la plante atteinte Zhang *et al.* (2017). Cette maladie a été recensée dans la région d’Ouargla sur les plantes de luzerne par Habhoub et Salhi (2020).



**Photo13:** Brûlure des feuilles par *Curvularia* (a: Macroscopiquement ; b: Microscopiquement (Habhoub et Salhi, 2020).

### I.2.3. Maladies des semences de luzerne

La germination des graines constitue un stade critique du cycle vital pour la survie des plantes et l'établissement des plantules au bon moment, surtout dans des milieux stressants (Hubbard *et al.*, 2012).

L'émergence rapide et uniforme des semis est essentielle pour obtenir un peuplement productif et persistant de luzerne. Cependant, un certain nombre d'agents pathogènes s'attaquent aux graines et aux plantules de luzerne, ce qui réduit considérablement l'établissement des plantes. Dans de nombreux endroits, les semences de luzerne sont plantées dans un sol froid et humide, idéal pour la pourriture et la fonte des semis. Un complexe d'agents pathogènes du sol provoque la pourriture des semences et la fonte des semis de la luzerne et peut endommager les racines des plantes survivantes, ce qui entraîne une réduction des rendements, une diminution de la survie hivernale et une réduction de la durée de vie des peuplements (Berg *et al.*, 2017).

Des facteurs environnementaux tels que la quantité de précipitations, les températures, l'humidité du sol et l'humidité relative contribuent à la propagation des maladies (MAAEF (1931).

### **I.3. Lutte biologique contre les phytopathologies cryptogamiques**

La lutte biologique est un ensemble de méthodes de protection des végétaux qui utilisent des mécanismes naturels. Elle vise à la protection des plantes en privilégiant l'utilisation de mécanismes et d'interactions qui régissent les relations entre espèces dans le milieu naturel (Guyader, 2020).

Le biocontrôle est un processus par lequel un organisme vivant limite la croissance ou la propagation d'organismes indésirables ou de pathogènes (Gopalakrishnan et *al.*, 2015). Le sol et les plantes hébergent une microflore naturelle abondante et riche en espèces diverses qui sont capables de protéger les plantes contre les maladies causées par des germes phytopathogènes (Ridel et *al.*, 2014; Alabouvette et Cordier, 2018), à l'exemple de ceux ayant un potentiel pour le biocontrôle de la maladie foliaire de la luzerne (Gao et *al.*, 2018).

Il est bien connu que la lutte contre les maladies des cultures fourragères, en utilisant des fongicides chimiques, est un moyen inadéquat en raison des dangers qu'ils peuvent induire pour l'écosystème (Morsy et *al.*, 2011).

Les bactéries qui appartiennent à l'une de ces catégories et qui favorisent la croissance des plantes par suppression des organismes pathogènes (stress biotique) et l'induction d'une résistance des plantes hôtes contre ces derniers et les stress abiotiques, sont appelées les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (plant growth-promoting rhizobacteria) (PGPR). On retrouve un groupe extracellulaire (ePGPR) et un groupe intracellulaire (iPGPR). Le groupe des PGPR intracellulaires (iPGPR) comprend les genres appartenant à la famille des Rhizobiaceae (Gopalakrishnan et *al.*, 2015).

### **I.4. Utilisation des Rhizobia dans la lutte biologique contre les maladies fongiques**

#### **I.4.1. Caractéristiques des Rhizobia**

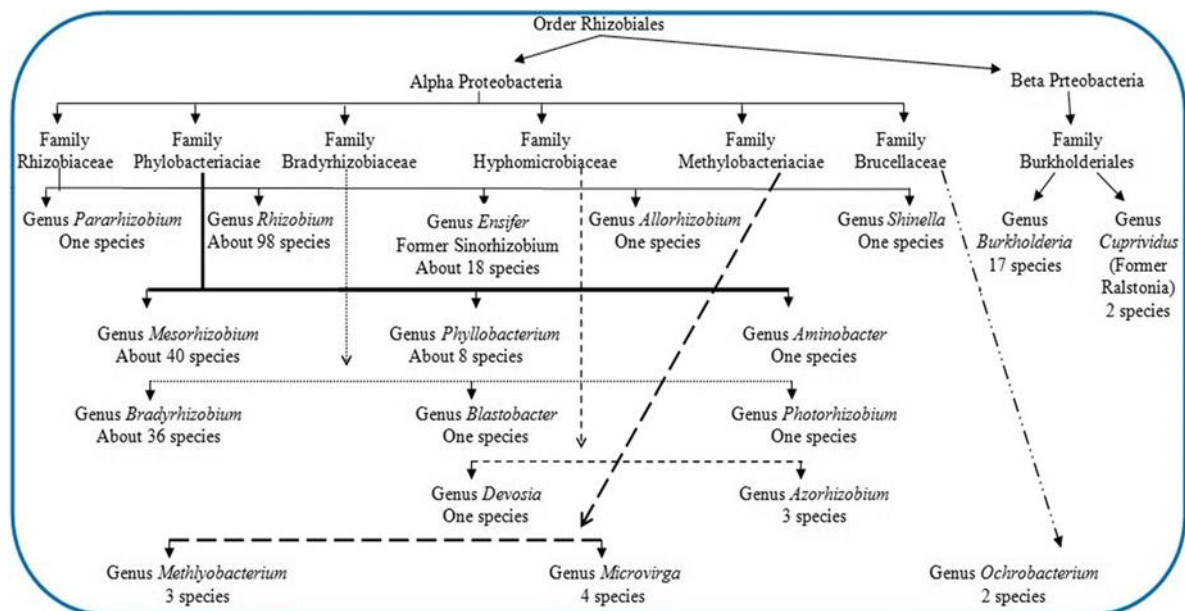
Les rhizobiums (communément appelés rhizobia) sont des bactéries de la famille des Rhizobiaceae, Gram négatifs, non sporulantes et apparaissent en forme de bâtonnets mobiles.

Ils sont aérobies de petite taille dont la température de croissance optimale est de 28°C et le pH optimal est de 6 à 7 (Kuykendall et *al.*, 2015).

On désigne par rhizobia, ou bactéries nodulant les légumineuses (BNL), toute bactérie capable de former une symbiose qui se traduit par la formation sur les racines ou plus rarement sur les tiges d'un organe particulier appelé nodule ou nodosité capable de fixer et de réduire l'azote moléculaire (Lebbida, 2009 ; Mouafek, 2010).

#### I.4.2. Classification des Rhizobia

La taxonomie de ces bactéries est en constante évolution, en grande partie en raison du développement rapide des techniques de biologie moléculaire. L'isolement et la caractérisation de nouvelles bactéries nodulatrices de légumineuses, souvent différentes, sur une variété de plantes hôtes, ont permis de nommer de nombreuses nouvelles espèces de rhizobiums. Selon Shamseldin et *al.* (2017), les rhizobiums sont composés de 238 espèces réparties en 18 genres, répartis en 2 classes:  $\alpha$ -proteobacteria (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*), *Methylobacterium*, *Devosia*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Shinella*, *Allorhizobium*, *Pararhizobium*, *Aminobacter*, *Blastobacter*, *Photorhizobium*),  $\beta$  proteobacteria (*Burkholderia* et *Cupriavidus* (anciennement *Ralstonia*)).



**Figure 2:** Schéma de la distribution des espèces bactériennes nodulatrices de légumineuses dans les classes des  $\alpha$  et  $\beta$  Proteobacteria (Shamseldin et *al.*, 2017).



### I.4.3. Lutte biologique par les rhizobia

Les rhizobiums sont capables de protéger leurs hôtes contre les pathogènes fongiques en augmentant la production de phytoalexines dans le cadre d'une protection croisée (Gao et *al.*, 2018).

De nombreuses espèces de *Rhizobium* inhibent de manière significative la croissance des champignons pathogènes. Les mécanismes impliqués dans la lutte biologique par les rhizobia comprennent (Gopalakrishnan et *al.*, 2015 ; Das et *al.*, 2017; Tamiru et Muleta, 2018):

- Le mycoparasitisme;
- La production d'antibiotiques et de métabolites secondaires antifongiques, y compris le cyanure d'hydrogène (HCN) et la production de sidérophores ;
- La compétition pour le fer qui s'ensuit entre les pathogènes et les rhizobia ;
- La compétition pour les nutriments ;
- L'induction de mécanismes de défense et de promotion de la croissance des plantes ;
- La production de phytohormones qui sont des substances stimulant la croissance des plante comme les auxines, les Gibbérellines.

### I.4.4. Interaction rhizobia-Légumineuses

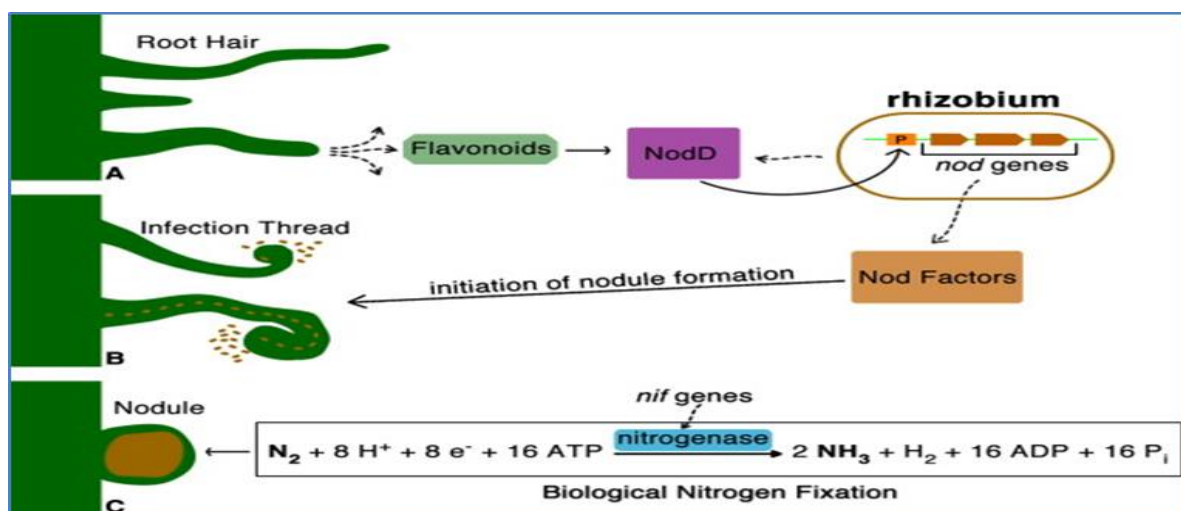
Les ressources en azote de la planète sont pratiquement illimitées grâce au réservoir atmosphérique ( $N_2$ ). Pourtant, l'azote, après l'eau, est le principal facteur limitant la croissance des végétaux. Les rhizobia sont capables de réduire l'azote gazeux ( $N_2$ ) en ammoniac ( $NH_3^+$ ), qui est transformé en ammonium ( $NH_4^+$ ). L'ion ammonium sera incorporé immédiatement dans divers types d'acides aminés (Revellin, 2012).

La capacité de nodulation et de fixation de l'azote des légumineuses sera déterminée par la concentration de N dans l'environnement des racines et les exsudats racinaires. La compétitivité interspécifique et l'épuisement de l'azote dans le système de culture intercalaire-légumineuses peuvent atténuer les effets de "suppression de l'azote" des légumineuses et faciliter la fixation de l'azote  $N_2$  (Zhao et *al.*, 2020).

Le processus est initié par la plante hôte, qui exsude au niveau des racines des molécules, appelées flavonoïdes, qui sont reconnues par leurs partenaires rhizobiennes compa-

tibles. La perception de ces flavonoïdes attire les bactéries vers les racines et les stimule à produire des molécules appelées facteur Nod, qui à son tour déclenche une cascade de signaux complexes dans la plante hôte, conduisant à l'organogenèse de nouveaux organes racinaires qui sont les nodules. Ces nodules constituent l'environnement idéal pour la fixation biologique de l'azote, que les rhizobiums effectuent pour leur plante hôte en échange d'hydrates de carbone (Ferguson et *al.*, 2019).

Deux principaux types de nodules symbiotiques ont été décrits en fonction du type de croissance : indéterminés et déterminés. Le nodule de type indéterminé est issu de la prolifération des cellules corticales internes de la racine ; il possède un méristème apical persistant et adopte une forme cylindrique. Le nodule de type déterminé est issu de la prolifération des cellules corticales externes et possède un méristème latéral qui reste actif pendant quelques jours. Après l'arrêt de l'activité méristématique, le nodule croît par expansion cellulaire et adopte une forme sphérique (Coba de la Peña et *al.*, 2018).



**Figure 3:** Processus de nodulation et de la fixation biologique de l'azote (Laranjo et *al.*, 2014).

#### I.4.5. Importance de la symbiose

##### I.4.5.1. Importance écologique

Cette symbiose présente plusieurs avantages, tel que le maintien et la restauration de la fertilité des sols et la limitation de la pollution des eaux souterraines par les nitrates (Berrada et Fiki-Benbrahim, 2014). La diminution des intrants chimiques, fertilisants et pesticides de-

vient essentielle pour la sécurité nutritionnelle et la conservation environnementale de la production alimentaire (Drevon, 2017).

Comme avantage écologique, les légumineux nodules mettent en œuvre deux stratégies adaptatives pour l'acquisition du phosphore. La première stratégie consiste à développer un système d'acquisition plus efficace du P en augmentant la surface d'échange racinaire ou en secrétant des acides organiques et des phosphatases dont le rôle est de dissoudre le P insoluble du sol. Cette stratégie concerne l'exigence externe en P de la plante, c'est-à-dire la concentration minimale en P de la solution du sol pour une croissance optimale de la plante. La seconde stratégie consiste à optimiser l'efficacité métabolique d'utilisation du phosphate pour la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> en produisant plus de biomasse ou en fixant plus de N<sub>2</sub> par unité de P consommée (Lazali et al., 2019).

#### **I.4.5.2. Importance économique**

La symbiose rhizobia-Légumineuses joue un rôle économique important car elle diminue l'utilisation d'engrais coûteux et contribue à l'amélioration de la productivité agricole (Berrada et Fiki-benbrahim, 2014). Revellin (2012) a estimé que la moitié de la fixation biologique de N<sub>2</sub> est réalisée par la symbiose rhizobia-Légumineuses, avec un taux allant de 10 à 300 kg de N<sub>2</sub> fixé par hectare et par an et produit 25 à 35% des protéines mondiales. Les légumineuses sont principalement utilisées dans l'alimentation humaine et animale pour leur teneur élevée en protéines.

*Chapitre II:*  
*Matériel et méthodes*

**II. Matériel et méthodes****II.1. Matériel biologique****II.1.1. Matériel végétal**

L'étude a été réalisée sur des graines de luzerne (*Medicago sativa* L.) originaire de l'oasis de Ouargla (sud de l'Algérie), où elle est cultivée et largement utilisée par les agriculteurs locaux (Azib et *al.*, 2019).

**II.1.2. Matériel microbiologique****II.1.2.1. Souches de rhizobiennes**

Dans cette étude, nous avons utilisé trois souches sinorhizobiennes locales isolées à partir des nodosités racinaires de la luzerne. Deux souches proviennent de la région de Ouargla (O152 de Hassi Ben Abdallah et OI11 de l'exploitation agricole de l'université) et une autre provient de la région de El Oued (E141 de Tenedla) il est à signaler que les souches O152 et E141, prises dans cette étude, ont été préalablement caractérisées sur les plans génétique et phénotypiques (Azib et *al.*, 2020) et sélectionnées parmi une soixantaine d'autres pour leur résistance aux différents facteurs édapho-climatiques dominants (salinité, températures et pH) et leur activité symbiotique efficace ayant conduit à un de bons résultats de croissance et de nodulation des plantes de luzerne.

**Tableau 1:** Caractéristiques physiologiques des souches sinorhizobiennes (O152 et E141) étudiées (Azib et *al.*, 2022).

Caractéristiques physiologiques	Temperature (C°)		pH			Salinité (mM)	
	4	28-37	45	4	5	9-6	640-1.7
O152	-	+	+	+	+	+	+
E141	-	+	-	-	-	+	+

La souche OI11 est nouvellement isolée de l'exploitation agricole de l'université selon les étapes décrites dans le point 1.4.4 (page 27). Dans le souci de construire une rhizothèque propre à l'université de Ouargla, nous avons opté pour la méthode de codage adoptée par Azib (2020) où la première lettre du code désigne l'initial de la région d'étude, suivie par un chiffre indiquant la station. Le second chiffre indique le numéro de la plante collectée au niveau de la station et le dernier chiffre celui du nodule utilisé.

**II.1.2.2. Souches fongiques**

Des études ont montré que la luzerne peut être attaquée par de nombreux champignons pathogènes malgré les conditions climatiques sèches de la zone saharienne (Azib et *al.*, 2022). Nous avons pris dans cette étude deux espèces fongiques s'attaquant à la luzerne dans la région d'Ouargla à savoir: *Alternaria sp.* et *Curvilaria sp.*

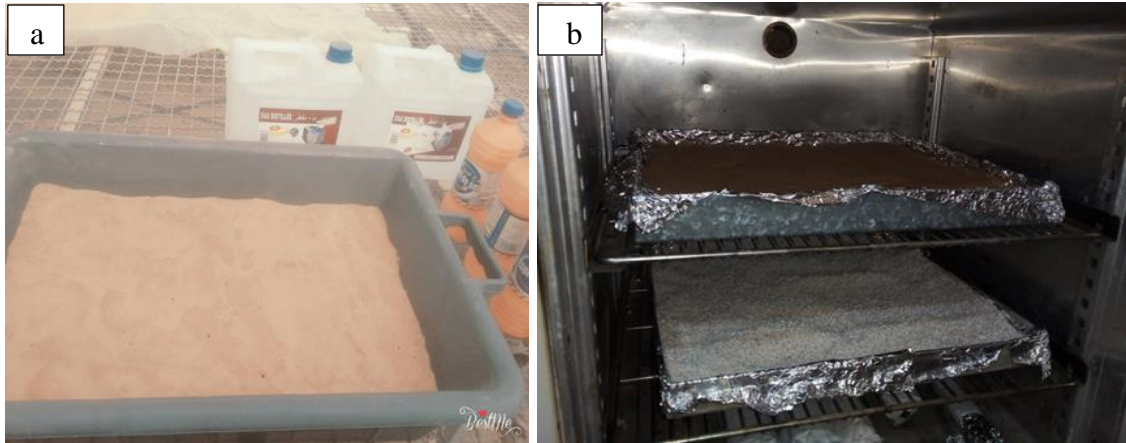
**II.2. Méthodes d'étude****II.2.1. Préparation du substrat de culture****II.2.1.1. Collecte du sable**

Nous avons utilisé, comme substrat de culture, un mélange composé de sable de dunes provenant de la zone de Sidi Khouiled (région de Ouargla), et appartenant au grand erg oriental et de la laine de roche.

Le choix du sable est fait sur la base de sa disponibilité importante dans les régions sahariennes et de son coût gratuit. En outre, sa pauvreté en éléments nutritifs, surtout après traitement de déminéralisation, fera de lui un bon support inerte pour la culture qu'il supportera. La laine de roche de son côté contribuera à l'allègement des pots et à une meilleure aération racinaire.

**II.2.1.2. Déminéralisation et stérilisation**

Selon la méthode décrite par Djerroudi (2017), nous avons effectué un tamisage du sable pour éliminer toutes traces d'impuretés d'origine végétale ou animale. Puis, nous avons versé une quantité d'acide chlorhydrique (esprit de sel) sur le sable et le laisser réagir pendant 15 à 20 min afin d'éliminer les carbonates, les chlorures...etc. Ensuite, le sable a subi une série de lavages successifs (six lavages) à l'eau filtrée pour éliminer toute trace de l'acide chlorhydrique, suivis de trois lavages à l'eau distillée. Le sable est ensuite mis à sécher à l'air libre pendant 03 jours, puis stérilisé au four pasteur pendant 2 heures à 180°C.

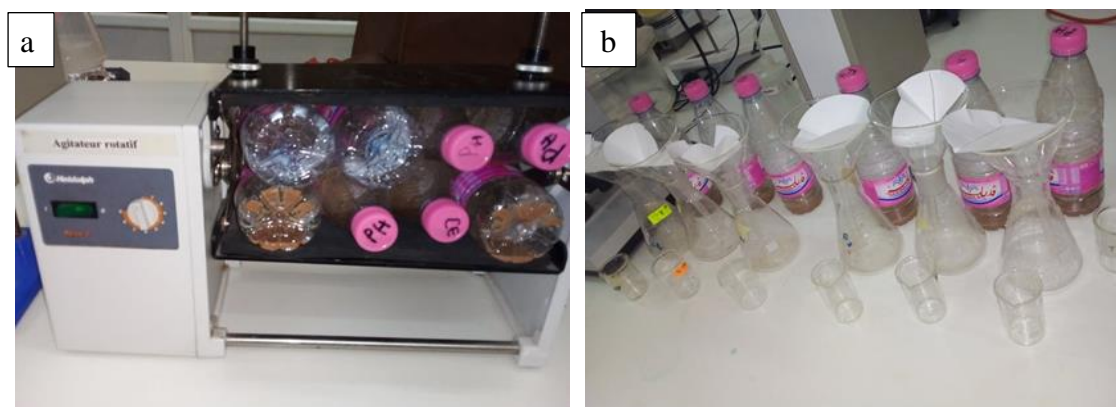


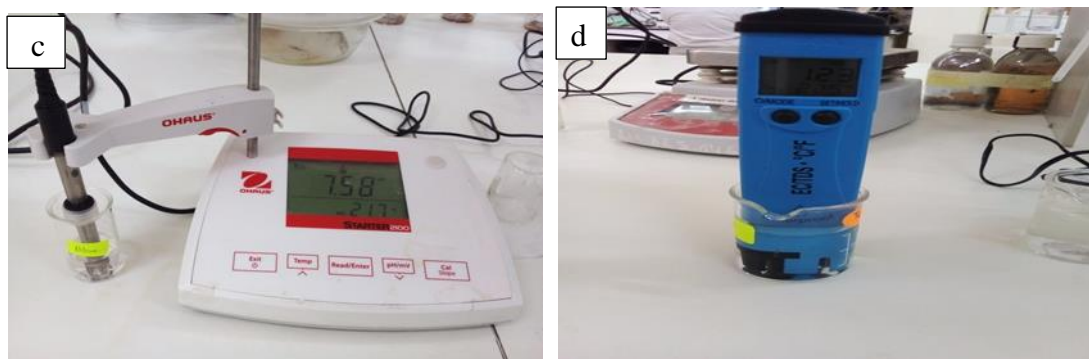
**Photo 14:** Etapes de traitement du sable : (a) Déminéralisation de sable; (b) Stérilisation de sable.

**II.2.1.3. Mesure du pH et de la conductivité électrique ( CE) avant et après traitement**

Le pH est un indicateur de l'état de fertilité des sols qui permet de connaître l'activité microbienne, la présence de certains sels toxiques et la capacité d'assimilation des éléments par les plantes. Selon les normes internationales (Aubert, 1978), la classification du pH des sols a été déterminée par la méthode électrométrique (pH-mètre), selon un rapport sol/eau (1/2,5), et la mesure de la CE fournit des informations sur sa salinité et est déterminée par un conductimètre avec un rapport sol/eau (1/5).

Nous avons pris 10g de sable avec 50ml d'eau distillée que nous avons agité pendant 20 min. Après agitation, la suspension a été filtrée à l'aide d'un papier filtre, et la mesure de pH a été effectuée. De même pour la CE, l'opération est réalisée en mettant 10g de sable dans 25ml d'eau distillée.





**Photo 15:** Mesure de pH et de la CE: (a) L'agitation ;(b)Filtration; (c) Mesure le pH; (d) Mesure le CE.

## II.2.2. Préparation de la solution nutritive et des milieux de cultures

### II.2.2.1. Préparation de la solution nutritive de Fâhareus

Nous avons utilisé une solution exempte d'azote (Vincent, 1970) pour garantir que l'azote atmosphérique sera la seule source d'azote disponible au couple symbiotique rhizobia-luzerne. Cette solution contient tous les éléments essentiels pour la bonne croissance des plantes.

Sa composition est la suivante (g/l):

#### - Macroéléments

MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O.....0,12g

CaCl<sub>2</sub>.....0,1g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,1g

C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO.5H<sub>2</sub>O.....0,005g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,1g

#### - Oligoéléments (Microéléments)

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.....2,86g

MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O.....2,03g

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0,22g

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O.....0,08g

L'ajustement du pH est fait à 6.8 et l'autoclavage à 120°C pendant 20 min.

### II.2.2.2. Préparations du milieu YEM



Toutes les souches rhizobiennes ont été cultivées dans un milieu YEM (Yeast Extract-Mannitol) (Somasegaran et Hoben 1985). Le milieu est composé de (g/l) : mannitol, 10g ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5g ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2g ; NaCl, 0.1g ; extrait de levure, 0.5g. Pour cela, nous avons préparé deux milieux spécifiques suivants :

Milieu liquide YEMB (Yeast Extract- Manitol Broth) et le milieu solide YEMA (Yeast Extract-Manitol Agar) par l'ajout de 15g d'Agar au milieu liquide (Vincent, 1970).

Le mélange est chauffé et agité jusqu'à ce que le tout devient homogène. Le pH du milieu a été ainsi ajusté à 6,8 puis autoclavé à  $120^\circ\text{C}$  pendant de 20min.



**Photo16:** Préparation le milieu YEM.

### **II.2.2.3. Préparation du milieu PDA**

40g de poudre PDA (Potato Dextrose Agar) sont mélangés dans 1l d'eau distillée sous chauffage et agitation. Le milieu est porté à l'autoclave pour une stérilisation à  $120^\circ\text{C}$  pendant de 20min (Mondo et *al.*, 2016)

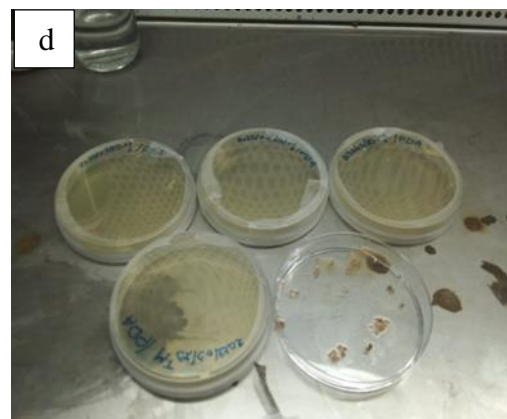
### **II.2.3. Les souches rhizobiennes**

#### **II.2.3.1. Isolements des rhizobiums à partir des nodules**

L'isolement de rhizobiums à partir des racines des légumineuses est la méthode la plus efficace pour obtenir beaucoup de souches différentes.

Selon la méthode de Vincent (1970), la technique classique d'isolement des souches de rhizobium à partir de nodosités est la suivante :

- Les nodules ont été collectés directement *in situ* des racines de luzerne.
- Laver les nodules à l'eau pour éliminer les plus grosses particules de sol.
- Immerger très brièvement les nodules 20 secondes dans l'éthanol 95°.
- Transférer les nodules, à l'aide d'une pince flambée à l'alcool dans l'hypochlorite de sodium pendant 10min. Ensuite, les nodules subissent une série de lavages successifs à l'eau distillée stérile pour éliminer les traces de l'éthanol et l'hypochlorite de sodium.
- Dans une boîte de pétri stérile contenant une goutte d'eau distillée stérile, écraser les nodules séparément jusqu'à l'obtention d'un broyat trouble.
- Ensemencer le broyat avec une anse de platine, par le méthode de stries, dans une nouvelle boîte de pétri contenant le milieu YEMA.
- Incuber les boîtes à 28°C pendant 3 jour.
- Lorsque les colonies typique de rhizobia apparaissent sur les boîtes ensemencées, repiquer les colonies sur une nouvelle boîte et incuber à 28°C pendant 3 jour pour la purification.
- Les différentes opérations se réalisent à l'intérieur d'une hotte à flux laminaire garantissant un maximum d'asepsie.



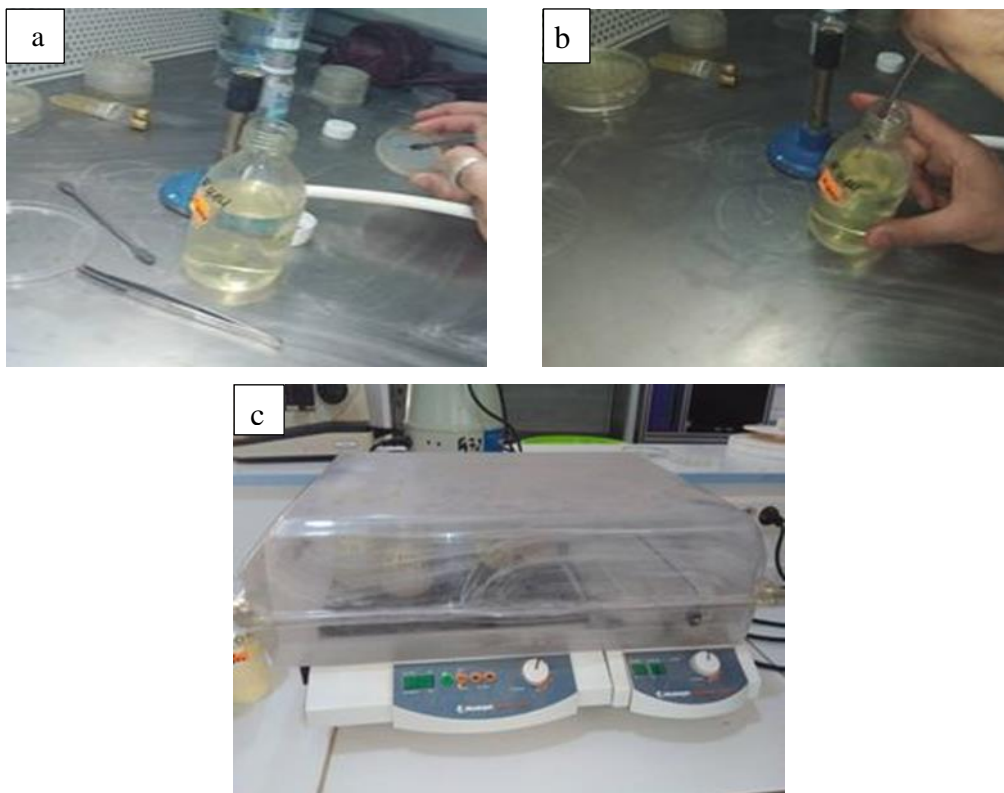
**Photo 17:** Isolements des rhizobiums; (a) collecte des nodules; (b) rinçage des nodules; (c) désinfection et stérilisation; (d) écrasement des nodules et encensement sur YEMA.

### II.2.3.2. Repiquage des souches

Les souches O152 et E141, conservées sur milieu YEM, ont été repiquées sur le même milieu par la méthode de strie dans de nouvelles boîtes de pétris et incubées pendant trois jours à 28°C (Somasegaran et Hoben, 1985).

### II.2.3.3. Préparation l'inoculum

Pour l'obtention d'inoculums rhizobiens des trois souches, les trois souches ont été incubées pendant trois jours à 28 °C sous agitation continue de 220 tr/mn dans des flacons contenant 250ml du milieu liquide YEMB.



**Photo18:** Préparation d'inoculums rhizobienne: (a) Prélèvement de colonies;(b) Ensemencement de le colonie dans le milieu;(c) Incubation des inoculums dans l'agitateur-incubateur.

Après l'incubation des souches, une mesure et un ajustement de la densité optique (DO) des inoculums obtenus sont réalisés avant l'inoculation.

**II.2.4. Souches fongiques****II.2.4.1. Revivification des champignons**

À partir de cultures de champignons conservés, nous avons gratté au bord de la colonie un fragment du mycélium, à l'aide d'une anse de platine stérile, que nous avons déposé au centre de la nouvelle boîte de pétri contenant le milieu PDA. L'incubation des cultures est effectuée à 28°C pendant 4 à 7 jours (Soro et *al.*, 2010; Merzoug et *al.*, 2018).

**II.2.4.2. Production des spores**

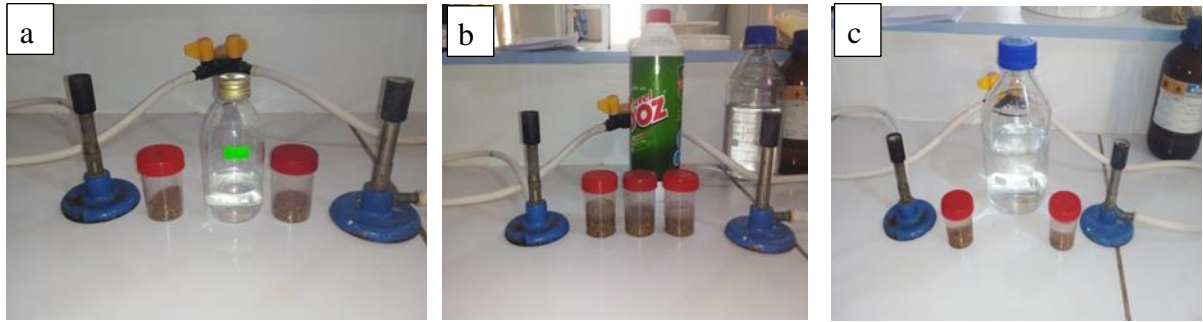
A partir des nouvelles cultures des champignons, dans le milieu PDA, nous avons gratté avec un scalpel des parties de ces derniers qui sont mises dans de l'eau distillée stérile. Ensuite, les spores sont trempées dans l'eau distillée stérile. Les flacons sont incubés à 25°C dans un incubateur agitateur 2 à 3 jours avant de l'utilisation (le temps nécessaire aux spores pour s'hydrater et germer ) (Soro et *al.*, 2010; Merzoug et *al.*, 2018).



**Photo19:**Préparation de l'inoculum fongique.

**II.2.5. Désinfections et pré-germination des graines**

Selon la méthode décrite par Vincent (1970), les graines de luzerne ont été stérilisées en surface par rinçage à l'éthanol (95%) pendant 10 secondes et immersion dans l'hypochlorite de sodium pendant 5 à 7 min, suivies de 6 à 7 rinçages successifs dans de l'eau distillé stérile.



**Photo20:** Désinfection des grains: **(a)** désinfection à l'éthanol; **(b)** désinfection à l'hypochlorite de sodium; **(c)** séries de rinçage à l'eau distiller stérile.

Au dernier lavage, les graines sont laissées toute une nuit au réfrigérateur à 4°C comme décrit par Somasegaran et Hoben (1985).



**Photo 21:** Graines imbibées.

## **II.2.6. Plan expérimentale**

### **II.2.6.1. Inoculation des graines**

Les graines pré-germées sont immergées dans l'inoculum rhizobienne liquide pendant 30 min, comme expliqué par Nikiema et *al.* (2019).



**Photo 22:** Inoculation rhizobienne des graines.

### **II.2.6.2. Remplissage des pots**

Les gobelets sont remplis par un volume de laine de roche et de deux volume de sable traité.

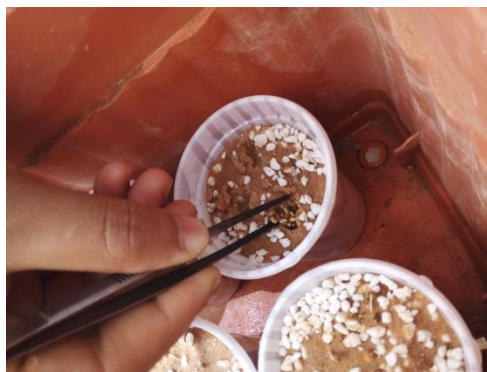


**Photo 23:** Remplissage des pots.

### **II.2.6.3. Semi des graines**

Les graines pré-germées et inoculés sont semées dans les gobelets, à raison de 3 graines par gobelet. La profondeur de semis était égale au double de la dimension de la graine.





**Photo 24:** semis des graines.

#### **II.2.6.4. Inoculation fongique**

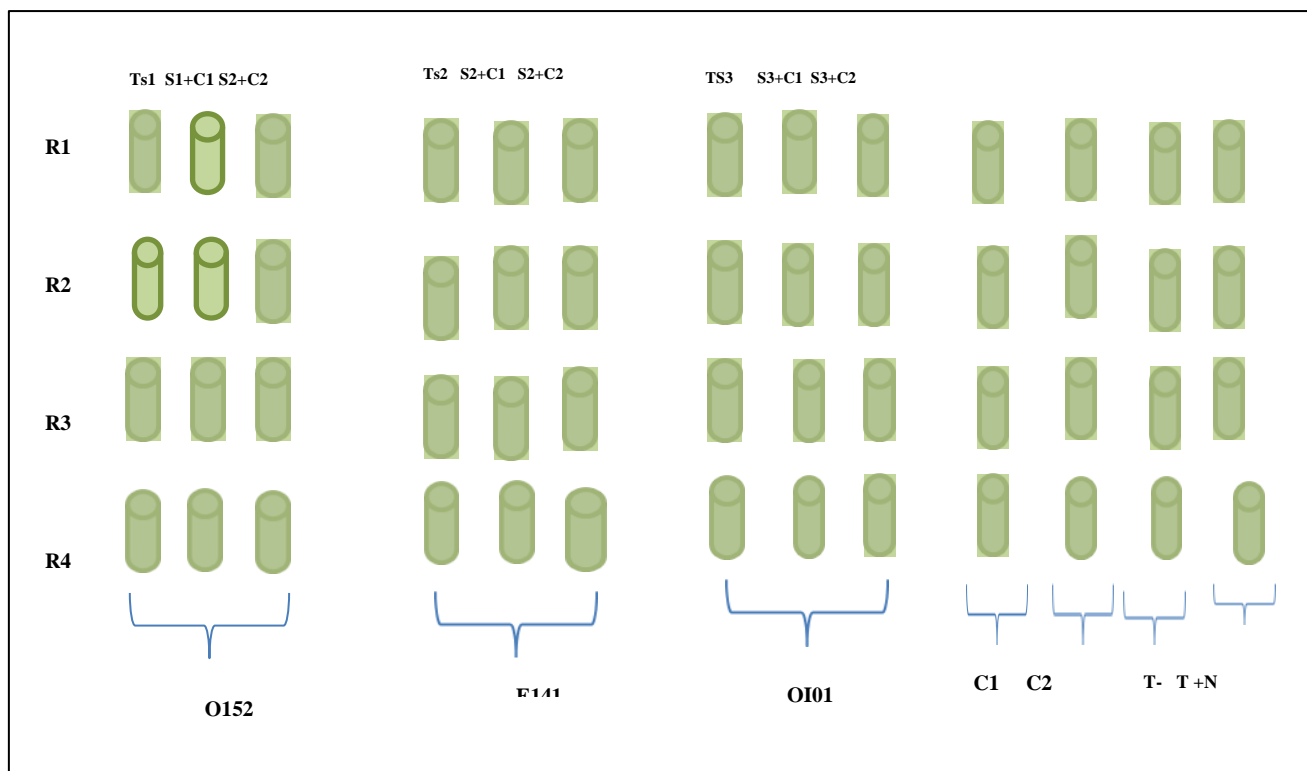
A l'aide d'une seringue, des spores hydratées sont utilisées pour l'inoculation des plantes de luzerne. L'inoculation se fait après levée des graines.



**Photo25:** inoculation fongique.

#### **II.2.6.5. Description du dispositif expérimentale**

L'expérimentation a été réalisée au niveau de la serre multi-chapelles de l'exploitation de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Le schéma général du dispositif expérimental est montré par la figure (4). Dans notre étude nous avons réalisé 4 répétitions pour chaque condition, en présence les souches ont été réalisées trois conditions (souche seulement (comme témoin), souche avec *curvilaria*, souche avec *Alternaria*), pour chaque souche, et en présence les champignons ont été inoculés séparément dans les pots en présence ( $\text{KNO}_3^-$ ) comme source d'azote, et en réalise deux conditions pour les témoins (témoin positive (en présence  $\text{KNO}_3^-$  comme source d'azote), et témoin négative sans azote).



**Figure 4:** Description du dispositif expérimentale (T-: témoin négative , T+N: témoin positive ; S<sub>1</sub>: O152; S<sub>2</sub>: E141 ; S<sub>3</sub>: OI11; C<sub>1</sub>: *Curvilaria sp.*; C<sub>2</sub>: *Alternaria sp.*; TS<sub>1</sub>: témoin S1; TS<sub>2</sub>: témoin S2; TS<sub>3</sub>: témoin S3.

### II.2.7. Irrigation et suivi des plantes

L'irrigation se fait avec la solution nutritive de Fâhareus à raison de 4 irrigations par semaine pour éviter le flétrissement des plantules.

## II.3. Paramètres mesurés

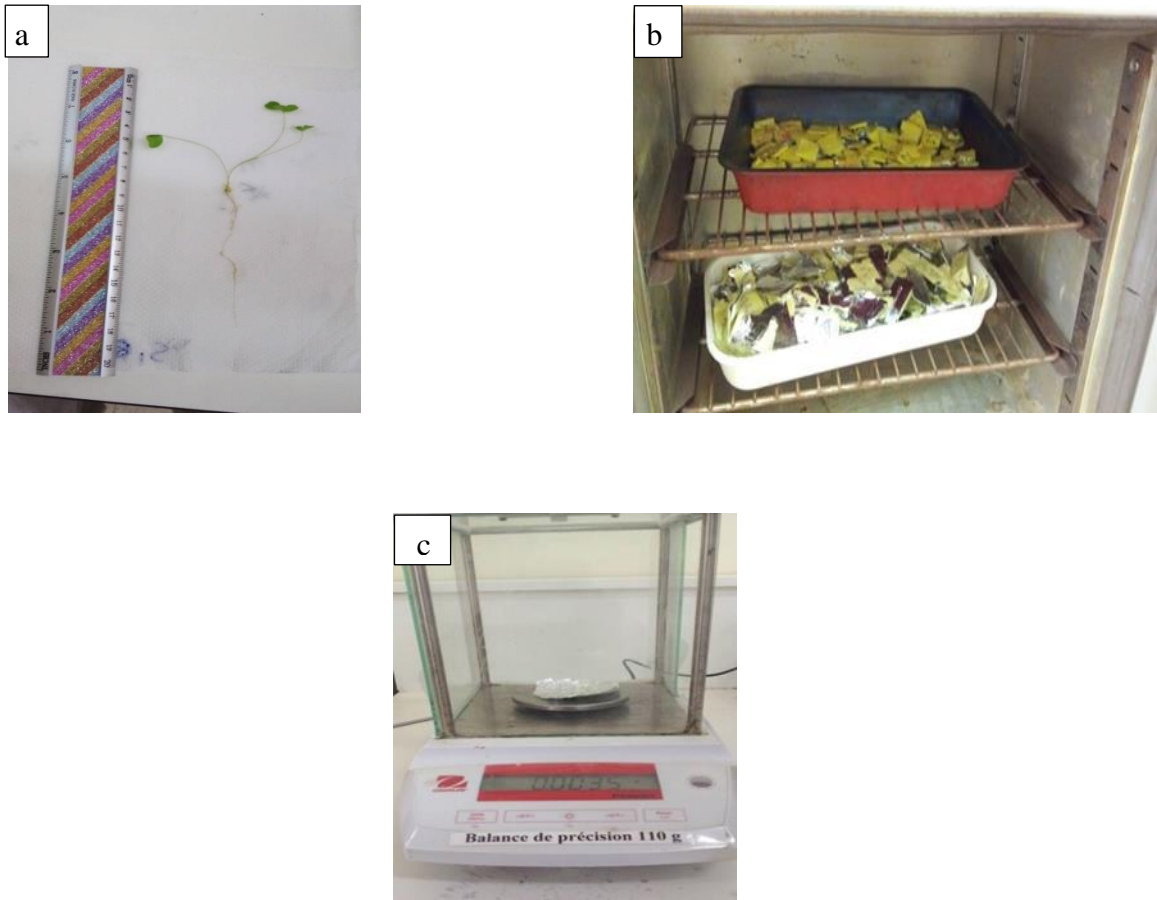
### II.3.1. La croissance et de la biomasse des plantes

Les plantes ont été prélevées 1 mois après le semis. Elles ont été soigneusement retirées du substrat et lavées doucement sous l'eau du robinet.

L'excès d'eau a été éliminé en pressant doucement les racines dans du papier absorbant. Les racines ont été coupées au niveau du collet et des mesures individuelles ont été moyennées sur les plantes de chaque gobelet. Les données de la hauteur des plantes (HT), la longueur des racines (LR), les poids secs des racines (PSR) et des tiges (PST) et le nombre de nodules (NN) ont été enregistrées. Les racines et les tiges ont été séchées séparément dans du papier aluminium à 70 °C dans une étuve pendant 48 h et les poids secs (PS) ont été enregistrés.



trés (Wang et *al.*, 2018). Les mesures du poids ont été effectuées à l'aide d'une balance électronique.



**Photo 26:** (a) Mesures la longueur des racines et la hauteur tiges; (b) Séchage dans l'autoclave; (c) Mesures du poids des racines et des tiges.

### II.3.2. Incidence de la maladie

Selon Madden et Hughes (1999), l'incidence ou la fréquence de la maladie peut être définie comme le nombre d'unités de plantes qui sont visiblement malade, relatif au nombre total estimé par gobelet. L'incidence aussi défini par SEMAL (1993), comme le moyen le plus rapide pour la mesure de la maladie ; il nécessite seulement le comptage du nombre d'unités malades qui peut être exprimé par un pourcentage du nombre total d'unités. Elle est mesuré selon l'équation suivante:

$$incidence I = \frac{\text{nombre des plantes malades}}{\text{nombre totale des plantes}} \times 100$$

**II.3.3. Agressivité de la maladie**

L'agressivité de la maladie peut être définie comme la région ou le volume de tissu de la plante qui est visiblement malade, habituellement relatif au tissu de la plante total (Madden et Hughes , 1999).

Le degré d'agressivité peut être exprimé par la proportion d'organes présentant des symptômes; ce système convient pour les systémiques généralisées ou pour celles où l'attaque déprécie complètement le produit de la récolte SEMAL, 1993.Elle est mesuré selon l'équation suivant:

$$\text{agressivité } A = \frac{\text{Nombre des feuilles malades}}{\text{Nombre des feuilles totale}} \times 100$$

**II.4. Analyses statistiques**

Les données recueillies sur différents paramètres ont été soumises à des analyses de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel XLSTAT, Version 2016.02.28451, et à la comparaison des moyennes des traitements à l'aide de la plus petite différence significative (LSD) de Tuckey à un niveau de probabilité de 5%.

*Chapitre III*  
*Résultats et discussion*

### III.1. Valeurs de pH et de CE du sable

L'analyse physico-chimique de nos échantillons de sable obtenu les résultats dans le tableau (2) suivant:

Paramètres	Sable avant traitement	Sable après traitement
CE (Ds/m)	1.21	0.12
pH	7.69	7.47

L'interprétation des résultats est faite selon les normes internationales (Aubert, 1978). Les valeurs obtenues montrent que le sable avant déminéralisation présentait des valeurs indiquant un sable peu salé et très légèrement alcalin. La déminéralisation a permis d'avoir un sable non salé et très légèrement acide.

D'après Orloff (2007), la plupart des cultures bénéficient d'une disponibilité maximum des nutriments à des pH compris entre 6,0 et 7,0. Nos valeurs de pH comprises entre 7,4 et 7,6 sont recommandées pour la production de luzerne car elles favorisent l'activité des bactéries rhizobiennes fixatrices d'azote.

Les valeurs de CE supérieures à 2 ds/cm peuvent diminuer les rendements de la luzerne, en fonction des ions spécifiques présents dans la solution d'eau du sol (Orloff, 2007). Puisque la CE obtenue est largement inférieure à 2 ds/cm, nous pouvons conclure que le sable traité ne posera pas de problèmes ou de propriétés pouvant nuire au processus de symbiose rhizobium-légumineuse.

### III.2. Valeurs de la densité optique (DO) des inoculums

La densité optique (DO) est une méthode de quantification de la croissance microbienne en relation avec la turbidité d'un inoculum, c'est-à-dire, sa densité optique. Une hypothèse est faite que le nombre de microbes dans toute suspension est directement proportionnel à la turbidité de la culture et en tant que tel, la dilution à une densité optique définie représente une concentration microbienne spécifique (Helen, 2022).

Différentes densités optiques ont été obtenues. Pour garantir, du moins approximativement, un nombre de bactéries égale dans toutes les conditions, une homogénéisation de cette dernière est effectuée par dilution des DO les plus élevées.

**Tableau 3:** Résultats obtenus après lecture à 600 nm de la densité optique (DO) des souches.

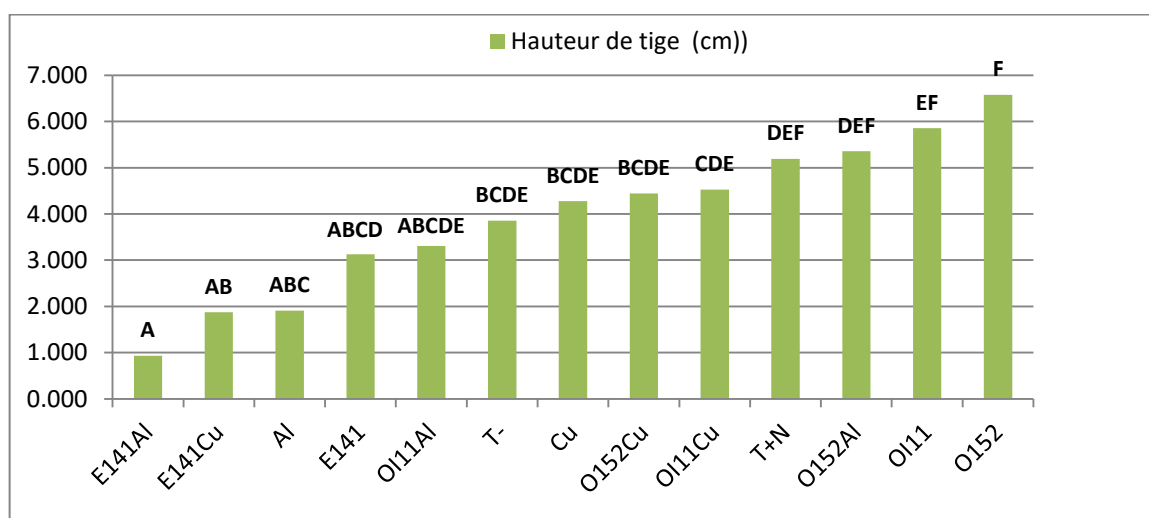
Souche	E141	O152	OI11
DO (600 nm)	0.184	0.394	0.374

Résultats montrent une faible dose d'charge microbienne pour la souche E141 pour cela nous avons inoculé les graines avec cette souche par un double de volume (10 ml) par rapport les autres souches(5 ml) pour uniformise la charge microbienne.

### III.3. Croissance des plantes

#### III.3.1. Hauteur de la partie aérienne

Les analyses statistiques montrent des différences significatives entre les traitements étudiés (Figure 5). Les résultats indiquent que la hauteur des plantes varie en fonction des traitements. Les valeurs les plus élevées ont été obtenues avec les plantes inoculées par les souches O152 et OI11 respectivement. Ces inoculum ont permis d'améliorer la croissance en hauteur de la luzerne comparée aux témoins (T- et T+) et à la souche E141 qui paraît être moins efficace.

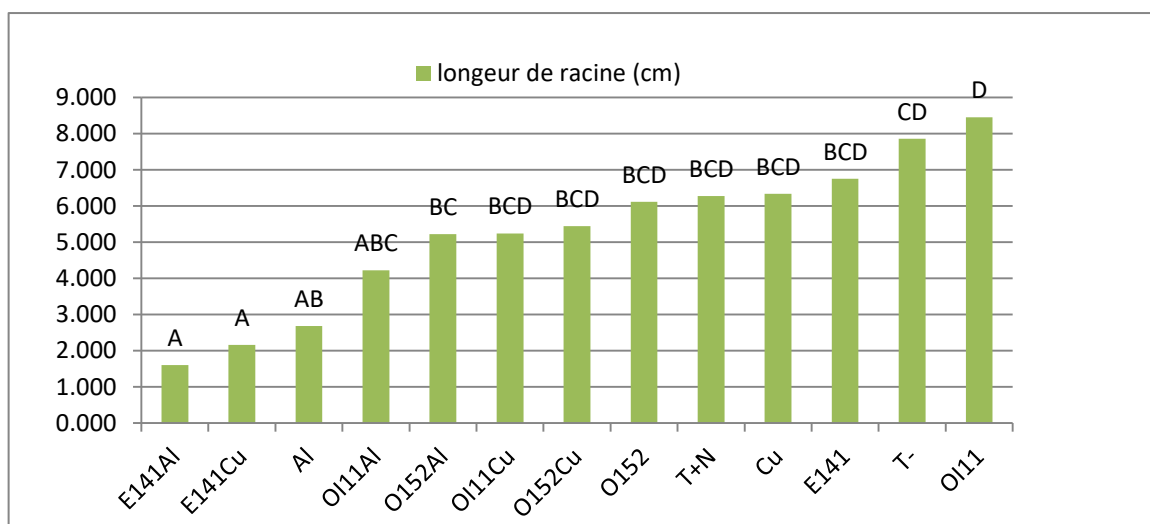
**Figure 5:** La croissance des parties aériennes dans les différents traitements.

La présence des champignons semble affecter négativement la hauteur des tiges. L'effet de l'*Alternaria* sp. sur la croissance en hauteur était plus marqué que celui de *Curvularia* sp. L'inoculation rhizobienne a amélioré la croissance des plantes en présence des champignons. La souche OI11 est la seule à avoir un effet significatif sur la croissance en présence

de *Curvularia* sp. De même, l'inoculation avec OI11 et O152 ont amélioré significativement la croissance en présence de *Alternaria* sp.

### III.3.2. Longueur de la partie souterraine

Les analyses statistiques montrent des différences significatives entre les traitements étudiés. Les résultats indiquent que la longueur des racines des plantes varie en fonction des traitements (Figure 6). Les valeurs les plus élevées ont été obtenues avec les plantes inoculées par la souche OI11 et le timon T-. L'inoculum OI11 a amélioré la croissance des racines de luzerne comparativement aux autres traitements qui ont obtenu une différence non significative entre eux.



**Figure 6:** La croissance des parties souterraines dans les différents traitements.

La présence des champignons semble affecter négativement la longueur de racine. L'effet de *Alternaria* sp. sur la croissance racinaire était plus marqué que celui de *Curvularia* sp. L'inoculation rhizobienne a amélioré la croissance des plantes en présence des champignons. Les souches OI11 et O152 montrent des effets significatifs sur la croissance en présence de *Alternaria* sp. En contenant, l'inoculation avec les souches OI11 et O152 a obtenu des résultats non significatifs sur le développement racinaire en présence de *Curvularia* sp. L'inoculation avec la souche E141, ont réduit qui a enregistré les valeurs les plus basses pour la croissance des plantes en présence des champignons.

Nous pouvons conclure que l'inoculation a eu un effet positif sur la croissance des plantes.

## **Discussion**

Nos résultats sont en concordance avec ceux trouvés dans plusieurs études qui montrent que l'inoculation de légumineuses avec des rhizobiums peut améliorer la croissance et le développement des plantes par l'apport d'azote fixé aux plantes ou par d'autres mécanismes (Wolde-meskel et *al.*, 2018; Matse et *al.*, 2020).

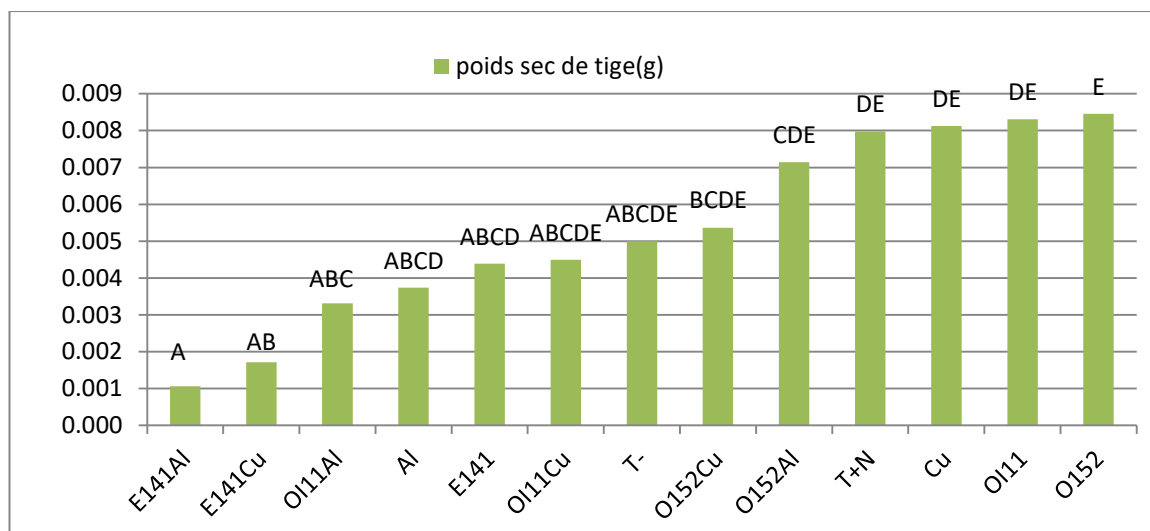
Les résultats montrent que la hauteur des plantes varient en fonction de souches rhizobiennes utilisée. Selon N'Gbesso (2010), les paramètres morphologiques et physiologiques d'une légumineuse donnée se trouvent améliorés en face d'une souche efficiente.

Nos conclusion confirment, également, l'effet positif de l'inoculation rhizobienne sur l'inhibition de certains champignons phytopathogènes. Selon Khan et *al.* (2017) et Volpiano et *al.* (2019), l'utilisation d'inoculants rhizobiens comme agents de lutte biologique contre les maladies des plantes est pratiquée depuis des siècles, car des rapports ont confirmé que les inoculants rhizobiens confèrent aux plantes une résistance contre les agents pathogènes responsables de maladies. Le développement d'inoculants rhizobiens avec un double attribut de fixation de l'azote et d'antagonisme contre les phytopathogènes peut contribuer à augmenter la croissance et la productivité des plantes (Mabrouk et *al.*, 2018).

### **III.4. Poids secs**

#### **III.4.1. Poids sec de la partie aérienne**

L'effet de l'inoculation rhizobiennes et des champignons sur le rendement en biomasse sèche de la partie aérienne sont mentionnés dans la figure 7.



**Figure 7:** Poids sec de la partie aérienne des plantes dans les différents traitements.

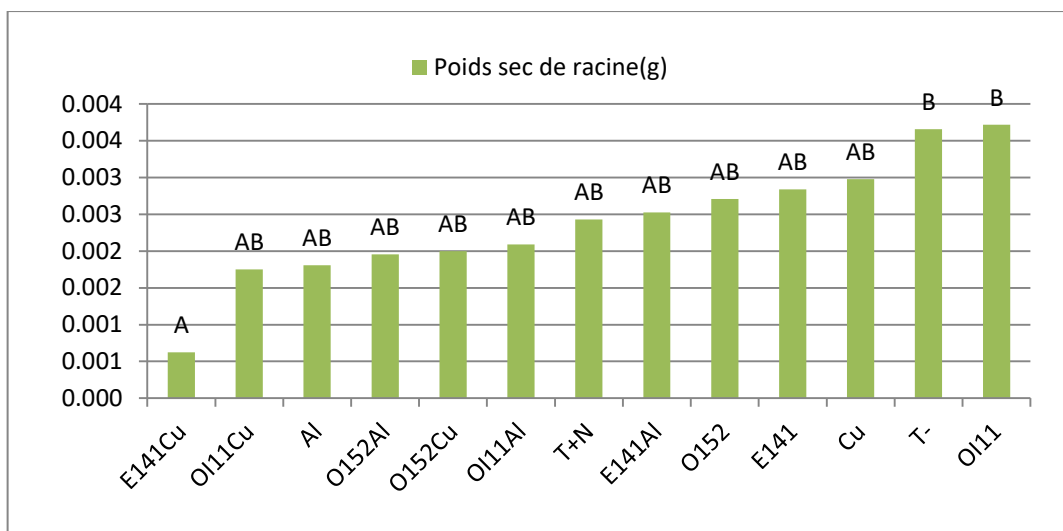
L'analyse de variance montre des différences significatives entre les traitements étudiés. Les résultats indiquent que le poids sec de tige des plantes varie en fonction des traitements. La condition d'inoculation avec la souche O152 a donné la valeur la plus élevée (Figure 5). Cette inoculum a permis d'améliorer la biomasse de partie aérienne de la luzerne comparée aux autres conditions.

L'inoculation fongique a affecté négativement la biomasse aérienne. L'effet de l'*Alternaria* sp sur la biomasse de tige était plus marqué que celui de *Curvularia* sp. L'inoculation rhizobiennes n'a pas amélioré la biomasse de partie aérienne des plantes en présence des champignons qu'avec la souche O152 face à l'*Alternaria* sp. La souche O152 est la seule à avoir un effet significatif sur la croissance en présence de l'*Alternaria* sp. *Curvularia* sp. a eu une incidence légère sur la biomasse sèche de la tige.

#### III.4.2. Poids sec de la partie souterraine

La figure 8 montrent des différences significatives entre les traitements étudiés. L'inoculum OI11 a amélioré la biomasse racinaires de la luzerne comparativement aux autres traitements qui ont obtenu une différence non significative entre eux suivie par le témoin T-.





**Figure 8:** Poids sec de partie souterrain des plantes dans les différents traitements.

La présence des champignons semble affecter négativement sur biomasse racinaire. L'effet de l'*Alternaria* sp. sur la croissance racinaire était plus marqué que celui de *Curvularia* sp. Les résultats non significatifs ont obtenu entre les différentes combinaisons en présence les champignons.

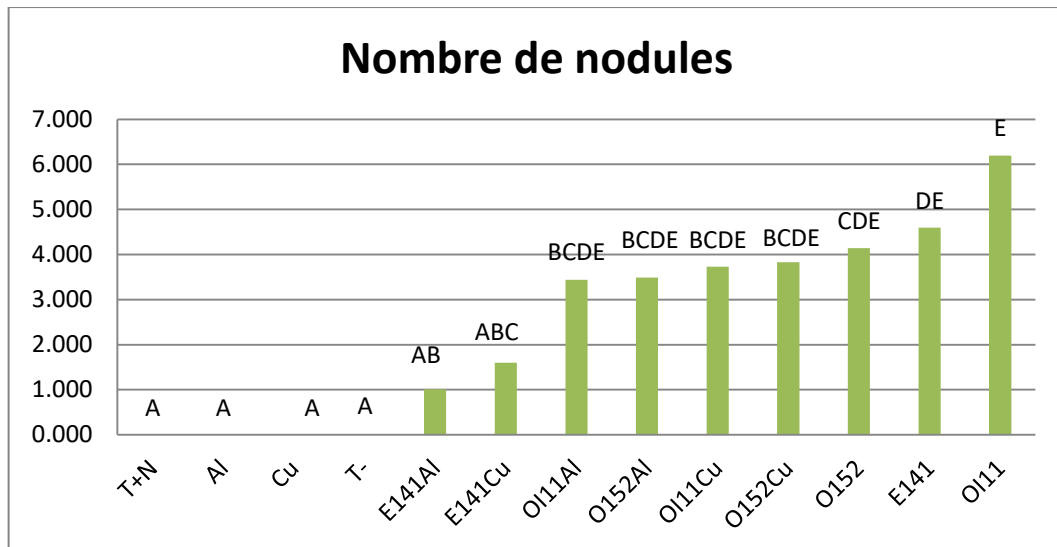
### Discussion

L'effet positif des rhizobia dans l'amélioration de la croissance des légumineuses à été beaucoup documenté. Selon Miloud (2018) et Samago et al. (2018), l'inoculation rhizobienne contribue à la stimulation de la croissance des espèces de légumineuses par rapport à leurs homologues non inoculés. L'inoculation rhizobienne a également été efficace pour favoriser la croissance de l'arachide en présence de *Fusarium oxysporum*, augmentant le poids sec des parties aériennes par rapport aux témoins. Ces avantages peuvent être attribués à un meilleur contrôle de la maladie en présence des bactéries, à une meilleure nutrition, due notamment à une nodulation plus importante (Attab et al.,2019).

Selon Volpiano et al., 2019, les souches de rhizobiums ont été signalées comme inhibitrices de plusieurs champignons, ce qui a entraîné une résistance face aux les attaques pathogènes, tout en favorisant l'augmentation du rendement des plantes en terme de biomasse.

### **III.5. Nombre total des nodules**

Les nodosités formées sur les racines de chaque plante ont été dénombrés et la variabilité de la capacité infective des souches a été mise en évidence.



**Figure 9:** Le moyenne de nombre de nodule dans des diffèrent traitement.

Les résultats de l'analyse statistique (Figure 9) du nombre de nodules par plante montrent des différences significatives entre les traitements. Il apparaît que la nodulation, avec les trois souches, a donné les meilleurs résultats de nodulation. La souche OI11 s'est montrée la plus nodulante avec une moyenne de 6,2 nodules/plante, suivie par les souches E141 et O152 dont les moyennes enregistrées sont de 4,6 et 4,14 nodules/plante respectivement.

La présence des champignons affecte négativement la nodulation. Les deux champignons *Curvularia* et *Alternaria*, en combinaison avec la souche E141, ont réduit le plus la nodulation qui a enregistré les valeurs les plus faibles. Cela peut être dû à la compétitivité faible de la souche rhizobienne en question. Quant aux combinaisons entre les champignons et les souches O152 et OI11, les résultats n'étaient pas significativement différents et montrent une réduction de la nodulation moins marquée que celle induite en présence de la souche E141.

Les conditions témoins et les conditions avec champignons en absence d'inoculum rhizobiens, n'ont pas enregistrées de nodulation. Ce résultat indique que notre expérimentation n'a pas été contaminée.

### **Discussion**

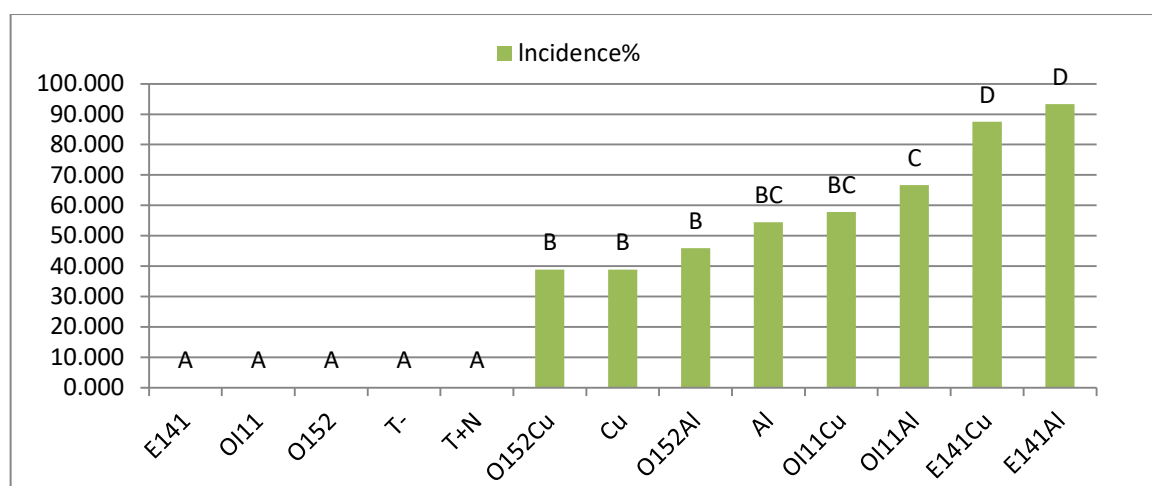
Nos résultats ont montré que la nodulation chez la souche E141 n'a pas été efficace sur la croissance et la biomasse des plantes par rapport aux autres souches. Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés par Okazaki et al. (2016) qui atteste toutes les souches rhi-

zobiennes n'ont pas la même efficacité symbiotique. Malgré la présence de nodules, les plantes inoculées par *Bradyrhizobium elkanii* présentaient des symptômes typiques de manque d'azote, indiquant que les nodules formés n'étaient pas efficaces. Par contre, d'autres souches pouvaient induire des nodules plus efficaces sur la racine et la tige.

Mouffok et al. (2019) a montré également que l'efficacité de la symbiose rhizobienne chez la luzerne indique que la biomasse sèche aérienne et la quantité de l'azote accumulée dans la partie aérienne, dépendent essentiellement de leur taux de nodulation et ce quelle que soit l'espèce et la localité considérée.

### III.6. Incidence de la maladie

L'analyse de la variance montre des différences significatives de l'incidence des maladies sur les plantes qui varient en fonction des traitements (Figure 10). L'inoculation rhizobienne a pas eu l'effet escompté dans la mesure ou seule la souche O152 (O152Cu et O152Al) a enregistré l'incidence la plus faible des taux de 38.88 et de 45.88 % respectivement, par rapport aux autres souches. La souche E141 n'a pas été compétitive et les plantes inoculées par cette dernière représentent l'incidence des maladies les plus importantes.

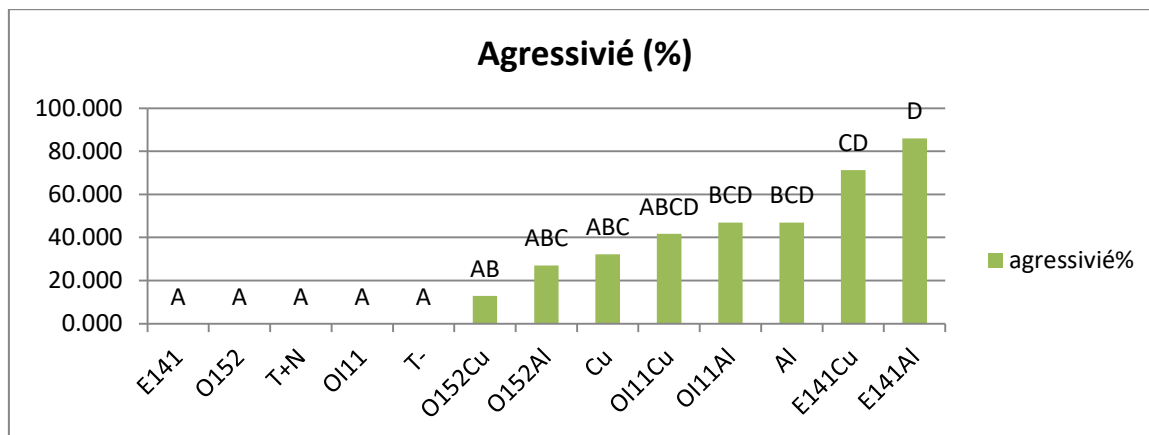


**Figure 10:** Incidence des maladies sur les plantes.

### III.7. Agressivité de la maladie

La figure 11 montre des différences significatives entre les combinaisons. Les résultats montrent que l'agressivité des maladies varie en fonction des traitements. Les valeurs les plus élevées ont été obtenues avec la souche O152 avec un taux très faible d'agressivité allant de

12,88 à 26,22% par rapport aux témoins de *Curvilaria* sp. et *Alternaria* sp. et OI11 respectivement (32,22 et 46,96%).



**Figure 11:** Pourcentage d'agressivité des maladies sur les plants dans différents traitements.

Les conditions témoins et les conditions avec d'inoculum rhizobiens seulement, n'ont pas enregistré d'indidences de maladies. Ce résultat indique que notre expérimentation n'a pas été contaminée. Aussi, l'inoculation avec la souche E141 a enregistré les valeurs les plus élevées pour l'incidence et l'agressivité des maladies de la plante en présence des champignons.

### Discussion

Les plantes inoculées par *Curvilaria* sp. (voir photos en annexe) présentent les symptômes caractéristiques de la maladie, tel que décrit par Zhang et al. (2017) ; des taches circulaires en forme de V, brun foncé, entourées de bords jaunes sont observés sur la plante atteinte.

Nos résultats sont en concordance avec ceux trouvés par Prabhavati et al. (2018) qui ont signalé que les rhizobiums inhibaient de manière significative la croissance de champignons pathogènes. Dans l'étude réalisée par Sharif et al. (2003), 54% d'*Alternaria* sp. sont inhibés par les Rhizobium. Attab et al. (2019) ont signalé que les plantes inoculées avec des rhizobies antagonistes ont induit une réduction du nombre de plantes malades inoculées par des champignons pathogènes.

Tout comme nous l'avons expliqué en résultats, les travaux de Kgatleet et al. (2020) indiquent que la sévérité de la brûlure des feuilles d'*Alternaria* sp. a été négativement corrélée au rendement et a permis de réduire considérablement le diamètre sur les feuilles et la tige.

Selon Kanouni et al. (2018), les réponses des plantes face à l'altérioriose sont en fonction des souches rhizobiennes ayant des compétitivités différentes.

Le test antagoniste *in vitro* réalisé par Azib et al. (2022) a montré que les souches de *S. meliloti* réduisaient de manière significative la croissance de *Curvularia* sp. à 31,27%, *Alternaria* sp. à 40,12% respectivement, confirmant ainsi leur rôle dans le contrôle de la croissance de nombreux champignons phytopathogènes du sol appartenant à différents genres. Nos résultats *in vivo* étaient plus élevés avec une moyenne de réduction de l'incidence pour le *curvularia* sp. et *Alternaria* sp. de 61.38% et 68.62% respectivement.

La souche E141 n'a pas été efficace contre les agents phytopathogènes *in vivo* alors qu'elle l'était *in vitro* avec les mêmes champignons d'après Ahmaha et Besseddik (2021) qui ont attribué à cette E141 une importante capacité d'inhibition de plus de 75% contre *Fusarium* sp. *Stemphylium* sp. et *Alternaria* sp.

Les rhizobiums sont des agents de biocontrôle majeurs contre les agents pathogènes des plantes dans les écosystèmes naturels et agricoles par la synthèse et la libération de composés signalétiques flavonoïdes et isoflavonoïdes, et explorent l'importance biologique de la production de phytoalexines dans la nodulation des légumineuses et la défense contre les pathogènes (Mapope et al., 2013). Aussi, les antibiotiques produits par les rhizobiums jouent un rôle important dans le contrôle des maladies (Deshwal et al., 2003; Volpiano et al., 2019).

Selon Das et al. (2017) et Volpiano et al. (2019), l'activité antagoniste des rhizobiums est principalement attribuée à la production d'antibiotiques, d'acide cyanhydrique (HCN), d'enzymes mycolytiques et de sidérophores. Il est rapporté également que les rhizobiums induisent une résistance systémique et améliorent l'expression des gènes liés à la défense des plantes, qui immunisent efficacement les plantes contre les agents pathogènes.

Plett et al. (2021), les moyens par lesquels les microbes de lutte biologique opèrent pour contrer les organismes pathogènes sont soit par des mécanismes directs, tels que la libération de composés qui tuent ou ralentissent la croissance de l'organisme pathogène, soit par des mécanismes indirects comme l'induction du système immunitaire des plantes.

## *Conclusion et perspectives*

Les travaux menés au cours de cette étude, relative à l'évaluation du pouvoir de biocontrôle, *in vivo*, de deux maladies fongiques (*Alternaria sp* et *Curvularia sp.*) recensées récemment dans région de Ouargla, attaquant la luzerne (*Medicago sativa* L.) par inoculation avec trois souches rhizobiennes (O152, OI11 et E141) provenant de différentes zones agricoles des régions de Ouargla et d'El Oued, nous ont permis de rassembler beaucoup d'informations sur le rôle des rhizobia sur le biocontrôle des agents fongiques phytopathogènes et les propriétés de lutte biologique contre ces derniers.

À travers les résultats obtenus, la souche O152 s'est montrée la plus efficace. Elle a contribué à l'inhibition la plus importante du *Curvularia sp.* qui a eu un taux d'incidence de 38.88% et 45.88% pour l'*Alternaria sp.* Malgré sa nodulation moyenne, elle a conduit à l'augmentation de la croissance longueur et en biomasse des plantules par rapport aux autres souches utilisées. La souche E141 n'a pas été efficace dans tous les paramètres étudiés.

En général, l'inoculation de légumineuses avec des rhizobiums représente un moyen alternatif pratiquement efficace, écologiquement sûr et économiquement rentable, permet de tirer le maximum d'avantages de la production agricole et le contrôle le plus faisable des maladies des plantes. Il est donc un substitut efficace à l'utilisation de produits chimiques dans l'amélioration de la productivité agricole et la lutte contre les maladies. Par conséquent, des études sur l'exploitation du potentiel des rhizobiums permettraient d'étendre la technologie à l'usage des petits exploitants agricoles.

Nous estimons que les résultats auxquels nous sommes parvenus restent partiels et méritent d'être poursuivis et beaucoup restent à faire:

L'application de ces tests de biocontrôle sur d'autres agents phytopathogènes et même avec d'autres souches rhizobiennes

Mesurer de la concentration de l'azote dans la plante et cela pour voir l'efficacité des rhizobia de fasciations d'azote en présence d'agents pathogènes.

Mesurer la concentration des suspensions sporales pour homogénéiser la concentration pendant l'inoculation.

## *Références bibliographiques*



**Références bibliographiques**

- Abbasi, P. A., Ali, S., Renderos, W., Naeem, H. A., & Papadopoulos, Y. (2018). First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot and blight symptoms on alfalfa in Canada. *Canadian journal of plant pathology*, 40(3), 451-455.
- Abdiche, A., & Bouziane, Z. E. (2008). Les maladies fongiques des plantes légumineuses (Doctoral dissertation, Université de jijel).
- Abou Al Fadil, T. (2006). Déterminisme de la tolérance du tournesol à *Phoma macdonaldii* au collet et sur racines: approches génétiques et histologiques (Doctoral dissertation).
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* 5th Edition: Elsevier Academic Press. Burlington, Ma. USA, 79-103.
- Ahammed, G. J., & Yang, Y. (2021). Mechanisms of silicon-induced fungal disease resistance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 165, 200-206.
- Akhter, S. (2014). Interactions entre *Rhizobium*, bactéries antagonistes et pathogènes fongiques chez la féverole.
- Alabouvette, C., & Cordier, C. (2018). Fertilité biologique des sols: des microorganismes utiles à la croissance des plantes. *Innovations Agronomiques*, 69, np.
- Aomari, O. (2012). Comportement de seize cultivars de luzerne pérenne (*Medicago sativa* L.) en essai pluvial et irrigué au niveau de la Mitidja (Doctoral dissertation).
- Attab, S., Bissati, S., Azib, S. et Salhi, N. (2019). Effets des bactéries nodulantes des racines de l'arachide (*arachishypogaea* L.), isolées des sols Algériens du sahara, sur la croissance et le biocontrôle de *fusariumoxysporum*. *Revue internationale* , 75 (8/1).
- Aubert, G. (1978). *Méthodes d'analyses des sols*. 2ème Edition, Centre Régional de Documentation Pédagogique, CRDP Marseille, 191p.
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C. D., Banks, H., Barbosa, A. R., Pinto et *al.* (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon*, 66(1), 44-77.

- Azib, S. (2020). La symbiose rhizobium-luzerne : étude de la diversité rhizobienne et essais d'inoculation en vue d'améliorer les rendements en fourrage dans le Sahara septentrional est-algérien. PhD thesis, University of Ouargla, Algeria
- Azib, S. Attab, S. Cheloufi, H. Bouras, N. D. Holtz, M. (2022). Phenotypic and Genotypic Diversity of Microsymbionts Nodulating *Medicago sativa* (L.) in the Algerian Sahara. Pages 227 – 238
- Azib, S., Cheloufi, H., Attab, S., & Bouras, N. (2019). Improvement of alfalfa growth under water stress by inoculation with *Sinorhizobium meliloti* strains from the Algerian Sahara. *International Journal*, 75(7/1).
- Azib, S., Idder, A., Attab, S., Bensalem, S., Djeroudi, O. (2022). Antagonistic activity of *Sinorhizobium meliloti* strains against pathogenic fungi isolated from alfalfa in Algerian Sahara. *International Journal of Biosciences*, 20(2), 247-254
- Baudoin, J. P. (2001). Contribution des ressources phytogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. BASE.
- Berg, LE, Miller, SS, Dornbusch, MR et Samac, DA (2017). Pourriture des graines et fonte des semis de la luzerne au Minnesota causées par les espèces *Pythium* et *Fusarium*. *Maladie des plantes* , 101 (11), 1860-1867 .
- Berrada, H., Fikri-Benbrahim, K. (2014). Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. *British Microbiology Research Journal*, 4(6), 616.
- Bongoua-devisme, A. J., Kouadio, K. P., Tanoh, A. G., Ndoye, F., Diouf, D. (2018). Effet de la dose rhizobienne (*Bradyrhizobium* ORS) à apporter au repiquage sur la croissance et la nodulation des plants de *Acacia mangium* cultivés sur de la fibre de coco. *Afrique SCIENCE*, 14(6), 116-125.
- Bouton, J. H. (2021). Alfalfa. University of Georgi.
- Charaba, F. (2015). Etude du comportement de quelques populations locales de *Medicago sativa* L. sous contrainte saline (Doctoral dissertation, Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila).

- Coba de la Pena, T., Fedorova, E., Pueyo, J. J., & Lucas, M. M. (2018). The symbiosome: legume and rhizobia co-evolution toward a nitrogen-fixing organelle?. *Frontiers in plant science*, 8, 2229.
- Dabé, D., Noël, Z. G., & Adolphe, Z.(2017) Propriétés Antifongiques Des Légumineuses Médicinales De Côte d'Ivoire: Cas De *Crotalaria retusa* L.(Fabaceae) Sur La Croissance in vitro De *Phytophthora* sp. Et *Fusarium solani*, Deux Champignons Phytopathogènes.
- Das K, Prasanna R, Saxena AK. (2017). Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia microbiologica* 62(5), 425-435.
- Das, K., Prasanna, R., Saxena, A. K. (2017). Rhizobia: a potential biocontrol agent for soil-borne fungal pathogens. *Folia microbiologica*, 62(5), 425-435.
- Deshwal VK, Pandey P, Kang SC, Maheshwari DK. ( 2003). Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi. *Indian Journal of Experimental Biology* 41, 1160-1164.
- Deshwal, V. K., Pandey, P., Kang, S. C., Maheshwari, D. K. (2003). Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi.
- Djerroudi, O. (2017). Caractérisation Morpho-Physiologique d'une Halophyte, *Atriplex*, aux Conditions Arides. Thèse de Doctorat Es Sciences, Université d'Oran.
- Drevon, J. J. (2017). Efficacité d'utilisation du phosphore pour la fixation symbiotique de l'azote et phytases des nodules de légumineuses. *Innovations Agronomiques*, 60, 3-10.
- Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones et al. (2019). Legume nodulation: the host controls the party. *Plant, cell & environment*, 42(1), 41-51.
- Frate, C. A., Davis, R. M., (2007). Alfalfa diseases and management. University of California Agriculture and Natural Resources
- Gao, P., Li, Y., Guo, Y., & Duan, T. (2018). Co-inoculation of lucerne (*Medicago sativa*) with an AM fungus and a rhizobium reduces occurrence of spring black stem and leaf spot caused by *Phoma medicaginis*. *Crop and Pasture Science*, 69(9), 933-943.

- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L., Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 5(4), 355-377.
- Guyader, S. (2020). Maladies cryptogamiques: méthodes de lutte (Doctoral dissertation, Université des Antilles-Site de Guadeloupe (UA)).
- Habhoub, M., Salhi, B. (2020) Isolement et identification des champignons phytopathogènes affectants la luzerne (*Medicago sativa* L.) dans la région de Ouargla.
- Helen, LB. (2022). *Encyclopedia of Infection and Immunity: Microbial Growth*: Elsevier, Volume 1, 2022, Pages 324-335.
- Hubbard, M., Germida, J., & Vujanovic, V. (2012). Fungal endophytes improve wheat seed germination under heat and drought stress. *Botany*, 90(2), 137-149.
- Huyghe, C., Delaby, L., Rosellini, D., Veronesi, F. (2014). Perspectives of alfalfa in Europe. *Legume Perspectives*, 4, 5-6.
- Kanouni, L., Larous, L., Mezaache-Aichour, S. (2018). Effet inhibiteur des rhizobiums isolés de plusieurs légumineuses contre les champignons phytopathogènes. *Recherche et examen annuels en biologie*, 1-16.
- Kesoju, S. R., Greene, S. L., Boydston, R. A. (2016). Genetically engineered alfalfa and feral alfalfa plants: what should growers know.†
- Kgatle MG, Flett B, Truter M, Aveling TAS. 2020. Control of *Alternaria* leaf blight caused by *Alternaria alternata* on sunflower using fungicides and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection* 132,105146
- Khawla, K., Dounia, A. (2020). Etude des différents types d'interactions microbiennes avec les plantes légumineuses.
- Kuykendall, L. D., Young, J. M., Martínez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H. (2015). Rhizobium. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-36.
- Laranjo, M., Alexandre, A., Oliveira, S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological research*, 169(1), 2-17.

- Lebbida F.,( 2009). Caractérisation des rhizobia de quelques acacias d'Algérie en vue de la production d'inoculum pour la bactérisation des acacias en pépinières. Mémoire. Magister. INA. Alger. 82p.
- Li, Y., Huang, H., Wang, Y., Yuan, Q. (2018). Transcriptome characterization and differential expression analysis of disease-responsive genes in alfalfa leaves infected by *Pseudopeziza medicaginis*. *Euphytica*, 214(7), 1-14.
- MAAEF (1931). Les maladies des semis et jeunes plants en pépinière. Ministère de L'agriculture, Administration Des Eaux Et Forêts. pp.177-188, hal-03483758f
- Mabrouk, Y., Hemissi, I., Salem, IB, Mejri, S., Saidi, M., Belhadj, O. (2018). Potentiel des rhizobiums pour améliorer la fixation de l'azote et les rendements des légumineuses. *Symbiose* , 107 (73495).
- Madden, L. V., Hughes, G. (1999). Sampling for plant disease incidence. *Phytopathology*, 89(11), 1088-1103.
- Mapope, N., Dakora, F. D. (2013). Role of flavonoid and isoflavonoid molecules in symbiotic functioning and host-plant defence in the leguminosae. In *Chemistry for Sustainable Development in Africa* (pp. 33-48). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Martin, FN, Abad, ZG, Balci, Y., Ivors, K. (2012). Identification et détection de *Phytophthora* : faire le point sur nos avancées, identifier nos besoins. *Maladie des plantes* , 96 (8), 1080-1103.
- Matse, D. T., Huang, C., Huang, Y., Yen, M. (2020). Effects of coinoculation of *Rhizobium* with plant growth promoting rhizobacteria on the nitrogen fixation and nutrient uptake of *Trifolium repens* in low phosphorus soil. *J. Plant Nutr.* 43, 739–752.
- Mauriès, M. (2003). La luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation. France Agricole Editions.
- Melis, R. A., Julier, B., Pecetti, L., Thami-Alami, I., Abbas, K., Laouar, M., et al. (2017). La culture de la luzerne dans un climat méditerranéen.
- Merzoug, A., Taleb, M., Sahla, A. (2018). Identification des principaux agents fongiques responsables du dépérissement vasculaire et pourriture racinaire des oliviers en pépinières dans le Nord-ouest algérien. *Revue Agrobiologia*, 8(2), 1117-1124.

- Mhamdi, N. (2011). Étude d'un mélange Sinorhizobium meliloti-Trichoderma viride produit dans les eaux usées d'amidon: optimisation et effet sur la luzerne (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).
- Milić, D., Katanski, S., Karagić, Đ., Vasiljević, S. (2016). Alfalfa—the queen of forage crops: a guide for successful production.
- Miloud, Y. (2018). Etude du potentiel bénéfique des souches de Rhizobium pour Medicago truncatula: symbiose, solubilisation du phosphate et lutte contre la verticilliose (Doctoral dissertation).
- Mohamed, Lazali, Samira, Brahim, Laurie, Amenc, Josiane, Abadie, Didier, Blavet, Jacques, D. J. (2019). Variabilité Génotypique De l'efficacité d'utilisation Du Phosphore Pour La Fixation Symbiotique d'azote Chez Le Haricot. *Agrobiologia*, 9(1), 1386-1396.
- Mondo, J., Balezi, A., Mugomoka, V., Zigashane, L., Bagula, E., Kashosi, T., Mushagalusa, G. (2016). Effets des milieux de culture (PDA, SDA, SPDA, blé et maïs) sur la productivité in vitro de la souche P969 du *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. *Afrique Science*, 12(4), 374-381.
- Morsy, K. M., Abdel-Monaim, M. F., Mazen, M. M. (2011). Use of abiotic and biotic inducers for controlling fungal diseases and improving growth of Alfalfa. *World J Agric Sci*, 7(5), 566-576.
- Mouafek, A. (2010). La symbiose à rhizobia chez la fève (*Vicia faba* L.) et La luzerne (*Medicago sativa* L.) dans la région de Biskra (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).
- Mouffok, A., Belhamra, M., Mouffok, S. (2019). L'étude de la fixation symbiotique de l'azote chez la fève et la luzerne cultivée sous stress salin.
- Nasraoui, B. (2008). Principales maladies fongiques des céréales et des légumineuses en Tunisie. Kef: Centre de Publication Universitaire.
- Nikiema, F. W., Nitiema, L. W., Nana, A. T., Koïta, K., Ouédraogo, M. (2019). Efficacité du Calthio C en traitement de semences de riz contaminées par *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn. *Science et Technique*, 38(1), 119-129.

- Niu, X., Gao, H., Qi, J., Chen, M., Tao, A., Xu, J. et al. (2016). Colletotrichum species associated with jute (*Corchorus capsularis* L.) anthracnose in southeastern China. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Okazaki, S., Tittabutr, P., Teulet, A., Thouin, J., Fardoux, J., Chaintreuil, C., et al. (2016). Symbiose rhizobium-légumineuse en l'absence de facteurs Nod : deux scénarios possibles avec ou sans le T3SS. *La revue ISME* , 10 (1), 64-74.
- Orloff, S.B. (2007). Choosing appropriate sites for alfalfa production. In C.G. Summer and D.H. Putnam, eds, *Irrigated Alfalfa Management for Mediterranean and Arid Zones*. Chapter 2. Oakland, University of California Natural Resources Publication 8288.
- Plett, JM, Solomon, J., Snijders, F., Marlow-Conway, J., Plett, KL et Bithell, SL (2021). L'ordre de succession microbienne affecte les efforts de lutte biologique à médiation par les rhizobiums contre la pourriture phytophthoréenne des racines. *Recherche microbiologique* , 242 , 126628 .
- Prabhavati, E., Masilamani, AJA, Divi, VRSG et Konada, VM (2018). Inhibition de champignons phytopathogènes par des isolats de *Rhizobium* producteurs de chitinase obtenus à partir de nodules racinaires de *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verde. *Journal de botanique du Bangladesh* , 47 (1), 161-164.
- Pujari, J. D., Yakkundimath, R., Byadgi, A. S. (2015). Image processing based detection of fungal diseases in plants. *Procedia Computer Science*, 46, 1802-1808.
- Ray, M., Ray, A., Dash, S., Mishra, A., Achary, K. G., Nayak, S., Singh, S. (2017). Fungal disease detection in plants: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 708-723.
- Revellin, C. (2012, May). Les symbioses fixatrices d'azote. In *Alliances au pays des racines-14 e Colloque Scientifique de la Société d'Horticulture de France*, Paris, FRA.
- Richard, C. & Martin, J.-G. (1991). Pourriture phytophthoréenne de la luzerne au Québec : distribution géographique des symptômes et étude des facteurs édaphiques pouvant favoriser leur expression. *Phytoprotection*, 72(3), 87-95
- Ridel, A., Pierucci, B., & Nicot, P. C. (2014). Des micro-organismes bénéfiques pour le biocontrôle des maladies des plantes.

- Samago, TY, Anniye, EW et Dakora, FD (2018). Le rendement en grain des variétés de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) est nettement augmenté par l'inoculation de rhizobium et l'application de phosphore en Éthiopie. *Symbiose* , 75 (3), 245-255.
- Schmidt, TM, Thomé, AHE, Sperotto, RA et Granada, CE (2019). Effet de l'inoculation de rhizobiums sur le développement d'agents pathogènes transmis par le sol infectant les plants de haricots communs. *Journal européen de pathologie végétale* , 153 (3), 687-694.
- Sellahi, F. Z. Les Bactéries nodulant les Légumineuses (BNL).F. Z. (2008). Les Bactéries nodulant les Légumineuses (BNL).
- Seppänen, M. M., Alitalo, V., Bäckström, H. K., Mäkinieniemi, K., Jokela, et al. (2018). Growth, freezing tolerance, and yield performance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars grown under controlled and field conditions in northern latitudes. *Canadian Journal of Plant Science*, 98(5), 1109-1118.
- Shamseldin, A., Abdelkhalek, A., & Sadowsky, M. J. (2017). Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis*, 71(2), 91-109.
- Sharif T, Khalil S, Ahmad S. Effect of Rhizobium sp. on growth of pathogenic fungi under in vitro conditions. *Pak J Biol Sci.*(2003); 6: 1597-1599.
- Somasegaran, P., Hoben, H. (1985). *Methods in legume-Rhizobium technology*. University of Hawaii NifTAL Project, Paia, Hawaii.
- Soro, S., Ouattara, D., Zirihi, G. N., Kanko, C., N'guessan, E. K., Kone, D., et al. (2010). Effet Inhibiteur in vitro et in vivo de l'extrait de Poudre et de l'huile essentielle de *Xylopiiaaethiopica* (Dunal) A. Rich.(Annonaceae) sur *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici* (Forl), Champignon Parasite des Cultures de Tomate. *European Journal of Scientific Research*, 39(2), 279-288.
- Suprpta, D. N. (2012). Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens. *J ISSAAS*, 18(2), 1-8.D. N. (2012).
- Tamiru, G., Muleta, D. (2018). The Effect of Rhizobia Isolates Against Black Root Rot Disease of Faba Bean (*Vicia faba* L) Caused by. *The Open Agriculture Journal*, 12(1).



Teuber L, Brick MA (1988) Morphology and anatomy. In: Alfalfa and Alfalfa Improvement. Hanson, Barnes, and Hill, eds.) Publication Number 29. American Society of Agronomy, Madison, WI

Undersander, D., Cosgrove, D. (2011). Alfalfa management guide. American Society of Agronomy Crop Science Society of America Soil Science Society of America.

Verma, M., Mishra, J., Arora, N. K. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria: diversity and applications. In Environmental biotechnology: for sustainable future (pp. 129-173). Springer, Singapore.

Verma, M., Mishra, J., Arora, N. K. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria: diversity and applications. In Environmental biotechnology: for sustainable future (pp. 129-173). Springer, Singapore.

Vincelli, P., Smith, R. (2014). Managing Diseases of Alfalfa(Plant Pathology Fact Sheet) University of Kentucky College of Agriculture, Food and Environment

Vincent, J.M. (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Volpiano, C. G., Lisboa, B. B., Granada, C. E., José, J. F. B. S., Oliveira, A. M. R. D., Beneduzi, A., et al. (2019). Rhizobia for biological control of plant diseases. In Microbiome in plant health and disease (pp. 315-336). Springer, Singapore.

Wang, S., Jiao, X., Guo, W., Lu, J., Bai, Y., Wang, L. (2018). Adaptability of shallow sub-surface drip irrigation of alfalfa in an arid desert area of Northern Xinjiang. PLOS ONE, 13(4), 1–2.

Wise, K., Waldron, K., Woodsen, M. (2010). Diseases of Alfalfa (Leaf Spots) Management Guide.

Wise, K., Waldron, K., Woodsen, M. (2014). Diseases of Alfalfa (Wilts and Rots) Management Guide.

Wolde-meskel, E., van Heerwaarden, J., Abdulkadir, B., Kassa, S., Aliyi, I., Degefu, T., et al. (2018). Additive yield response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to rhizobium inoculation and phosphorus fertilizer across smallholder farms in Ethiopia. Agric. Ecosyst. Environ. 261, 144–152.

Zhang W, Liu J, Huo P, Huang Z. (2017). *Curvularia malina* causes a foliar disease on hybrid Bermuda grass in China. *European Journal of Plant Pathology* 151(2), 557-562.

Zhao, Y., Liu, X., Tong, C., Wu, Y. (2020). Effect of root interaction on nodulation and nitrogen fixation ability of alfalfa in the simulated alfalfa/triticale intercropping in pots. *Scientific reports*,10(1), 1-11.

<https://eol.org/pages/1030072/media>.

[https://www.pflanzenkrankheiten.ch/krankheiten-an-kulturpflanzen/krankheiten-an\\_futterleguminosen/luzerne/leptoshaerulina-trifolii-m](https://www.pflanzenkrankheiten.ch/krankheiten-an-kulturpflanzen/krankheiten-an_futterleguminosen/luzerne/leptoshaerulina-trifolii-m)

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/verticillium-albo-atrum>

# Annexe

**Annexe**



**Annexe 01:** Croissance des plantes des témoin azoté (T+N).



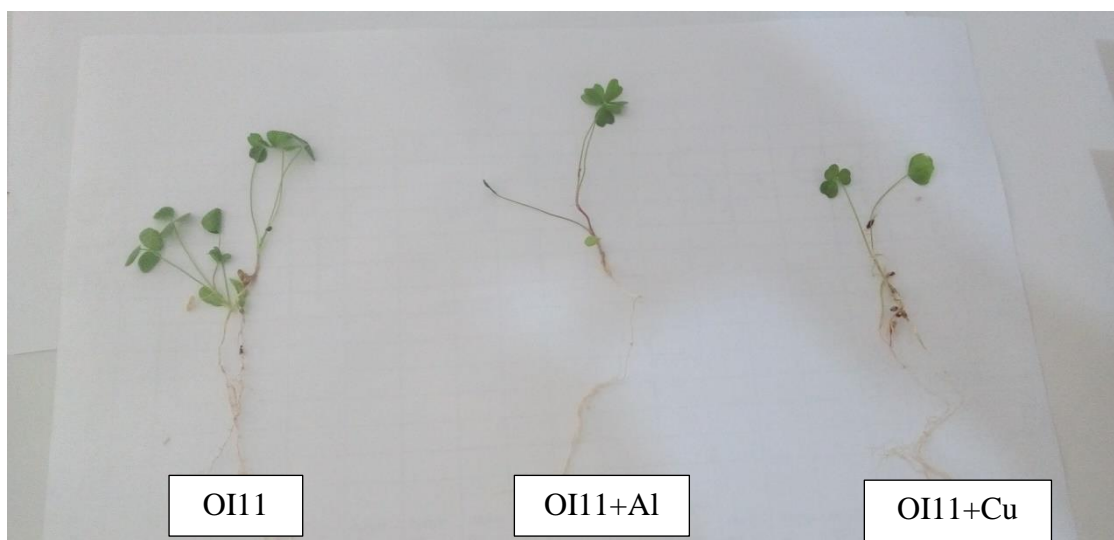
**Annexe 02:** Croissance des plante de témoin(T-).



**Annexe 03:** Croissance des le cas de la double inoculation O152-Champignons.



**Annexe 04:** Croissance des le cas de la double inoculation E141-Champignons.



**Annexe05:** Croissance dès le cas de la double inoculation OI1-Champignons.



**Annexe 06:** Croissance des plantes en présence *Curvilaria* sp.



**Annexe 07:** Croissance des plantes en présence *Alternaria* sp.



**Annexe 08:** la présence du nodule des plants inoculé par la souche O152.



**Annexe 09:** La présence du nodule des plants inoculé par la souche E141.



**Annexe10:** la présence du nodule des plants inoculé par la souche OI11.



**Annexe11:** Echelle d'interprétation de pH dans l'extrait aqueux 1/2,5 (Aubert, 1978).

<b>Extrait 1 /2,5</b>	
<b>Valeur de pH</b>	<b>Classe d'interprétation</b>
<4.5	Extrêmement acide
4.5 – 5.0	Très fortement acide
5.1 – 5.5	Fortement acide
5.6 – 6.0	Moyennement acide
6.1 – 6.5	Légèrement acide
6.6 – 7.0	Très légèrement acide
7.1 – 7.5	Très légèrement alcalin
7.6 – 8.0	Légèrement alcalin
8.1 – 8.5	Moyennement alcalin
>8.6	Très fortement alcalin

**Annexe12:** Echelle d'interprétation de la salinité pour l'extrait 1/5 (USSL Staff, 1954; Aubert, 1978).

<b>CE (ds/m) à 25°C</b>	<b>Degré de salinité</b>
< 0.6	Sol non salé
$0.6 < CE \leq 2$	Sol peu salé
$2 < CE \leq 2.4$	Sol salé
$2.4 < CE \leq 6$	Sol très salé
> 6	Sol extrêmement salé

### Biocontrôle de l'altérariose et de la curvulariose de la luzerne (*Medicago sativa* L.) par inoculation avec trois souches sinorhizobiennes.

#### Résumé:

L'étude de l'efficacité de l'inoculation avec trois souches rhizobiennes (OI11, O152 et E141) de la luzerne, *in vivo*, sous stress biotique (inoculation avec deux champignons phytopathogènes (*Curvularia* sp. et *Alternaria* sp.)) dans les conditions contrôlées, a été réalisée. Les résultats obtenus à travers l'analyse de la variance (ANOVA) nous a permis de montrer qu'il y a un effet positif de l'inoculation sur l'évolution des différents paramètres étudiés (croissance et biomasse des plantes et l'attaque fongique). Les résultats ont démontré que la souche O152 est la plus efficace vis-à-vis des champignons (*curvularia* sp. et *Alternaria* sp.) avec un taux d'agressivité réduit à 31.27% et 40.12%, respectivement, par rapport aux autres souches et aux témoins positifs et négatif.

**Mots clés:** Biocontrôle, rhizobia, *Curvularia* sp, *Alternaria* sp, *Medicago sativa* L., maladies fongiques.

### Biocontrol of alfalfa (*Medicago sativa* L.) Altérariose and curvulariose by inoculation with three sinorhizobial strains.

#### Abstract:

The study of the effectiveness of inoculation with three rhizobial strains (OI11, O152 and E141) of alfalfa, *in vivo*, under biotic stress (inoculation with two phytopathogenic fungi (*Curvularia* sp. and *Alternaria* sp.)) in controlled conditions, was carried out. The results obtained through the analysis of variance (ANOVA) allowed us to show that there was a positive effect of the inoculation on the evolution of the different parameters studied (growth and biomass of the plants and the fungal attack). The results showed that the O152 strain was the most effective against the fungi (*Curvularia* sp. and *Alternaria* sp.) with a reduced aggressiveness rate of 31.27% and 40.12%, respectively, compared to the other strains and the positive and negative controls .

**Keywords:** Biocontrol, rhizobia, *Curvularia* sp, *Alternaria* sp, *Medicago sativa* L., fungal diseases.

### المكافحة الحيوية البرسيم (*Medicago sativa* L.) لداء الحجازي وداء الكرنفيلاريا عن طريق التلقيح بثلاث سلالات

ريزوبيا.

#### الملخص:

تم التحقيق في فعالية التطعيم بثلاث سلالات من الريزوبيا (OI11، O152، E141) من البرسيم، في الجسم الحي، تحت الإجهاد الحيوي (التطعيم مع اثنين من الفطريات الممرضة النباتية (*Curvularia* sp. و *Alternaria* sp.)) في ظل ظروف خاضعة للرقابة. سمحت لنا النتائج التي تم الحصول عليها من خلال تحليل التباين (ANOVA) بإظهار أن هناك تأثيرًا إيجابيًا للتلقيح على تطور المعايير المختلفة المدروسة (نمو النبات والكتلة الحيوية والهجوم الفطري). أظهرت النتائج أن سلالة O152 هي الأكثر فعالية ضد الفطريات (*curvularia* sp. و *Alternaria* sp.) مع انخفاض معدل العدوان إلى 31.27% و 40.12% على التوالي، مقارنة بالسلالات الأخرى والشواهد الإيجابية والسلبية.

**الكلمات المفتاحية:** المكافحة الحيوية، الريزوبيا، الفطريات (*Curvularia* sp، *Alternaria* sp)، (*Medicago sativa* L.، الأمراض الفطرية).