

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DE OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques



THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT ès SCIENCES

Spécialité : Ecologie Saharienne et Environnement

Par

AZIB Salim

**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**

Soutenue publiquement le : 08/03/2020

Devant le jury composé de :

Mme. BISSATI Samia	Professeur	Univ. de Ouargla	Président
M. CHELOUFI Hamid	Professeur	Univ. Ouargla	Directeur de thèse
OULD EL HADJ KHELIL Aminata	Professeur	Univ. de Ouargla	Examinatrice
Mme BOUDIAF Malika	MCA	Univ. de Tizi Ouzou	Examinatrice
M. BOURAS Noureddine	Professeur	Univ. de Ghardaïa	Examineur
M. LAZALI Mohamed	MCA	Univ. de Khemis Meliana	Examineur

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

La réalisation de cette thèse fut une occasion merveilleuse de rencontrer et d'échanger avec de nombreuses personnes. Je ne saurais pas les citer toutes malheureusement, sans dépasser le nombre de pages raisonnablement admis, mais je reconnais que chacune à des degrés divers a apporté une contribution positive à sa finalisation. Mes dettes de reconnaissance sont, à ce point de vue, énormes à leur égard.

Je pense particulièrement au professeur **CHELOUFI Hamid**, mon directeur de thèse, pour la finesse de ses attitudes sur le plan aussi bien humain que scientifique. Il a toujours trouvé le juste équilibre entre la liberté qu'il m'a laissé dans le choix des grandes orientations et la détermination des pistes à suivre, d'une part, et un soutien total et sans faille dans les moments délicats, d'autre part. Je lui en suis infiniment gré.

Je voudrais remercier le professeur **Juan IMPERIAL RODENAS** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de Génomique et Biotechnologie des Bactéries Diazotrophes Associées aux Plantes (Gebiopad), du Centre de Biotechnologie et de la Génomique des Plantes (UPM, Madrid). J'adresse aussi mes remerciements à toute l'équipe du laboratoire Gebiopad pour l'aide et le temps précieux qu'il m'ont accordé.

Mon appréciation et ma gratitude vont aussi à Mme **BISSATI Samia**, Doyenne de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université de Ouargla, pour avoir accepté de présider ce jury. Mes gratitudes vont aussi à Mme **OULD EL HADJ KHELIL Aminata** (Professeur à l'université de Ouargla), à Mme **BOUDIAF Malika** (Maitre de conférences à l'université de Tizi Ouzou), à M. **BOURAS Noureddine** (Professeur à l'université de Ghardaïa) et à M. **LAZALI Mohamed** (Maitre de conférences à

l'université de Khemis Meliana) pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Un grand merci à tous ceux qui ont directement participé à ce travail, plus particulièrement: **HOUICHITI Rachid, EDDOUD Amer, ATTAB Sara, BENSALEM Sofiane, BOUAMMAR Boualem** et **BRADAI Lyes**. Sans oublier les nombreux amis et collègues pour le respect et la bonne ambiance qui ont toujours accompagné nos discussions. Qu'ils puissent trouver ici l'expression de ma gratitude.

Mes remerciements vont également aux personnels des Laboratoires pédagogiques de la Faculté SNV-UKMO, du laboratoire de recherche sur les Bio-Ressources Sahariennes (BRS) et de l'exploitation agricole de la Faculté SNV-UKMO.

Enfin, ce travail n'aurait jamais pu être réalisé sans la convivialité des agriculteurs des différentes régions d'étude. Que ces gens soient assurés de ma profonde gratitude et ma reconnaissance les plus respectueuses.

Salim

**Une pensée particulière au défunt Professeur SAKER
Mohamed Lakhdar qui nous a quitté un certain 09
novembre 2016.**

"Les morts vivent tant qu'il y a des vivants qui pensent à eux"

(Emile Henriot)

La symbiose rhizobium-luzerne : étude de la diversité rhizobiale et essais d'inoculation en vue d'améliorer les rendements en fourrage dans le Sahara septentrional est-algérien

Résumé

Ce travail a été réalisé pour évaluer la diversité génétique et phénotypique au sein d'une collection de quarante-huit souches bactériennes isolées à partir des nodosités racinaires de la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) et de tester leur efficacité symbiotique vis-à-vis de la plante hôte par des tests d'inoculation *ex situ*.

La caractérisation phénotypique a montré une diversité de réponses. Les souches présentaient un large spectre de tolérance au NaCl et aux pH alcalins et neutres. En général, toutes les souches ont présenté une bonne croissance à 28 °C et 37 °C et une mauvaise croissance aux températures extrêmes (4°C et 45°C). Les souches testées aux différents types d'antibiotiques étaient visiblement différentes. La taxonomie numérique a placé les souches provenant de Ouargla et d'El Oued dans une classe et celles de Ghardaïa dans une autre. Les souches de références *Sm1021* et *Sm2011* sont classées dans une classe à part, plutôt proche de celle de Ghardaïa.

L'évaluation de la position taxonomique des souches de la collection a montré leur affiliation au genre *Sinorhizobium*. L'analyse phylogénétique a montré l'existence de deux groupes distincts où les souches du premier groupe, d'origine de la région de Ghardaïa, appartiennent aux espèces *S. meliloti* et *S. kummerowiae*. Les souches composant le groupe II, originaires des régions de Ouargla et d'El Oued, ont été séparées des souches de référence et suggèrent que celles-ci pourraient représenter une lignée différente des espèces déjà définies. La classification résultant de l'analyse du gène *nodC* reflète la spécificité d'hôte, tandis que la phylogénie basée sur les gènes chromosomiques est indépendante de la plante hôte.

Il a été constaté que les stress hydrique et salin réduisaient de manière significative la nodulation, la croissance et le rendement de la luzerne. L'inoculation avec les souches sinorhizobiennes a amélioré la capacité de la plante à résister aux stress. Les réponses des plantes étaient clairement différentes selon les souches inoculantes. Nos résultats ont montré que les souches *Sm2011* et O152 formaient les meilleurs couples symbiotiques en conditions limitantes en eau et la souche O172, halotolérante *in vitro*, l'a confirmé aussi *in vivo* et a fourni aux plantes des avantages majeurs qui leur ont permis de résister au stress important de 80 mM de NaCl.

Nous avons obtenu une masse importante d'informations sur les souches rhizobiennes locales nodulantes *M. sativa* et sur l'utilisation de celles-ci comme inoculants efficaces pour l'amélioration des rendements fourragers dans un contexte saharien marqué par des contraintes pédoclimatiques majeures.

Mots clé: Symbiose, *Medicago sativa* L., rhizobia, biodiversité, inoculation, stress salin, stress hydrique, Sahara, Algérie.

Rhizobium-Alfalfa symbiosis: study of rhizobial diversity and inoculation trials to improve forage yields in the north-eastern Algerian Sahara

Abstract

This work was carried out to evaluate genetic and phenotypic diversity in a collection of forty-eight bacterial strains isolated from the root nodules of cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) and to test their symbiotic efficacy against the host plant by inoculation tests.

Phenotypic characterization showed a diversity of responses. The strains exhibited a broad tolerance spectrum to NaCl and alkaline and neutral pH. In general, all strains showed good growth at 28 °C and 37 °C and poor growth at extreme temperatures (4 °C and 45 °C). Strains tested for different types of antibiotics were visibly different. The numerical taxonomy has placed strains from Ouargla and El Oued in one class and those from Ghardaïa in another. The reference strains *Sm1021* and *Sm2011* are classified in a class by themselves, rather close to that of Ghardaïa.

The evaluation of the taxonomic position of the strains showed their affiliation to the genus *Sinorhizobium*. Phylogenetic analysis has shown the existence of two distinct groups where the first group strains, originating in Ghardaïa, belong to the species *S. meliloti* and *S. kummerowiae*. Group II strains, originating in Ouargla and El Oued, have been separated from the reference strains and suggest that they may represent a different lineage from the already defined species. The resulting classification of the *nodC* gene analysis reflects host specificity, while phylogeny based on chromosomal genes is independent of the host plant.

Water and salt stress were found to significantly reduce nodulation, growth and yield of alfalfa. Inoculation with strains of *Sinorhizobium* improved the plant's ability to resist stress. The responses of the plants were clearly different according to the inoculant strains. Our results showed that strains *Sm2011* and O152 formed the best symbiotic pairs under water-limiting conditions, and the O172 strain, halotolerant *in vitro*, also confirmed it *in vivo* provided the plants with major advantages that allowed them to withstand high stress of 80 mM NaCl.

We obtained a large amount of information on the local rhizobial strains nodulating *M. sativa* and on the use of these as effective inoculants for the improvement of forage yields in a Saharan context marked by major pedoclimatic constraints.

Key words: symbiosis, *Medicago sativa* L., rhizobia, biodiversity, inoculation, salt stress, water stress, Sahara, Algeria.

ارتباط الفصّة وبكتيريا الريزوبيا : دراسة لتنوع الريزوبيا وتجارب لتلقيحها لتحسين مردودية الأعلاف في الصحراء الجزائرية الشمالية الشرقية

ملخص

تم الشروع في هذا العمل لتقييم التنوع الجيني و المظهري في مجموعة من ثمانية وأربعين سلالة بكتيرية معزولة من العقد الجذرية لنبته الفصّة (*Medicago sativa L.*) واختبار فعاليتها التكافلية مع النبتة المضيفة عن طريق انجاز اختبارات التلقيح.

أظهر التوصيف المظهري مجموعة متنوعة من الاستجابات. أظهرت السلالات مقاومة واسعة للملوحة و الحموضة. بشكل عام ، أظهرت جميع السلالات نموًا جيدًا عند 28 درجة مئوية و 37 درجة مئوية وضعف النمو في درجات الحرارة القصوى (4 درجات مئوية و 45 درجة مئوية). كانت نتائج اختبار اجابات السلالات لأنواع مختلفة من المضادات الحيوية مختلفة بشكل واضح. وضع التصنيف الرقمي سلالات ورقلة والوادي في فئة واحدة وتلك من غرداية في أخرى. صنفت السلالات المرجعية Sm1021 و Sm2011 في فئة بمفردها ، قريبة إلى حد ما من سلالات غرداية.

أظهر تقييم الوضع التصنيفي لسلالات المجموعة انتماءهم إلى جنس *Sinorhizobium*. أظهر التحليل الوراثي وجود مجموعتين متميزتين حيث تنتمي سلالات المجموعة الأولى ، من أصل غرداية ، إلى النوعين *S. meliloti* و *S. kummerowiae*. تم تصنيف سلالات المجموعة الثانية ، التي تنتمي إلى ورقلة والوادي ، بعيدا عن السلالات المرجعية وتشير إلى أنها قد تمثل سلالة مختلفة عن الأنواع المعروفة حاليا. يعكس التصنيف الناتج لتحليل الجينة *nodC* خصوصية المضيف ، في حين أن السلالة المستندة إلى جينات الكروموزومات مستقلة عن النبات المضيف.

بينت النتائج ان الملوحة والجفاف يحد بشكل كبير نمو البرسيم. التلقيح بسلالات *Sinorhizobium* حسن من قدرة النبتة على مقاومة هذه العوامل. كانت استجابات النباتات مختلفة بشكل واضح وفقًا لسلالات التلقيح. أظهرت نتائجنا أن السلالتين *Sm2011* و *O152* شكلتا أفضل أزواج تكافلية في ظل ظروف الحد من المياه ، وأن سلالة *O172* زودت النباتات بمزايا كبيرة سمحت لها لتحمل ارتفاع الملوحة إلى 4.5 غل.

لقد حصلنا على مجموعة كبيرة من المعلومات حول سلالات الريزوبيا المحلية التي يمكن استخدامها كسماد طبيعي فعال لتحسين محاصيل الأعلاف في المناطق الصحراوية. **الكلمات المفتاحية:** التعايش ، الفصّة ، الريزوبيا ، التنوع البيولوجي ، التلقيح ، مقاومة الملوحة ، مقاومة الجفاف ، الصحراء، الجزائر.

Liste des abréviations

ADNr 16S: Acide Désoxyribo-Nucléique Ribosomal 16S

ADP: Adénosine diphosphate

AMF: arbuscular mycorrhizal fungi

ANOVA: analysis of variance

APFA : Accession à la Propriété Foncière Agricole par la mise en valeur

ATP: Adénosine triphosphate

atpD : ATP synthase

BNF: Biological Nitrogen Fixation

CE: conductivité électrique

CNRGV: Le Centre National de Ressources Génomiques Végétales

°C: Degré Celsius

DO: densité optique

dNTP: désoxynucléotides triphosphates

dS: décisiemens

FNs: Facteurs Nod

glnII: glutamine synthétase

LPWG: Legume Phylogeny Working Group

LSD: Least significant Difference

MLSA: multilocus sequence analysis

mM: milli-Molaire

N: azote

N₂ : diazote atmosphérique

NH₃: ammoniaque

NaCl: Chlorure de sodium

nodC : N-acétylglucosaminyltransférase

PCR Polymerase Chain Reaction

PGPR: plant growth promoting rhizobacteria

pH: Potentiel hydrogène

recA: recombinase

TBE: Tris-borate-EDTA

Tpm: tour par minute

UPMGA: Unweighted pair group method with arithmetic mean

YMA: Yeast Mannitol Agar

Liste des tableaux

Tableau 1	Classification récente des bactéries du genre <i>Ensifer</i> associées aux légumineuses.....	15
Tableau 2	Identification des régions et stations, positions géographiques et années d'échantillonnage.....	25
Tableau 3	Identification des stations, type de climat, type de sol, salinité des eaux d'irrigation, mode de culture de la luzerne et mode d'échantillonnage.....	25
Tableau 4	Nombres d'isolats infectifs obtenus par zone et par station.....	33
Tableau 5	sélection des souches tolérantes à différentes concentrations en NaCl.....	36
Tableau 6	Similarités des séquences entre 48 souches isolées à partir de nodosités racinaires de luzerne et les souches types apparentées pour les gènes <i>glnII</i> , <i>recA</i> et <i>nodC</i>	51
Tableau 7	Codes des souches, plante hôte d'isolement, localisation géographique et type de climat.....	62
Tableau 8	Résultats des analyses physicochimiques de sable avant et après traitement...	66
Tableau 9	Effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance et de rendement de la luzerne soumise au stress hydrique.....	70
Tableau 10	Codes des souches, plante hôte d'isolement, localisation géographique et type de climat.....	73
Tableau 11	Effet du stress salin sur la hauteur des tiges, longueur des racines, poids sec des tiges et racines et nombre de nodules.....	78
Tableau 12	Réponses de la luzerne cultivée à l'inoculation par six souches rhizobiennes sous différentes conditions de salinité	79

Liste des figures

Figure 1	représentation schématique des fonctions des flavonoïdes biologiquement actifs médiant diverses communications biologiques dans la rhizosphère...	8
Figure 2	Schéma montrant la diversité des facteurs Nods (FNs).....	9
Figure 3	Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose rhizobium/légumineuse.....	10
Figure 4	Les différents stades de la formation des nodosités de type déterminé.....	11
Figure 5	Morphologie des nodules racinaires de quelques espèces de légumineuses.	12
Figure 6	Morphologie générale de la plante de luzerne.....	18
Figure 7	Conservation des nodules dans des tubes.....	27
Figure 8	Tolérance des souches nodulant la luzerne à différentes concentrations en NaCl.....	35
Figure 9	effet de l'augmentation des concentrations en NaCl sur la croissance des souches nodulant la luzerne.....	36
Figure 10	Tolérance des souches (A) et importance de leur multiplication (B) à différents pH.....	37
Figure 11	Tolérance des souches (A) et importance de leur multiplication (B) à différentes températures.....	39
Figure 12	Effet des antibiotiques sur la croissance des souches nodulant la luzerne...	40
Figure 13	Dendrogramme montrant la diversité phénotypique de 48 isolats rhizobiens nodulant la luzerne.....	42
Figure 14	Gel d'électrophorèse montrant l'amplification partielle du gène <i>glnII</i>	49
Figure 15	Gel d'électrophorèse montrant l'amplification partielle du gène <i>recA</i>	50
Figure 16	Gel d'électrophorèse montrant l'amplification partielle du gène <i>nodC</i>	50
Figure 17	Arbre phylogénétique NJ du gène <i>glnII</i> (539 pb) montrant la relation entre les souches nodulant de la luzerne (mentionnées en gras) et les espèces appartenant au genre <i>Sinorhizobium – Ensifer</i>	53
Figure 18	Arbre phylogénétique NJ du gène <i>recA</i> (430 pb) montrant la relation entre les souches isolées de la luzerne (mentionnées en gras) et les souches types appartenant au genre <i>Sinorhizobium – Ensifer</i>	54
Figure 19	Arbre phylogénétique NJ construit à partir des gènes de ménage concaténés <i>recA</i> et <i>glnII</i> (969 pb) montrant les relations phylogénétiques entre les souches nodulant la luzerne et les espèces du groupe <i>Sinorhizobium – Ensifer</i>	56
Figure 20	Arbre phylogénétique NJ du gène partielles <i>nodC</i> (479 pb) montrant les relations phylogénétiques entre les souches nodulant la luzerne et les espèces du groupe <i>Sinorhizobium – Ensifer</i>	57
Figure 21	Effets du stress hydrique sur la hauteur de la plante (A), la longueur de la racine (B), les poids des tiges et des racines (C et D) et le nombre de nodules (E).....	68
Figure 22	Effets des traitements salins sur A) hauteur des tiges B) longueur des racines C) poids sec des tiges D) poids sec des racines et E) nombre de nodules des plantes de luzerne.	76

Liste des photos

Photo 1	Culture de luzerne pérenne dans les régions sahariennes A) en plein champs à Sebseb (Ghardaïa) et B) sous palmier dattier à l'exploitation de l'université de Ouargla.....	19
Photo 2	Germination des graines de luzerne sur boîte gélosée.....	28
Photo 3	Quelques étapes de mise en place en place du test d'authentification : A) graine germée dans un tube Gibson ; B) préparation des inoculums bactériens dans des tubes à essais.....	29
Photo 4	Aspect des colonies sur milieu YEM.....	33
Photo 5	Formation de nodosités sur les racines de jeunes plantes de luzerne après inoculation.....	34
Photo 6	Description de quelques étapes de la mise en place du protocole expérimental et la croissance des plantes	64
Photo 7	Croissance différentielle des plantes de luzerne en fonction de la quantité d'eau d'arrosage.....	65

REMERCIEMENTS

RESUME

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES PHOTOS

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I : Fixation biologique de l'azote et symbiose rhizobium-légumineuse

I.1. La fixation biologique de l'azote.....	6
I.2. La symbiose fixatrice d'azote rhizobium-légumineuse.....	7
I.3. Etablissement de la symbiose rhizobium-légumineuse	7
I.3.1. Dialogue moléculaire entre les partenaires de la symbiose	7
I.3.2. Formation du nodule fixateur d'azote.....	10
I.3.3. Fonctionnement des nodosités	13
I.4. Taxonomie des rhizobia	13
I.4.1. Diversité du genre <i>Sinorhizobium</i>	14
I.5. La famille des <i>Fabaceae</i>	15
I.5.1. Description de la luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.).....	16
I.6. Facteurs environnementaux influençant la symbiose fixatrice d'azote.....	19
I.6.1. La salinité.....	20
I.6.2. Le stress hydrique	21
I.6.3. Les températures	22
I.6.4. Le pH du sol.....	22

CHAPITRE II : Diversité phénotypique des rhizobia nodulant la luzerne (*Medicago sativa* L.) dans les sols du nord-est du Sahara algérien

II.1. Introduction.....	24
II.2. Matériel et méthodes	24
II.2.1. Description des sites d'échantillonnage	24
II.2.2. Collecte des nodules.....	26
II.2.3. Conservation des nodules	26
II.2.4. Isolement et purification des rhizobia.....	27

II.2.5. Authentification des isolats.....	27
II.2.6. Stockage et nomenclature des isolats.....	29
II.2.7. Caractérisation phénotypique des isolats.....	29
II.2.7.1. Tolérance à la température.....	30
II.2.7.2. Tolérance au pH	30
II.2.7.3. Tolérance à la salinité.....	31
II.2.7.4. Résistance intrinsèque aux antibiotiques.....	31
II.3. Résultats et discussion.....	32
II.3.1. Caractéristiques morphologiques et de croissance des isolats.....	32
II.3.2. Authentification des isolats	33
II.3.3. Caractérisation phénotypique des isolats.....	34
II.3.3.1. Tolérance à la salinité.....	34
II.3.3.2. Tolérance au pH.....	37
II.3.3.3. Tolérance à la température.....	39
II.3.3.4. Résistances aux antibiotiques.....	40
II.3.4. Taxonomie numérique des traits phénotypiques.....	41
II.4. Conclusion	44

CHAPITRE III: Diversité génétique et phylogénie des microsymbiotes associés à la luzerne (*Medicago sativa* L.) dans le nord-est du Sahara algérien

III.1. Introduction.....	45
III.2. Matériel et méthodes	45
III.2.1. Méthodes d'extraction de l'ADN	45
III.2.2. Amplification de l'ADN par la technique de PCR.....	46
III.2.3. Amorces d'amplification.....	47
III.2.4. Conditions d'amplification et cycle PCR	47
III.2.5. Quantification et purification des produits de la PCR.....	48
III.2.6. Contrôle de la réaction de PCR par électrophorèse	48
III.2.7. Séquençage direct des produits PCR.....	48
III.2.8. Analyse et alignement des séquences.....	49
III.3. Résultats et discussions	49
III.3.1. Résultats du contrôle de la réaction de PCR par électrophorèse.....	49

III.3.2. Analyse phylogénétique.....	51
III.3.3. Phylogénie des gènes de ménage.....	51
III.3.3.1. Phylogénie du gène <i>glnII</i>	52
III.3.3.2. Phylogénie du gène <i>recA</i>	53
III.3.3.3. Phylogénie des gènes de ménage (<i>recA</i> + <i>glnII</i>)	55
III.3.3.4. Phylogénie du gène symbiotique <i>nodC</i>	56
III.4. Discussion.....	57
III.4.1. Analyse phylogénétique des gènes de ménage.....	58
III.4.2. Analyse phylogénétique des gènes symbiotiques	59
III.5. Conclusion.....	60

CHAPITRE IV : Amélioration de la croissance de la luzerne sous stress hydrique par inoculation avec des souches locales du genre *Sinorhizobium*

IV.1. Introduction.....	61
IV.2. Matériel et méthodes.....	61
IV.2.1. Souches bactériennes et conditions de croissance.....	61
IV.2.2. Matériel végétal.....	62
IV.2.3. Plan expérimental.....	63
IV.2.4. Mesures de la croissance et de la biomasse des plantes	65
IV.2.5. Analyses statistiques.....	66
IV.3. Résultats et discussion.....	66
IV.3.1. Taux de germination des graines.....	66
IV.3.2. Valeurs de pH et de CE du sable.....	66
IV.3.4. Croissance et rendement sous stress hydrique.....	67
IV.3.5. Effet de l'inoculation sur la croissance et le rendement	69
IV.3.6. Effet de l'inoculation sur la nodulation.....	71
IV.4. Conclusion.....	71

CHAPITRE V : Amélioration de la croissance de la luzerne sous stress salin par inoculation avec des souches locales du genre *Sinorhizobium*

V.1. Introduction	72
V.2. Matériel et méthodes	72

V.2.1. Souches bactériennes et conditions de croissance.....	72
V.2.2. Matériel végétal.....	73
V.2.3. Substrat de culture	73
V.2.4. Plan expérimental.....	74
V.2.5. Mesures de la croissance et de la biomasse des plantes	74
V.2.6. Analyses statistiques.....	75
V.3. Résultats et discussion.....	75
V.3.1. Croissance et rendement sous stress salin.....	75
V.3.2. Effet de l'inoculation sur la croissance et le rendement	78
V.3.3. Effet de l'inoculation sur la nodulation	80
V.4. Conclusion	81
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	82
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	86
ANNEXES	

Introduction générale

Dans les zones agricoles où la disponibilité en azote (N) est faible, ce dernier est fourni aux cultures sous forme d'engrais pour obtenir de meilleurs rendements (White et Brown, 2010). La production et l'utilisation d'engrais azotés à l'échelle industrielle ont augmenté la productivité agricole mondiale, mais, dans la plupart des cultures intensives, l'azote appliqué n'est pas utilisé par les plantes dans sa totalité et une partie est perdue par voie gazeuse (dénitrification et volatilisation) et par lixiviation dans le sol (Cheloufi, 1991 ; Francis et *al.*, 1993). En raison de sa solubilité, nécessaire à l'absorption et à l'assimilation faciles par les plantes, l'azote minéral (NH_4^+ et NO_3^-) provenant des engrais azotés peuvent s'écouler dans les eaux de surface ou dans les eaux souterraines (Hirel et *al.*, 2011). L'eau contaminée par les nitrates n'est pas potable et à des concentrations élevées peut être nocive pour la santé humaine (Cheloufi et *al.*, 1990 ; Bryan et Van Grinsven, 2013). L'utilisation d'engrais contribue aussi à la pollution de l'environnement (White et Brown, 2010), non seulement par lessivage dans le sol, mais également par la production de gaz à effet de serre lors de leur synthèse (Galloway et *al.*, 2008) et l'eutrophisation des milieux aquatiques (Vance, 2001). Par conséquent, pour des raisons économiques et environnementales, l'utilisation des engrais azotés doit être pratiquée avec précaution et une gestion durable est nécessaire pour la production agricole future (White et Brown, 2010).

Pendant des siècles, les légumineuses (*Fabaceae*) ont été utilisées dans les rotations des cultures pour intégrer l'azote dans les systèmes agricoles, évitant ainsi le besoin de fertilisation azotée (Geddes et *al.*, 2015). Ce phénomène est dû à l'interaction symbiotique avec les bactéries diazotrophes du sol connues collectivement sous le nom de rhizobiums (rhizobia). Ce processus biologique permet d'assurer tout ou une partie des besoins en azote des *Fabaceae*, selon les espèces et selon les conditions de milieu (Vertes et *al.*, 2015) et apporte au sol des quantités pouvant atteindre plusieurs centaines de kilogrammes d'azote ha/an (Calvet, 2003), ce qui équivaut à environ 40 millions de tonnes d'azote dans les systèmes agricoles de manière naturelle et durable (Kryvoruchko et *al.*, 2017) avec un coût énergétique de la fixation biologique de l'azote inférieur à celui d'une production équivalente d'engrais de synthèse (Hirel et *al.*, 2011).

Au-delà de cet aspect agronomique, certaines espèces de plantes non cultivées et d'arbres de la famille des légumineuses sont aussi d'un grand intérêt écologique dans les écosystèmes naturels en permettant la colonisation de milieux pauvres en azote grâce à cette

capacité symbiotique. On estime que 45 millions de tonnes d'azote sont fixées par les légumineuses dans les écosystèmes naturels (Graham et Vance, 2003).

Afin d'améliorer le rendement des cultures de légumineuses dans des environnements les plus défavorables, comme dans le cas des terres arides avec climat Saharien de l'Algérie qui représentent environ 80% de la surface totale du pays (Le Houerou, 1975), les cultivars tolérants au stress doivent être associés à des rhizobiums tolérants aussi au stress (Laranjo et Oliveira, 2006).

Bien que soumis à des conditions défavorables et contraignantes, les sols sahariens offrent des conditions plus ou moins favorables pour l'installation d'une microflore diversifiée et adaptée aux conditions du milieu, représentée respectivement par des bactéries, des champignons et des algues (Sabaou et *al.*, 1998 ; Bazine et Hamdi Aissa, 2014 ; Karabi et *al.*, 2016). En outre, au Sahara septentrional, les conditions environnementales très rudes et très contraignantes n'ont pas empêchées l'existence de zones géomorphologiques offrant des conditions plus ou moins favorables pour la survie et la prolifération d'une flore spontanées saharienne caractéristique et adaptée (Chehma, 2006). L'espace agricole dans le Sahara algérien a connu aussi une dynamique inhabituelle depuis quelques décennies, notamment à partir des années 80 du siècle passé (promulgation de la loi 18/83 portant APFA), rendue possible par la présence de terre potentiellement cultivable (Otmame et Kouzmine, 2013) et surtout par la mobilisation des ressources en eau en provenance des nappes aquifères profondes (nappes du Continental Intercalaire et du Complexe Terminal) (Idder et *al.*, 2014).

La luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.), objet de cette thèse, est la plus importante culture de légumineuses fourragères dans les zones arides et semi-arides de l'Afrique du Nord (Elboutahiri et *al.*, 2010). En Algérie, la superficie consacrée à la luzerne pérenne représente 0,37 à 0,71% de la superficie totale consacrée aux cultures fourragères. Paradoxalement, dans le Sahara, sa culture est de loin la principale espèce fourragère cultivée (Chaabena et *al.*, 2012). Cette espèce est une légumineuse fourragère vivace qui a une excellente valeur nutritive, une digestibilité élevée et un rendement de biomasse élevé et contribue à l'incorporation de grandes quantités d'azote (jusqu'à 250 kg/ha/an), avec un avantage économique conséquent, aidant à réduire l'application d'engrais synthétiques (Campillo et *al.*, 2003 ; Carlson et Huss-Danell, 2003, Jensen et Hauggaard-Nielsen, 2003). Comme de nombreuses légumineuses, la luzerne est capable de former une symbiose avec les bactéries du sol appelées rhizobiums. Cette symbiose peut satisfaire totalement ou partiellement la

demande en azote de la plante légumineuse hôte. Cependant, la quantité d'azote fixée dans les sols arides dépend de plusieurs facteurs, dont les génotypes de plantes hôtes et de rhizobiums, la sécheresse et la salinité, les températures élevées, le pH et la carence en éléments nutritifs (Zahran, 1999, Cacciari et *al.*, 2013).

Une meilleure connaissance du fonctionnement de l'interaction symbiotique entre la luzerne et son microsymbiote contribue à la résolution des problèmes limitant leur expression efficace. Ainsi, les principaux objectifs fixés dans cette étude sont :

i) **Evaluation de la biodiversité des micro-organismes symbiotiques nodulant la luzerne dans les régions d'étude.** La biodiversité rhizobienne implique des techniques permettant de déterminer les caractéristiques à la fois génotypiques et phénotypiques des souches de la collection en vue de sélectionner les souches les plus performantes pour des applications potentielles. Certaines études, menées dans le nord-est du Sahara algérien, ont examiné la diversité des rhizobiums associés aux légumineuses spontanées telles que *Genista saharae* (Chaich et *al.*, 2016) et *Medicago littoralis* et *Melilotus indicus* (Baba Arbi et *al.*, 2015). Mais, jusqu'à présent, on en sait très peu sur la diversité des souches rhizobiennes nodulant les populations sahariennes et les variétés de luzerne, bien que la symbiose luzerne-*Sinorhizobium* est l'une des associations plantes-microbes les mieux étudiées (Carelli et *al.*, 2000; Bena, 2001 ; Bena et *al.*, 2005, Saidi et *al.*, 2009, Elboutahiri et *al.*, 2010). La littérature scientifique parle de deux espèces étroitement apparentées qui sont capables de noduler la luzerne: *Sinorhizobium meliloti* et *Sinorhizobium medicae* (De Lajudie et *al.*, 1994, Rome et *al.*, 1996). L'espèce *S. meliloti* a été décrite en premier, puis divisée en *S. meliloti* et *S. medicae* selon les caractéristiques phénotypiques et génomiques (Rome et *al.*, 1996).

Sur le plan génétique, le développement de la taxonomie polyphasique (phénotypique, génotypique et phylogénétique) et l'utilisation de l'*ADNr 16S* comme marqueur taxonomique ont conduit à de nombreux changements dans la taxonomie des rhizobiums (Vandamme et *al.*, 1996; Zakhia et de Lajudie, 2006). Un gène hautement conservé comme l'*ADNr 16S* ne convient pas à la discrimination d'espèces étroitement apparentées et l'utilisation de la MLSA (multilocus sequence analysis), de plusieurs gènes codant pour des protéines (*atpD*, *recA* et *glnII*), ont été récemment utilisées (Gupta, 1998, Gao et *al.*, 2001, Martens et *al.* 2007, Silva et *al.*, 2007, Chen et *al.*, 2008 ; de Lajudie et *al.*, 2019) et leurs phylogénies sont compatibles avec les phylogénies correspondantes du gène *ADNr 16S* (Gaunt et *al.*, 2001, Martens et *al.*, 2007, Zhang et *al.* 2012).

Sur le plan phénotypique, Latrech et *al.* (2017) indiquent que la caractérisation physiologique de différentes souches de rhizobia nodulant la luzerne est utile pour déterminer l'ampleur des variations physiologiques entre souches et pour exploiter ces variations afin de sélectionner des souches hautement performantes en matière de fixation d'azote et de tolérance dans différentes conditions.

ii) **Amélioration de la croissance de la luzerne sous stress hydrique et salin par inoculation avec des souches locales de rhizobia.** La sécheresse et la salinité sont les facteurs de stress les plus importants et les plus répandus pour les plantes dans de nombreuses régions du monde, en particulier dans les régions arides et semi-arides (Madhava et *al.*, 2006 ; Bertrand et *al.*, 2015) et peuvent limiter sévèrement les activités des légumineuses et des rhizobia.

Il existe plusieurs raisons pour un déficit en eau dans les plantes; Il s'agit notamment des faibles précipitations, de la salinité, des températures basses et élevées, de la forte intensité lumineuse, etc. (Salehi-Lisar et Bakhshayeshan-Agdam, 2016). Le déficit en eau affecte négativement la croissance et le développement des plantes, et sa fréquence restreint considérablement la productivité agricole. Elle influence les aspects liés au développement des plantes, tels que la diminution du taux de photosynthèse, la réduction de la surface des feuilles et la fermeture des stomates (Boyer, 1982). De même, la croissance et l'activité des micro-organismes fixateurs de N₂ sont extrêmement limitées par la sécheresse (Zahran, 1999). Par conséquent, comprendre et améliorer le mécanisme de tolérance du rhizobium et de la luzerne à l'environnement aride sera utile pour améliorer la productivité en matière sèche.

La salinité des sols réduit la production agricole dans le monde entier. Il est estimé que près de la moitié des terres irriguées du monde sont touchées par la salinité (Manchanda et Garg, 2008). La présence de sel dans la solution du sol affecte les plantes en réduisant leur capacité d'absorption d'eau, entraînant un ralentissement de la croissance ainsi que les effets toxiques des ions de sel s'accumulant à l'intérieur de la plante (Munns et *al.*, 2006). Il a été établi que les rhizobia sont, en général, plus tolérants au stress salin que la plante hôte, mais que la croissance et la survie des souches rhizobiennes varient considérablement en stress salin (Soussi et *al.*, 1998; Swaraj et Bishnoi, 1999). Il a été suggéré qu'une combinaison de cultivars et de rhizobia tolérant au stress salin pourrait conférer des avantages synergiques à la capacité des légumineuses à se développer et à survivre dans des conditions salines (Hashem et *al.*, 1998; Nogales et *al.*, 2002).

Afin d'atteindre ces objectifs, notre thèse sera organisée de la manière suivante :

- Un premier chapitre consacré à une synthèse bibliographique présentant les connaissances générales sur la symbiose entre les *Fabaceae* et les bactéries fixatrices d'azote (rhizobia) ;
- Un deuxième chapitre dédié à la caractérisation physiologique et à la constitution d'une collection de souches rhizobiennes associée à la plante de luzerne, provenant des sols de trois régions du Sahara septentrional est-algérien (Ouargla, El Oued et Ghardaïa), vis-à-vis de différents facteurs abiotiques: salinité, pH, température et résistance aux antibiotiques.
- Un troisième chapitre a pour but d'étudier la diversité génétique de la collection rhizobienne préalablement caractérisée phénotypiquement. Deux gènes ménagers chromosomiques *recA* (une recombinaison) et *glnII* (une glutamine synthétase) et un gène symbiotique *nodC* (N-acétylglucosaminyltransférase) ont été utilisés pour évaluer la diversité génétique et la phylogénie des populations de rhizobia.
- Les chapitres quatre et cinq examinent la croissance et la nodulation des plantes de luzerne, sous stress salin et hydrique, inoculées par quatre souches locales sélectionnées pour leur performances face aux contraintes abiotiques prédominantes dans les sols de la région d'étude et deux souches introduites utilisées comme références.

Chapitre I :

**Fixation biologique de l'azote et
symbiose rhizobium-légumineuse
(Revue bibliographique)**

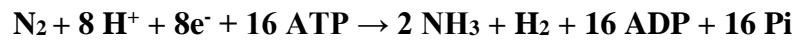
I.1. La fixation biologique de l'azote

L'azote (N), après l'eau, est l'élément nutritif dont les plantes ont le plus besoin (White et Brown, 2010). L'azote représente 1,5 à 2% de la matière sèche des plantes et environ 16% de la fraction totale des protéines végétales (Frink et *al.*, 1999). Sa disponibilité conditionne la croissance et le développement des plantes et donc le rendement des cultures (Gutiérrez, 2012). Malgré son abondance, la majeure partie de l'azote dans la biosphère existe sous la forme de gaz atmosphérique biologiquement inaccessible (Canfield et *al.*, 2010).

La fixation de l'azote est un processus visant à réduire l'azote (N₂) de l'atmosphère en ammoniac (Berman-Frank et *al.*, 2003). Il existe plusieurs procédés permettant de fixer l'azote. Certains d'entre eux sont naturels comme la foudre et la fixation biologique. D'autres sont industriels tel que le procédé chimique de Haber-Bosch pour former du NO₃⁻ ou du NH₃⁺. Selon Cheng (2008), environ 2,5×10¹¹ kg de NH₃/an sont fixés de l'atmosphère par fixation biologique de l'azote (par les légumineuses et les cyanobactéries) et environ 8×10¹⁰ kg de NH₃/an sont fabriqués par industrie de l'ammoniac. La foudre au niveau du globe terrestre peut également contribuer d'environ 1×10¹⁰ kg NH₃/an.

La fixation biologique de l'azote (BNF) a été découverte par Beijerinck en 1901 (Vance 2001; Wagner, 2012). Elle est considérée comme le processus naturel le plus important sur terre après la photosynthèse (Robson et Postgate 1980). Elle est réalisée par des procaryotes (bactéries et *Archaea*) appelés diazotrophes, vivant librement dans le sol tels que *Burkholderia*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* et *Clostridium*, ou en symbiose telles que les bactéries qui forment une symbiose avec des légumineuses (Rhizobia), les bactéries qui forment des symbioses avec des plantes actinorhiziennes (*Frankia*) et certaines sont des bactéries associatives fixatrices d'azote telles que les cyanobactéries associées aux cycas (Postgate, 1982). Les seuls fixateurs d'azote connus en *Archaea* font partie des producteurs de méthane appelés bactéries méthanogène (Dixon et Kahn, 2004).

Cette fixation se fait grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant plusieurs réactions de réduction dont celle du diazote (N₂) en ammonium (NH₄⁺), forme de l'azote assimilable par les végétaux (Werner et *al.*, 2014). La réduction d'une mole de diazote gazeux en ammoniac par la nitrogénase nécessite 16 moles d'ATP, ce qui en fait une réaction énergétiquement coûteuse (Dixon et Wheeler, 1986) :



Selon Zahran (1999), un examen de l'histoire de la fixation biologique de l'azote (BNF) montre qu'un intérêt particulier a été donné aux symbioses entre légumineuses et rhizobia, car ces associations ont le plus grand impact quantitatif sur le cycle de l'azote.

I.2. La symbiose fixatrice d'azote rhizobium-légumineuse

La symbiose entre les plantes de la famille des *Fabaceae* et les bactéries de la famille des Rhizobia est une des plus efficaces en termes de fixation azotée et permet ainsi aux *Fabaceae* de coloniser les sols qui contiennent peu ou pas d'azote (Graham et Vance, 2003 ; Colebatch et *al.*, 2004). Les légumineuses sont responsables à elles seules de près de 30% de la fixation d'azote annuelle qui comprend la fixation industrielle de N₂ par le procédé de Haber-Bosh, la fixation atmosphérique de N₂ par conversion photochimique et la fixation biologique de N₂ par les procaryotes (Galloway et *al.*, 2003; Cheng, 2008; Ertl, 2012).

Le mutualisme entre les *Fabaceae* et les rhizobiums aboutit à la formation d'un organe particulier sur les racines ou les tiges, appelé nodule ou nodosité. Ces nodosités représentent de véritables organes d'échanges métaboliques entre les bactéries et la plante. A l'intérieur de cet organe, les microsymbiotes transforment l'azote atmosphérique en ammonium, une forme biologique qu'elles échangent avec la plante contre des photosynthétats (substrats carbonés) (Wang et *al.*, 2012).

I.3. Etablissement de la symbiose rhizobium-légumineuse

I.3.1. Dialogue moléculaire entre les partenaires de la symbiose

Les interactions légumineuses-rhizobiums se produisent dans la rhizosphère suite à la libération de molécules carbonées (sucres, acides organiques, hormones, vitamines et substances phénoliques) par exsudation, sécrétion, ou autolyse des vieilles cellules de la racine (Seneviratne et Jayasinghearachchi, 2003). Les rhizobia vivent alors sous une forme libre dans le sol mais ne peuvent fixer l'azote que lors d'associations symbiotiques avec une plante hôte. Au cours de l'interaction symbiotique, les rhizobiums induisent la formation de structures végétales spécialisées, appelées nodules (Sprent et *al.*, 2017).

L'organogenèse des nodules comporte plusieurs étapes (Patriarca et *al.*, 2004) qui débutent par un dialogue moléculaire (flavonoïdes, facteurs Nods), nécessaire à la reconnaissance mutuelle entre la plante et ses symbiotes (Oldroyd, 2013).

Dans les conditions de faible teneur en azote, les racines des légumineuses sécrètent des flavonoïdes spécifiques, chimioattractifs, détectables par les bactéries (Gulash et *al.*, 1984; Kape et *al.*, 1991,). Les rhizobia reconnaissent ces flavonoïdes et sont attirés vers la plante. Selon Ferrer et *al.* (2008), plus de 10 000 flavonoïdes ont été identifiés et leur synthèse semble être omniprésente chez les plantes (Figure 1).

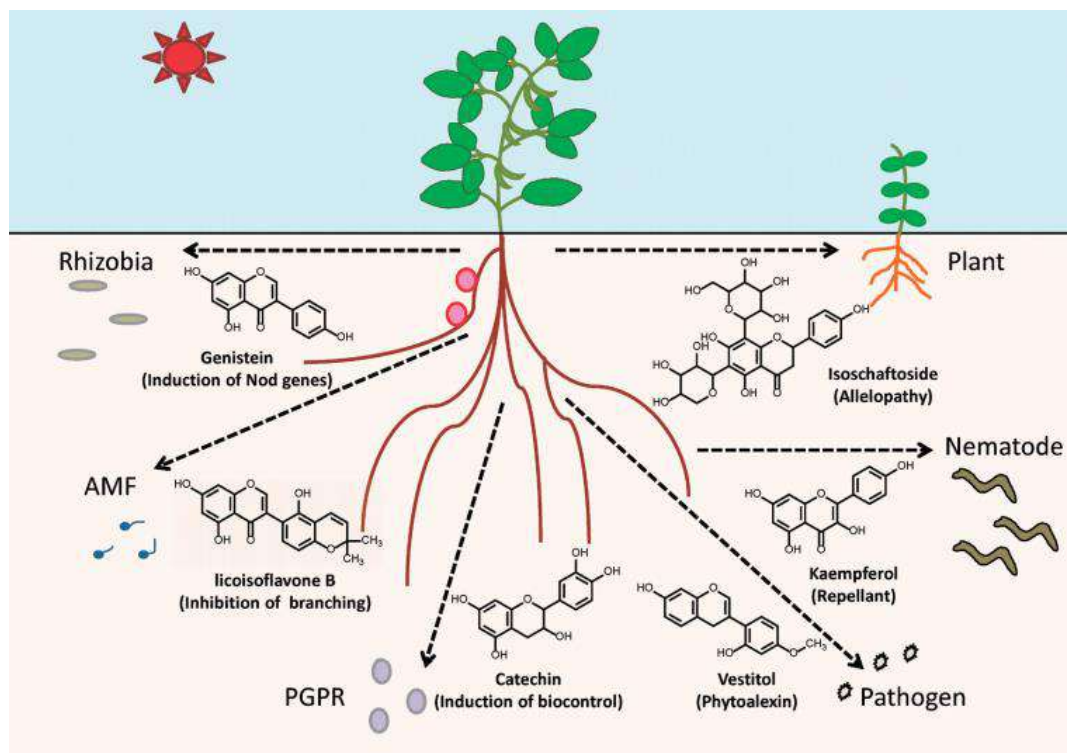


Figure 1 : Représentation schématique des fonctions des flavonoïdes biologiquement actifs médiant diverses communications biologiques dans la rhizosphère. Les cercles roses représentent les nodules (Sugiyama et Yazaki, 2014).

La structure et la quantité de flavonoïdes produites dépendent de l'espèce végétale, ce qui permet aux rhizobia de distinguer leurs hôtes parmi d'autres légumineuses (Hirsch et *al.* 1999). Ils agissent comme des molécules signal exsudés dans la rhizosphère à travers les racines de la plante. Ces signaux peuvent être reconnus par un récepteur bactérien spécifique, NodD (produits du gène *nodD*), qui agit comme un activateur de transcription pour d'autres gènes de nodulation (*NodA*, *NodB* et *NodC*), qui synthétisent ensemble la structure du

squelette de Facteurs Nod (FNs) (Cohen *et al.*, 2001 ; Subramanian *et al.*, 2007; Franche *et al.*, 2009; Sugiyama *et al.*, 2011). L'induction de l'expression des gènes nod par les flavonoïdes a été étudiée dans le cas de l'interaction « luzerne - *S. meliloti* » en tant que modèle (Peck *et al.*, 2006) et montre que seul le flavonoïde spécifique à l'hôte, la lutéoline, régule l'expression des gènes *nod*, tandis que les flavonoïdes non inducteurs tels que la naringénine ne le font pas.

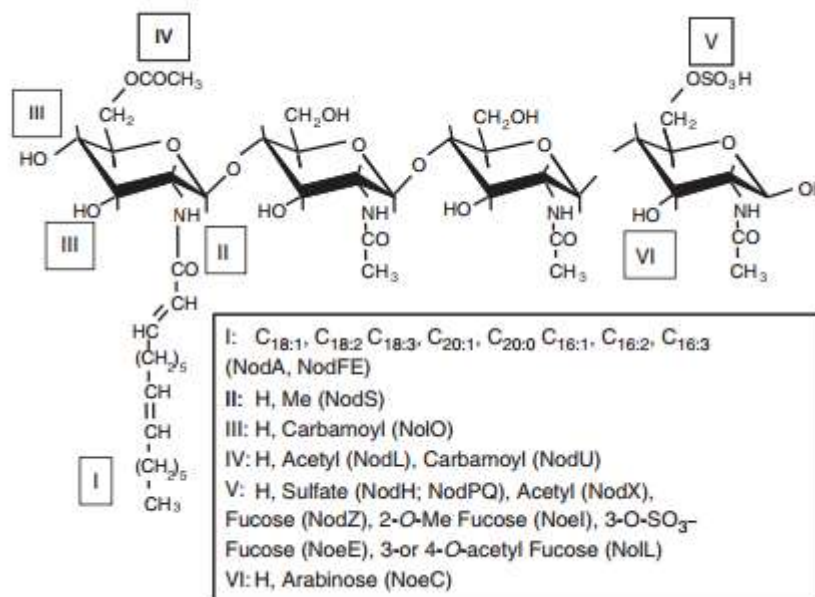


Figure 2: Schéma montrant la diversité des facteurs Nods (FNs) (Downie, 2010).

Les FN sont des molécules de signalisation composées de lipochitooolysaccharides sécrétés par le rhizobium et répondent de façon spécifique selon l'espèce végétale (figure 2) (Guerts et Bisselling, 2002; Geurts *et al.*, 2005 ; Oldroyd *et al.*, 2011). Les FN ont un rôle très important car ils déclenchent l'organogenèse du nodule et sont indispensables dans les processus d'infection et de colonisation de la plante hôte (Long, 1996; Guerts et Bisselling, 2002), notamment la déformation des poils radiculaires, la dépolarisation de la membrane, les oscillations intracellulaires du calcium et l'initiation de la division cellulaire dans le cortex racinaire, ce qui établit un méristème et un primordium nodulaire (Gage, 2004).

Après reconnaissance entre les deux partenaires symbiotiques, il s'ensuit un attachement des bactéries à la surface des poils absorbants. Selon Van Damme *et al.* (2004) et Laus *et al.* (2006), des lectines produites par les plantes à la surface des poils absorbants sont responsables de cet attachement en liant des polysaccharides de surface des rhizobia. Enfin,

les fibrilles des rhizobia et les protéines de type adhésines/ Ca^{2+} dépendantes (ricadhésines) qu'elles produisent seraient aussi impliquées dans cet attachement (Smit *et al.*, 1987). A la suite de l'attachement des bactéries, une déformation des poils absorbants est observée (Figure 3). Chez *M. sativa*, les premières déformations des poils absorbants apparaissent entre 12h et 24h après inoculation avec la bactérie (Wais *et al.*, 2002).

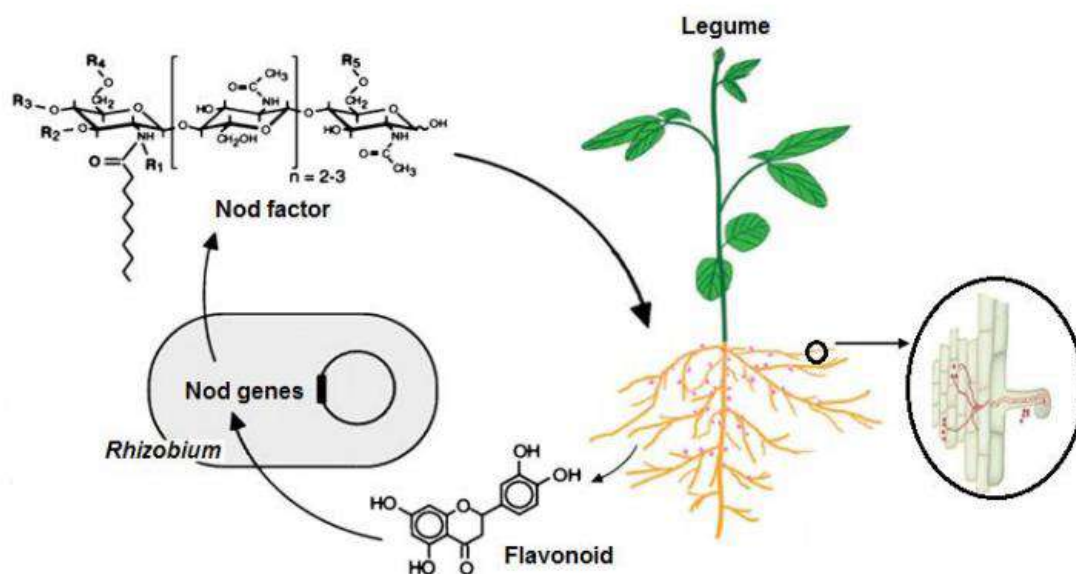


Figure 3: Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose rhizobium/légumineuse (Lindstrom *et al.*, 2010).

I.3.2. Formation du nodule fixateur d'azote

La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte (Foucher et Kondorosi 2000; Limpens et Bisseling 2003). Les rhizobia pénètrent la cellule végétale par la formation d'un cordon d'infection qui traverse d'abord le poil absorbant et se ramifie ensuite dans les cellules corticales guidant ainsi les bactéries vers les couches cellulaires intérieures (Gage, 2004). Selon Schumpp et Deakin (2010), simultanément à l'infection des poils absorbants, certaines cellules du cortex interne se différencient et se divisent à plusieurs reprises, formant un primordium nodulaire (figure 4). Quand les cordons d'infection atteignent le primordium, certaines cellules arrêtent de se diviser et entrent dans des cycles répétés d'endoréplication.

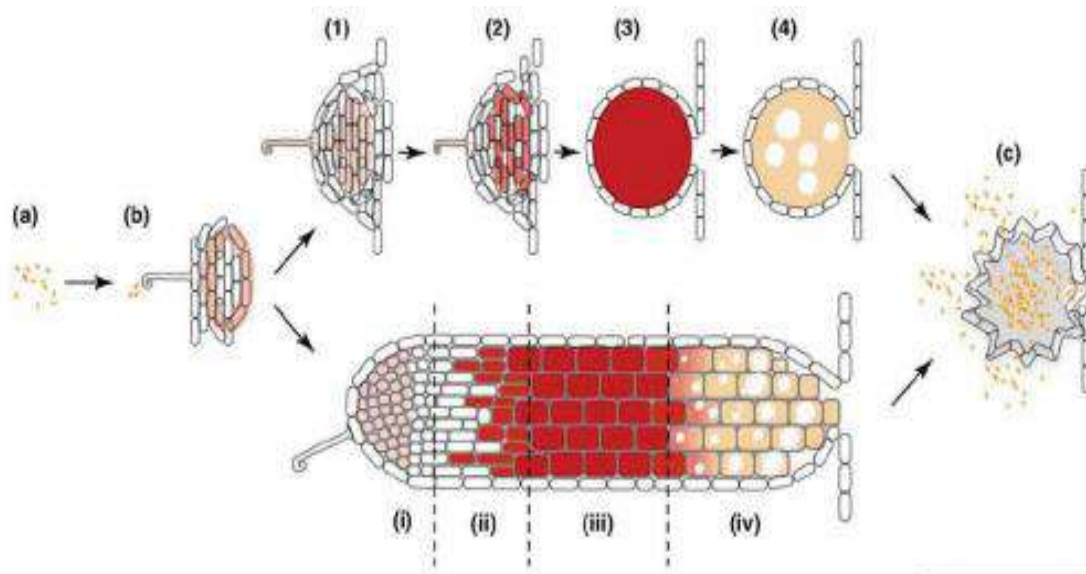


Figure 4: Les différents stades de la formation des nodosités de type déterminé (les stades de 1 à 4) et indéterminé (les stades de i à iv) (Schumpp et Deakin, 2010).

A travers la figure, on peut voir: **(a)** les rhizobia peuvent être présents en tant que saprophytes. **(b)** Rapprochement du rhizobium et déformation du poil racinaire pour permettre aux bactéries de pénétrer dans la plante puis provoquer la différenciation des cellules corticales dans les primordia de méristème. Ensuite, les membranes plasmiques des poils racinaires s'invaginent, formant le cordon d'infection (stade **1** et **i**). Quand le cordon d'infection arrive au centre de la future nodosité, il se ramifie et les rhizobia sont libérés et se développent dans une membrane cellulaire au sein de la cellule végétale (symbiosome) et se dispersent dans le cytosol de cellules végétales (le stade de l'infection, **2** et **ii**). Les rhizobia, ensuite, s'agrandissent et se différencient en bactéroïdes qui fixent l'azote. Formation de grandes cellules polyploïdes hébergeant des milliers de symbiosomes (stade **3** et **iii**). Après une période de fixation active, les nodosités vieillissent (stade **4** et **iv**). **(c)** Une fraction des rhizobia dédifférenciés à l'intérieur de la nodosité est capable de se diviser et revenir à un mode de vie saprophyte lorsqu'ils sont libérés dans la rhizosphère.

Selon le positionnement du méristème, on distingue deux types de nodosité : une forme déterminée et une forme indéterminée (figures 4 et 5). La morphologie et la structure de la nodosité sont contrôlées par la plante hôte, alors que l'efficacité de la BNF est contrôlée essentiellement par le symbiote bactérien (Sprenst, 2007). Dépendant de la légumineuse, les nodosités déterminées, ou bien indéterminées ont pour différence majeure l'origine de la couche cellulaire qui est impliquée dans la prolifération des cellules dans le cortex de la racine et la perte ou le maintien de l'activité mitotique (Foucher and Kondorosi, 2000). Les nodosités indéterminées trouvent leur origine dans le cortex interne et maintiennent un méristème apical persistant qui aboutit à des nodules de forme allongée ou en forme de bâton

sur les racines de certaines légumineuses comme *Medicago sativa* (la luzerne), alors que le développement des nodosités déterminées débute par une division cellulaire dans le cortex externe et la perte rapide de l'activité mitotique donne naissance à des nodosités sphériques sur des légumineuses comme *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (haricot blanc), *Vigna unguiculata* (le niébé) et *Lotus spp.* (Foucher et Kondorosi, 2000).

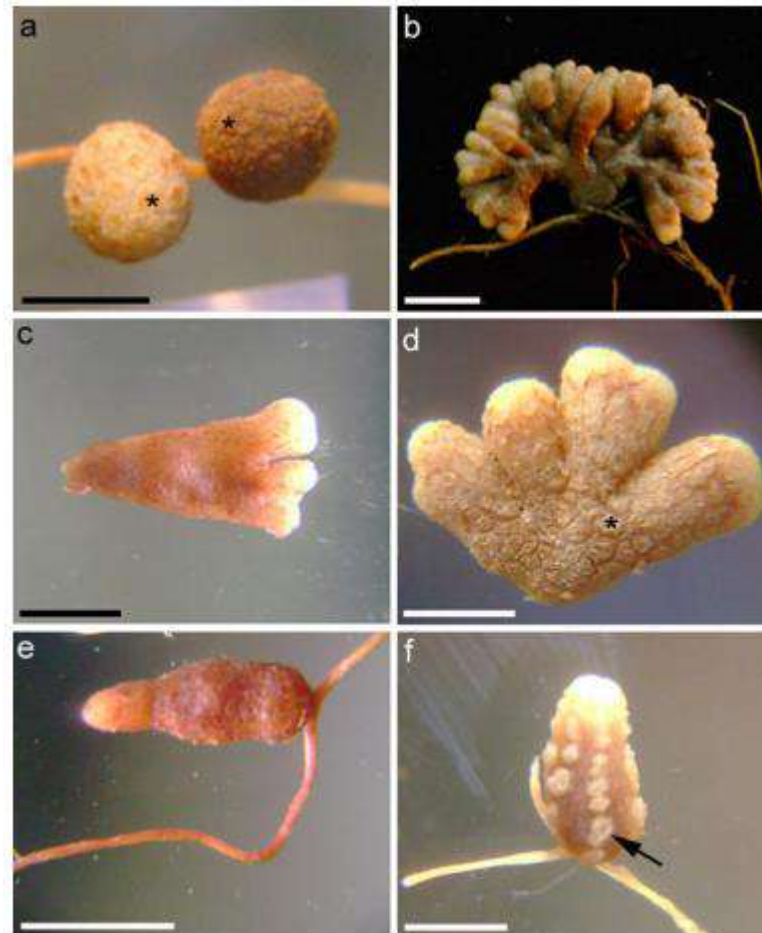


Figure 5: Morphologie des nodules racinaires de quelques espèces de légumineuses (a) *Rhynchosia aurea*; (b) *Chamaecrista pumila*; c) *Crotalaria burhia*; d) *Tephrosia leptostachya*; e) *Acacia jacquemontii*; (e) f) *Indigofera linifolia*. Tous les nodules sont indéterminés sauf ceux de (a). (*) indique le phellogène cortical sur (a) et (d) et la flèche sur (f) indique les lenticelles (Gehlot et *al.*, 2012).

I.3.3. Fonctionnement des nodosités

Chacun des deux symbiontes constitue pour l'autre une source d'un des éléments clés de son métabolisme: l'azote moléculaire réduit par la nitrogénase des bactéroïdes (Dommergues et *al.*, 1999) est assimilé dans les cellules infectées de la plante hôte et exporté aux autres organes de la plante par le flux xylémien en échange de photosynthétats acheminés sous forme de saccharose par le flux phloémien jusqu'aux nodosités (Dixon et Wheeler, 1986). Les nodosités sont des composantes nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase.

L'activité de la nitrogénase se fait selon un cycle précis qui comporte quatre étapes essentielles. En premier lieu, on a la formation du complexe entre la protéine-Fe, deux molécules d'ATP et la protéine-MoFe, suivie du transfert d'électrons entre les deux protéines avec hydrolyse de l'ATP. Ensuite, une dissociation de la protéine-Fe du complexe aura lieu avec une réduction du centre (4Fe-4S) et une transformation de l'ATP en ADP. Ce cycle se répète plusieurs fois jusqu'à l'accumulation d'un nombre suffisant d'électrons apte à réduire le substrat, ce processus de réduction nécessite un environnement anaérobie vu la sensibilité de la nitrogénase à l'oxygène (Pope et *al.*, 1986).

I.4. Taxonomie des rhizobia

Le terme général «rhizobia» couvre toutes les bactéries qui induisent la formation de nodules sur les racines, ou parfois sur les tiges, d'une légumineuse hôte, où ils fixent l'azote atmosphérique N₂ (de Lajudie et Young, 2017). Les rhizobia sont des bactéries Gram négatives, en forme de bâtonnets réguliers de 0.5 à 0.9 µm de largeur et de 1.2 à 3 µm de longueur (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994). Pour les rhizobia à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2 à 6 flagelles péritriches et ceux à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

Des recherches approfondies ont été menées sur la diversité des rhizobia au cours des 25 dernières années, de sorte que de nombreuses nouvelles espèces et genres ont été officiellement décrites (de Lajudie et *al.*, 2019). Au début des années 80 du siècle passé, toutes les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote étaient classées dans le genre *Rhizobium*, avec six espèces nommées: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* et *R. japonicum* (Somasegaran et Hoben, 1985). Actuellement, on compte environ 238 espèces réparties dans 18 genres (Shamseldin et *al.*, 2016).

La plupart des rhizobia connus appartiennent aux genres des α -*Proteobacteria* dans les familles suivantes: *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*), *Allorhizobium*, *Pararhizobium*, *Neorhizobium*, *Shinella*), *Phyllobacteriaceae* (*Mesorhizobium*, *Aminobacter*, *Phyllobacterium*), *Brucellaceae* (*Ochrobactrum*), *Methylobacteriaceae* (*Methylobacterium*, *Microvirga*), *Bradyrhizobiaceae* (*Bradyrhizobium*), *Xanthobacteraceae* (*Azorhizobium*) et *Hyphomicrobiaceae* (*Devosia*), et certains appartiennent aux genres des β -*Proteobacteria* de la famille des *Burkholderiaceae* (*Paraburkholderia*, *Cupriavidus*, *Trinickia*) (Andrews et Andrews, 2017 ; Estrada-de los Santos et al., 2018).

I.4.1. Diversité du genre *Sinorhizobium*

Le genre *Sinorhizobium* a été proposé pour la première fois par Chen et al. (1988) avec l'espèce type à croissance rapide *Sinorhizobium fredii*, isolée à partir du sol et des nodules de soja récoltés en Chine. La comparaison, entre les séquences du gène *ARNr 16S* et les phylogénies basées sur plusieurs gènes de ménage ont montrés que les genres *Sinorhizobium* et *Ensifer* formaient un seul clade phylogénétique (Martens et al., 2008; Young, 2010). Les débats controversés sur la priorité et la combinaison de *Sinorhizobium* et d'*Ensifer* ont persisté et *Sinorhizobium* est encore largement utilisé dans les revues non officielles de taxonomie bactérienne (Blanquet et al., 2015; Kim et al., 2015; Li et al., 2016), en particulier, dans les études ayant trait aux relations symbiotiques entre rhizobia et légumineuses.

Pour clore le débat, la Commission judiciaire du Comité International de la Systématique des Procaryotes a finalement décidé qu'*Ensifer* aurait la priorité sur *Sinorhizobium* et qu'il devrait au moins être utilisé dans des journaux officiels, tels que le Journal International de Microbiologie Systématique et Evolutive (Young, 2010). Dès lors, les noms des nouvelles espèces et de nouvelles combinaisons ont été validement publiés dans le genre *Ensifer* (Yan et al., 2016).

Selon la bibliographie actuelle, le genre *Ensifer* compte environ 22 espèces, tel que montré par le tableau 1.

Tableau 1 : Classification récente des bactéries du genre *Ensifer* associées aux légumineuses

Espèce	La plante hôte	Référence
<i>Ensifer adhaerens</i>	From soil	Casida (1982)
<i>Ensifer fredii</i>	<i>Glycine soja</i>	Scholla et Elkan (1984)
<i>Ensifer saheli</i>	<i>Sesbania cannabina</i>	de Lajudie et al. (1994)
<i>Ensifer teranga</i>	<i>Acacia laeta</i>	de Lajudie et al. (1994)
<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>	de Lajudie et al. (1994)
<i>Ensifer medicae</i>	<i>Medicago spp</i>	Rome et al. (1996)
<i>Ensifer kostiensis</i>	<i>Acacia senegal</i>	Nick et al. (1999)
<i>Ensifer arboris</i>	<i>Prosopis chilensis</i>	Nick et al. (1999)
<i>Ensifer kummerowiae</i>	<i>Kimmerowia stipulacea</i>	Wei et al. (2002)
<i>Ensifer morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	Wang et al. (2002)
<i>Ensifer xinjiangensis</i>	Glycine	Young (2003)
<i>Ensifer americanum</i>	Native acacia	Toledo et al. (2003)
<i>Ensifer abri</i>	<i>Abrus precatorius</i>	Ogasawara et al. (2003)
<i>Ensifer indiaense</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Ogasawara et al. (2003)
<i>Ensifer mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Lloret et al. (2007)
<i>Ensifer garamanticus</i>	<i>Lotus arabicus</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer numidicus</i>	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer americanum comb.</i>	Native acacia	Wang et al. (2013)
<i>Ensifer morelense comb.</i>	<i>Sesbania cannabina</i>	Wang et al. (2013)
<i>Ensifer sesbaniae</i>	<i>Psoralea corylifolia</i>	Wang et al. (2013)
<i>Ensifer psoraleae</i>		Wang et al. (2013)
<i>Ensifer sojae</i>	<i>Glycine max</i>	Li et al. (2011)

(Source : Shamseldin et al. (2016), modifiée).

I.5. La famille des *Fabaceae*

Avec près de 770 genres et plus de 19 500 espèces, les légumineuses sont, après les orchidées et les astéracées, la troisième plus grande famille d'angiospermes en terme de richesse spécifique (Lewis et al., 2005; LPWG, 2013). Selon LPWG (2017), de nombreuses analyses phylogénétiques récentes aux niveaux des sous-familles, des tribus et des genres, ainsi que les phylogénies de la famille dans son ensemble, indiquent toutes que la

classification actuellement acceptée de la famille dans les trois sous-familles bien connues, reconnues depuis longtemps et largement acceptées, *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* et *Papilionoideae*, est obsolète et ne reflète pas nos connaissances actuelles sur les relations phylogénétiques au sein de la famille. C'est en accord avec le groupe de travail sur la phylogénie des légumineuses LPWG (The Legume Phylogeny Working Group), reconnu en tant qu'autorité compétente pour définir/affiner les connaissances phylogéniques et la classification concernant les *Fabaceae*, que des preuves phylogénétiques ont été apportées et compilées pour redéfinir les sous-familles des légumineuses. Actuellement, la famille est divisée en six sous-familles qui sont : *Duparquetioideae*, *Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Dialioideae*, *Caesalpinioideae* et *Papilionoideae* (LPWG, 2017).

D'un point de vue biogéographique, les légumineuses ont une distribution cosmopolite et jouent des rôles importants dans quasiment tous les biomes terrestres, même les plus extrêmes (Schrire et al., 2005). En outre, elles ont de nombreuses propriétés économiques et écologiques allant de la production de ressources riches en protéines, en lipides, en éléments minéraux et en vitamines jusqu'à l'amélioration de la qualité des sols (teneurs en azote, en matière organique, structure du sol) permettant ainsi d'optimiser durablement la productivité de l'agrosystème mais également sa rentabilité financière (Köpke et Nemecek, 2010; Chianu et al., 2011; Mahieu et al., 2011). Une des caractéristiques les plus visibles pour reconnaître une légumineuse (à quelques exceptions près), est de posséder un seul carpelle supérieur à une loge, une placentation marginale, avec deux à plusieurs ovules disposés en deux lignes alternatives sur un placenta unique (Lewis et al., 2005).

La sous-famille monophylétique des *Papilionoideae* renferme plus des deux tiers des espèces (503 genres et 14000 espèces) (LPWG, 2017) et inclut presque toutes les légumineuses économiquement importantes (Sprent, 1995): le soja (*Glycine max*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le pois (*Pisum sativum*), la luzerne (*Medicago sativa*), l'arachide (*Arachis hypogaea*), le pois chiche (*Cicer arietinum*) et la fève (*Vicia faba*).

I.5.1. Description de la luzerne (*Medicago sativa* L.)

La luzerne cultivée est originaire d'Asie mineure, de Transcaucasie, du Turkménistan et d'Iran. L'espèce pousse dans tout le bassin méditerranéen, en Afrique du Nord, au Moyen-Orient, dans la plus grande partie de l'Europe, en Sibérie et dans le nord de l'Inde et en Chine (Quiros et Bauchan, 1988 ; Michaud et al., 1988).

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est l'une des légumineuses fourragères les plus populaires dans le monde en raison de son rendement élevé et de sa valeur nutritionnelle (Martin 2014; Biazzi et al. 2017). C'est une plante vivace qui peut régénérer rapidement de nombreuses nouvelles tiges après la récolte et peut être récoltée plusieurs fois au cours de la saison de croissance (Lamm et al., 2012; Brink et al., 2015). En tant que légumineuse, elle peut améliorer la structure du sol grâce à son système racinaire profond et améliorer l'apport en azote des cultures subséquentes grâce à sa capacité de fixation biologique de l'azote (Huyghe et al. 2014). La luzerne est une légumineuse fourragère de haute qualité, en particulier pour le bétail laitier, et elle peut augmenter le rendement en matière sèche lorsqu'elle est en culture mixte (Bélanger et al. 2014).

La morphologie générale de la plante a été décrite par Teuber et Brick (1988) ainsi que Barnes et Sheaffer (1995). À maturité, la plante possède une longue racine pivotante. En sol profond, humide et bien drainé, cette racine peut atteindre six mètres de longueur, ou même davantage, et produire au niveau du collet des racines latérales parfois nombreuses. Le collet, structure complexe située 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. Des rameaux secondaires et tertiaires peuvent se former à l'aisselle des feuilles. Dans les conditions normales de production fourragère, chaque pied compte 5 à 15 tiges et peut atteindre près d'un mètre de hauteur. Les fleurs sont de couleur variable mais sont le plus souvent violettes, panachées, jaunes, crème ou blanches. Après la pollinisation, elles donnent généralement une gousse spiralée.



Figure 6 : Morphologie générale de la plante de luzerne

La luzerne est largement cultivée, particulièrement dans les régions limitées en eau, en raison de sa capacité d'absorber l'eau des couches profondes du sol via son système de racines profondes (Zhu et *al.*, 2016; Sim et *al.*, 2017) et favorise la prévention de l'érosion des sols dans les zones arides et semi-arides (Quan et *al.*, 2015), ce qui lui confère un niveau relativement élevé de tolérance à la sécheresse par rapport aux autres cultures (Kang et *al.*, 2011; Tang et *al.*, 2014).

En Afrique, la luzerne est cultivée dans quelques pays situés dans les régions du nord et du sud. Le Maroc cultive près de 106 000 ha (soit 22,8% du total des terres fourragères du pays), avec un rendement moyen de 5,93 t de matière sèche par hectare. En Algérie, la luzerne occupe environ 10 000 ha, avec une production moyenne de 3 à 4 t de MS/ha. En Tunisie, la luzerne est le principal fourrage et s'étend sur environ 13 000 ha (77% dans les oasis) (Basigalup et *al.* 2014). Au Sahara algérien (voir photo 1), caractérisé par un climat désertique, la luzerne est de loin la principale espèce fourragère cultivée (Chaabena et *al.*, 2012).

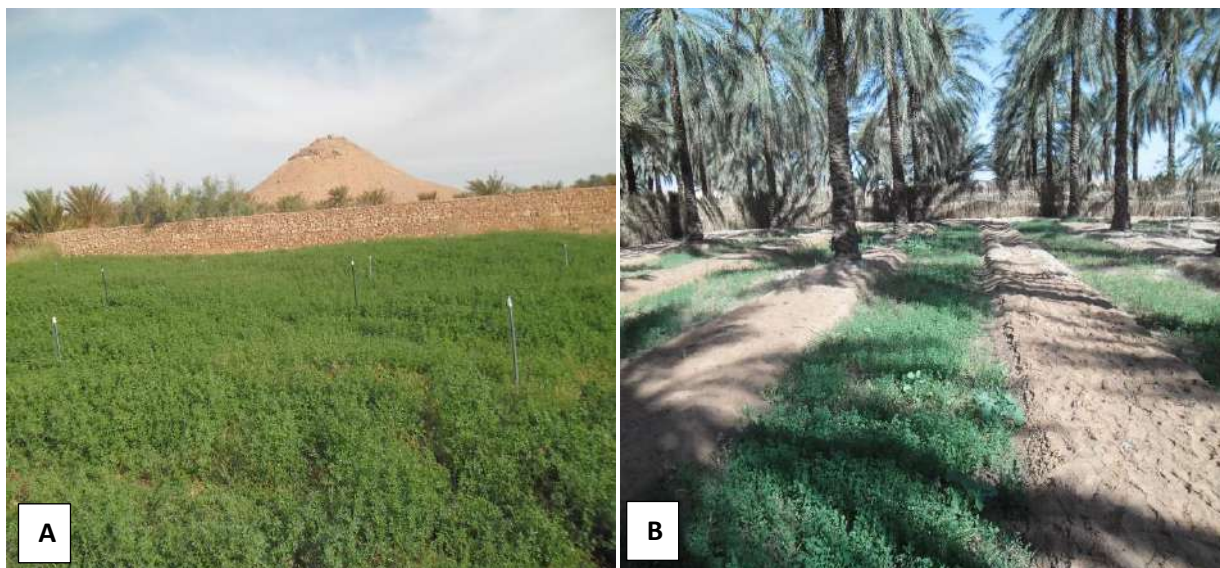


Photo 1: Culture de luzerne pérenne dans les régions sahariennes A) en plein champs à Sebseb (Ghardaïa) et B) sous palmier dattier à l'exploitation de l'université de Ouargla.

La symbiose luzerne-*Ensifer sp.* est l'une des associations plantes-microbes les mieux étudiées (Carelli et al., 2000; Galibert et al., 2001; Bena, 2001; Bena et al., 2005; Saidi et al., 2009; Elboutahiri et al., 2010). Deux espèces étroitement apparentées sont capables de noduler *Medicago sativa*: *Ensifer meliloti* et *E. medicae* (De Lajudie et al., 1994, Rome et al., 1996). L'espèce *S. meliloti* a d'abord été décrite, puis divisée en *E. meliloti* et *E. medicae* en fonction de caractéristiques phénotypiques et génomiques (Rome et al. 1996).

I.6. Facteurs environnementaux influençant la symbiose fixatrice d'azote

L'état physiologique de l'hôte va conditionner le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote (Zahran, 1999 ; Emamverdian et al., 2015). Le potentiel fixateur d'azote d'une souche compétente de rhizobia, capable d'établir une symbiose avec une légumineuse, ne pourra pas être optimal si sa plante hôte est soumise à des perturbations liées aux paramètres environnementaux (Zahran, 1999). Ces perturbations peuvent se présenter sous la forme d'un stress salin, un pH du sol défavorable, un excès ou un manque d'humidité, un dysfonctionnement de la photosynthèse, une infection par des phytopathogènes ou encore une exposition à des toxicités métalliques (Brockwell et al., 1995).

Afin d'améliorer le rendement des cultures de légumineuses dans des environnements plus défavorables, les cultivars tolérants au stress doivent être associés à des rhizobiums

tolérants aussi au stress (Laranjo et Oliveira, 2006). Les études sur la biodiversité des rhizobia constituent une approche importante pour la recherche d'isolats indigènes tolérants au stress (Zahran, 2001; Sprent et Gehlot, 2010).

I.6.1. La salinité

La salinité menace l'agriculture de nombreuses régions arides ou semi-arides (Ashraf et al., 2008). Le stress salin entraîne la diminution du potentiel osmotique de la solution du sol et des effets spécifiques d'ions (principalement Na et Cl) (Munns et Tester, 2008). Ce stress osmotique provoque un déséquilibre nutritionnel de la plante et une toxicité cellulaire, affectant le développement des plantes (Munns et Tester, 2008). La tolérance au sel varie selon les espèces de légumineuses. L'espèce *Pisum sativum* est décrite comme sensible à la salinité, alors que les espèces de *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa* et *Glycine max* sont décrites comme tolérantes au stress salin (Abdel-Wahab et Zahran, 1981 ; Fagg et Stewart, 1994).

Lors de la symbiose, les légumineuses et la formation de nodules sont plus sensibles au sel ou au stress osmotique que les rhizobiums (El-Shinnawi et al., 1998 ; Velagaleti et al., 1990 ; Zahran, 1991). Le stress salin inhibe les premières étapes de la symbiose. La réduction de l'activité fixatrice de N₂ par le stress dû au sel est généralement attribuée à une réduction de la respiration des nodules (Ikeda et al., 1992 ; Delgado et al., 1994) et à une réduction de la production de protéines cytosoliques, en particulier de la leghémoglobine, par les nodules (Delgado et al., 1994). La réduction de l'activité photosynthétique pourrait également affecter la fixation de N₂ par les légumineuses soumises au stress salin (Georgiev et al., 1993).

La croissance d'un certain nombre de rhizobiums a été inhibée par 100 mM de NaCl, alors que certains rhizobiums, par exemple *Rhizobium meliloti*, étaient tolérants à 300 à 700 mM de NaCl. Les souches à croissance rapide étant plus tolérantes que celles à croissance lente (Zahran, 1999).

Les Rhizobia développent des stratégies spécifiques pour faire face au stress salin, notamment l'accumulation de cations inorganiques (par exemple, le potassium) et la production intracellulaire de solutés organiques de faible poids moléculaire, tels que la proline, le tréhalose, la glycine bêtaïne, les ectoïnes et les polyamines (Dong et al., 2017) . Ces composés protègent les cellules de la dessiccation et du stress osmotique en stabilisant la

conformation des protéines et des membranes biologiques (Wdowiak-Wróbel et *al.*, 2013 ; Lunn et *al.*, 2014) . Par exemple, la proline est un composé neutre hautement soluble qui est considérée comme un osmoprotecteur impliqué dans la réponse bactérienne au stress osmotique (Santos et da Costa, 2002). Les composés structurellement liés aux bêtaïnes, tels que la glycine bêtaïne, la proline bêtaïne et la carnitine, jouent un rôle majeur dans l'osmorégulation des bactéries rhizobiennes soumises au stress salin, telles que chez *Rhizobium sp.*, *Mesorhizobium sp.* et *S. meliloti* (Wdowiak-Wróbel et *al.*, 2013). De plus, le tréhalose est un osmoprotecteur important pour augmenter l'osmotolérance chez *S. meliloti* (Bernard et *al.*, 1986 ; Dominguez-Ferreras et *al.*, 2009).

I.6.2. Le stress hydrique

La faible nodulation des légumineuses dans les sols arides est probablement due à la diminution des niveaux de population de rhizobiums pendant la saison sèche. Toutefois, l'influence de l'activité de l'eau et du sol sur la croissance et la vigueur des plantes, et donc la nodulation, ne doit pas être ignorée (Sadowsky, 1995).

Selon Dommergues et *al.* (1998), la sécheresse exerce un effet très marqué sur le fonctionnement des nodules et la quantité de l'azote fixé, car le nodule est plus sensible à cette contrainte que celui du métabolisme général de la racine et de la tige. En effet, le déficit hydrique modifie la structure et le fonctionnement des nodosités qui résulte de la modification des barrières à la diffusion d'oxygène, toutes fois, l'excès d'eau entraîne une baisse de diffusion d'oxygène vers les nodosités (Guy, 1987).

Les rhizobiums ont mis au point divers mécanismes d'adaptation au stress osmotique, principalement par accumulation intracellulaire de solutés inorganiques et organiques. Par exemple, *R. meliloti* (actuellement appelé *Sinorhizobium meliloti*) surmonte l'inhibition de la croissance induite par le stress osmotique en accumulant des solutés compatibles, tels que le K⁺, le glutamate, la proline, la glycine bêtaïne, la proline bêtaïne, le tréhalose et le dipeptide N-acétyl glutaminyl glutamine amide (Boscari, 2002). Certains solutés compatibles peuvent être utilisés en tant que sources d'azote ou de carbone pour la croissance, ce qui suggère que leur catabolisme peut être régulé pour prévenir la dégradation lors d'un stress osmotique (Smith and Smith, 1989).

I.6.3. Les températures

Les températures élevées des sols dans les zones tropicales et subtropicales constituent un problème majeur pour la fixation biologique de l'azote des cultures de légumineuses (Michiels et *al.*, 1994). Les effets du stress thermique sur la nodulation et la fixation de l'azote ont été étudiés depuis longtemps (Bowen & Kennedy, 1959). Même avant le début de la formation de nodules, la température au niveau de la rhizosphère influence non seulement la survie rhizobienne dans le sol, mais également l'échange de signaux moléculaires entre les deux partenaires symbiotiques (Sadowsky, 2005).

Une température élevée a un effet inhibiteur sur l'adhérence des bactéries aux poils absorbants, à la formation des poils absorbants et à la formation du cordon d'infection. Par exemple, chez les légumineuses à graines tropicales, aucun nodule n'a été formé sur l'arachide (*Arachis hypogaea*) à 40 °C ou sur le soja à 37 °C (Hungria et Vargas, 2000). Le fonctionnement des nodules peut également être affecté par les températures élevées entraînant une diminution du taux de certaines réactions essentielles, telles que la synthèse de la nitrogénase (Brooks et *al.*, 1984).

L'évaluation de la tolérance des rhizobiums au stress thermique dans un milieu de culture a été utilisée comme moyen rapide de sélectionner les souches les plus tolérantes, en vue d'une évaluation plus poussée des performances symbiotiques dans des conditions de stress. La plage de température optimale pour la croissance des souches rhizobiennes varie de 28 à 31 °C (Mabrouk et *al.*, 2018). Plusieurs études ont montré que la tolérance des rhizobies à haute température évaluée *in vitro* était bien corrélée avec les résultats obtenus lors d'essais symbiotiques (Kishinevsky et *al.*, 1992; Hashem et *al.*, 1998; Kulkarni et Nautiyal, 1999). L'existence de cette corrélation est probablement due au fait qu'une performance symbiotique plus élevée à hautes températures dépend plus de la capacité du rhizobium à survivre sous cette température que de la capacité à fixer l'azote dans ces conditions. L'activité de la nitrogénase est fortement affectée par une augmentation de la température, quelle que soit la sensibilité de la souche à la chaleur (Michiels et *al.*, 1994).

I.6.4. Le pH du sol

Les sols acides limitent la production agricole dans le monde (Edwards et *al.*, 1991). L'acidité du sol diminue la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses, ce qui a un

effet négatif sur la croissance et le rendement, en particulier chez les plantes qui dépendent exclusivement de la symbiose pour acquérir l'azote (Mohammadi et *al.*, 2012; Bekere et *al.*, 2013). L'ampleur du problème pouvant s'aggraver du fait des pluies acides et de la fertilisation azotée à long terme. Les légumineuses sont particulièrement touchées et l'acidité limite à la fois la survie et la persistance des bactéries nodulantes dans le sol et le processus de nodulation lui-même (Correa et Barneix, 1997). L'absence de nodules a été constatée chez les légumineuses cultivées dans des sols acides, en particulier dans les sols de pH inférieur à 5. La sensibilité de certaines souches rhizobiennes à ces conditions est une cause d'inhibition de la formation de nodules (Bayoumi et *al.*, 1995 ; Carter et *al.*, 1994 ; Graham et *al.*, 1982). Les nodules sont absents même lorsqu'une population viable de rhizobium est constatée (Graham, 1992 ; Graham et *al.*, 1994).

Certains chercheurs ont observé que la nodulation de *P. sativum* était 10 fois plus sensible à l'acidité que la multiplication rhizobienne ou la croissance des plantes (Evans et *al.*, 1980). Des rapports récents ont indiqué que la sélection de partenaires symbiotiques, chez les légumineuses annuelles tel que *Medicago murex* tolérant l'acidité du sol, peut rendre possible leur culture sur des sols d'un pH aussi acide que 4,3 (Mabrouk et *al.*, 2018). Le contrôle génétique de la tolérance à l'acide chez *Sinorhizobium* est de mieux en mieux compris (Dilworth et *al.*, 2001). L'établissement de symbioses nécessite l'interaction de molécules signal de reconnaissance spécifiques produites par des partenaires bactériens et végétaux (Denarié et *al.*, 1996). Il a été démontré que le pH affecte la reconnaissance de ces molécules signal des partenaires végétaux et bactériens dans le cas des légumineuses et du trèfle (Richardson et *al.*, 1988 ; Howieson et *al.*, 1992).

Chapitre II :

**Caractérisation phénotypique et
constitution d'une collection de
rhizobia nodulant la luzerne
(*Medicago sativa* L.)**

II.1. Introduction

Les rhizobia attirent une grande attention depuis plus de quatre décennies en raison de leur énorme valeur agricole et économique pour une agriculture durable. Leur application en tant que biofertilisant assure le succès de la productivité des cultures et réduit le besoin en engrais industriels coûteux et générateurs de problèmes environnementaux (Pongsilp, 2012).

La connaissance et la conservation des souches rhizobiennes à haute performance symbiotique, isolées à partir de nodosités prélevées sur des légumineuses indigènes, est la méthode la plus efficace pour constituer une collection.

L'objectif du présent chapitre est donc d'évaluer la tolérance des souches rhizobiennes nodulant la luzerne, dans les sols de trois régions du Sahara septentrional est-algérien, à différents facteurs abiotiques (salinité, pH et température) et biotique (résistance aux antibiotiques).

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Description des sites d'échantillonnage

Des campagnes de prospection et de collecte de plantes nodulées de luzerne (*Medicago sativa L.*) ont été menées pendant la période du printemps des années 2013 et 2014 dans les agrosystèmes de trois régions du Sahara septentrional est-algérien. Il s'agit de Ghardaïa, Ouargla et El Oued. Au total, 14 stations ont été retenues pour la collecte des échantillons comme indiqué dans le tableau 2.

Tableau 2 : Identification des régions et stations, positions géographique et années d'échantillonnage.

Identification des régions	Identification des stations	Nom des stations	Positions géographique		Années d'échantillonnage
Ouargla	O1	Hassi Ben Abdallah (ITDAS)	Lat. 32°00'76''N	Long. 5°46'27''E	Février 2014
	O2	Oum Eraneb	Lat. 32°05'70''N	Long. 5°46'37''E	Février 2014
	O3	Exploitation agricole de l'UKMO	Lat. 31°94'11''N	Long. 5°29'54''E	Mars 2014
	O4	Chott (Ain Beida)	Lat. 31°97'76''N	Long. 5°38'96''E	Mars 2014
El Oued	E1	Tenedla	Lat. 33°68'14''N	Long. 6°03'60''E	Mars 2014
	E2	El-Meghaier	Lat. 33°56'25''N	Long. 5°92'71''E	Mars 2014
	E3	Djamaa	Lat. 33°52'30''N	Long. 6°02'32''E	Mars 2014
	E4	Guemar	Lat. 33°51'07''N	Long. 6°78'26''E	Mars 2014
	E5	Reguiba	Lat. 33°56'25''N	Long. 6°71'74''E	Mars 2014
Ghardaïa	G1	Daïa Ben Dahoua	Lat. 32°53'53''N	Long. 4°40'35''E	Avril 2013
	G2	Mansoura	Lat. 31°98'25''N	Long. 3°57'52''E	Avril 2013
	G3	Oued Laroui	Lat. 32°57'01''N	Long. 3°62'86''E	Avril 2013
	G4	Sebseb	Lat. 32°17'01''N	Long. 3°57'52''E	Avril 2013
	G5	El Guerrara	Lat. 32°67'89''N	Long. 4°73'77''E	Avril 2013

Les nodules ont été collectés directement (*in situ*) des racines de luzerne dans 9 stations appartenant aux régions de Ouargla et de Ghardaïa. À El Oued, des échantillons de sol ont été prélevés dans 5 stations ayant comme précédent cultural la luzerne. Le piégeage des bactéries symbiotiques, potentiellement présentes dans les échantillons de sols prélevés, a été réalisé en conditions contrôlées sous serre (*ex situ*) en utilisant la luzerne comme plante piège (tableau 3).

Tableau 3 : Identification des stations, type de climat, type de sol, salinité des eaux d'irrigation, mode de culture de la luzerne et mode d'échantillonnage.

Identification du site	Le bioclimat	Texture du sol	Salinité des eaux d'irrigation (g/l)	Mode de culture de luzerne	Mode d'échantillonnage
O1	Hyperaride	Sableuse	2 à 4	Sous palmier dattier	Collecte des nodules <i>in situ</i>
O2	Hyperaride	//	2 à 4	//	//
O3	Hyperaride	//	2 à 4	//	//
O4	Hyperaride	//	2 à 4	Plein champ	//
E1	Hyperaride	//	2 à 6	Sous palmier dattier	Piégeage à partir du sol
E2	Hyperaride	//	2,5 à 6	//	//
E3	Hyperaride	//	2 à 6	//	//
E4	Hyperaride	//	2 à 4	//	//
E5	Hyperaride	//	2 à 4	//	//
G1	Hyperaride	//	1 à 4	Plein champ	Collecte des nodules <i>in situ</i>
G2	Hyperaride	//	1 à 1,5	//	//
G3	Hyperaride	//	1 à 1,5	//	//
G4	Hyperaride	//	1 à 1,5	Culture mixte avec de l'orge	//
G4	Hyperaride	//	1 à 1,5	//	//

II.2.2. Collecte des nodules

Pour les régions de Ouargla et de Ghardaïa, la collecte est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm en profondeur pour extraire la motte contenant la plante et son appareil racinaire.

Les rhizobia contenus dans les échantillons de sol provenant de la région d'El Oued ont induit la formation de nodules sur les racines des plantes pièges trois mois après la mise en place du protocole de piégeage.

Manuellement, nous avons déterré les racines sans toutefois endommager les nodules. Au laboratoire, les racines avec leurs nodules sont ensuite lavées soigneusement à l'eau de robinet pour enlever les restes de terre. Les nodules ainsi obtenus sont détachés des racines en coupant ces dernières à 0.5 cm des deux côtés du nodule (Vincent, 1970 ; Beck et *al.*, 1993).

II.2.3. Conservation des nodules

Pour un usage immédiat, les nodules frais sont conservés immédiatement au réfrigérateur à 4° C jusqu'à 48 heures. Pour une longue conservation allant de 6 à 12 mois, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur, le chlorure de Calcium (CaCl_2) (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994) (figure 8).

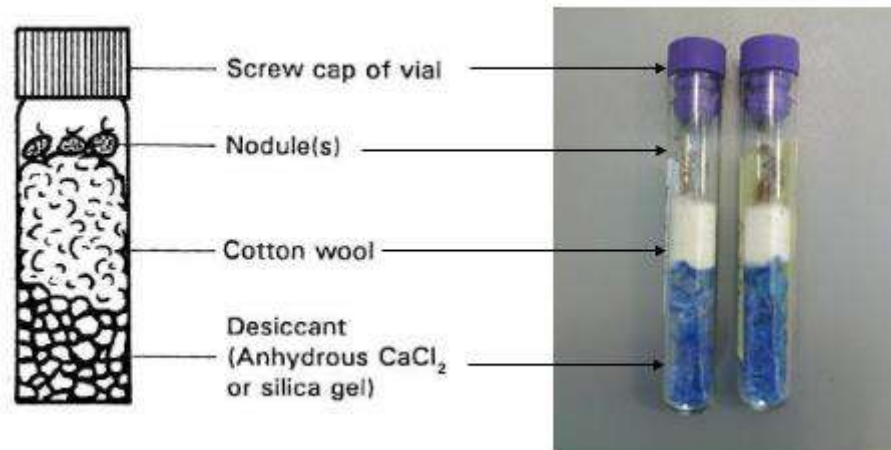


Figure 7: Conservation des nodules dans des tubes

II.2.4. Isolement et purification des rhizobia

Les nodules désinfectés superficiellement sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale sous une hotte à flux laminaire. A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le broyat est étalé sur boîte de Pétri contenant le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) (Vincent, 1970) (voire composition en annexe 1). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans ou par épuisement de manière à avoir des colonies isolées et faciles à caractériser.

Les différentes boîtes ont été incubées trois jours à 28°C pour l'obtention de colonies isolées. Pour chaque échantillon, une seule colonie représentative a été prélevée parmi des colonies morphologiquement similaires et ensuite striée plusieurs fois sur le milieu YMA afin de les purifier.

2.2.5. Authentification des isolats

La capacité d'induire la formation de nodosités sur la racine de la légumineuse hôte est un critère de base dans la caractérisation des rhizobia. L'authentification, autrement appelée test de nodulation, permet d'évaluer le pouvoir infectieux de chacun des 148 isolats obtenus vis-à-vis des plantules de luzerne dans des conditions microbiologiquement contrôlées, comme décrit par Vincent (1970) et Beck et *al.* (1993).

Sous une hotte à flux laminaire, les graines de luzerne sont lavées dans l'éthanol à 95% pendant 5 à 10 secondes, puis transférées rapidement dans le chlorure de mercure acidifié 0,1% (1g HgCl₂ + 5 ml HCl + 1 litre d'eau distillée) pendant 5 à 7 minutes. Les graines sont rincées 5 fois à l'eau distillée stérile et au dernier rinçage on les laisse gonfler dans l'eau distillée stérile pendant 1 heure (Somasegaran et Hoben, 1985). Elles sont ensuite déposées dans des boîtes gélosées à 0,9 % et placées dans une chambre de culture à 22°C à l'obscurité pendant 48 heures. Les boîtes sont renversées afin que la radicule ne s'enfonce pas dans l'agar.

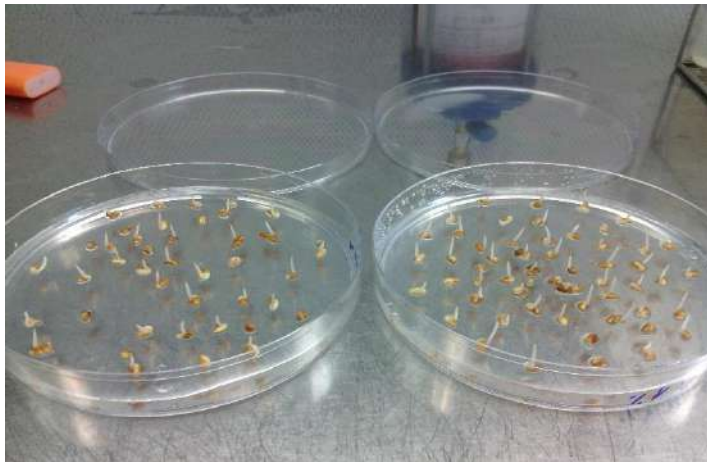


Photo 2: Germination des graines de luzerne sur boîte gélosée

Une fois germés (photo 2), les plantules sont transférées en tubes Gibson (Gibson, 1980) contenant le milieu incliné de Fahraeus sans azote (Fahraeus, 1957) (annexe 2) et inoculées avec 1ml d'une suspension bactérienne, en phase exponentielle de croissance, de chaque isolat mis en culture dans le milieu YMB (liquide) incubé à 28°C pendant 72h sous agitation continue (photo 3).

Les tubes ont été placés dans une chambre de culture, pendant six semaines, avec une photopériode lumière/obscurité de 16 h / 8 h et une température de 22°C.



Photo 3: Quelques étapes de mise en place du test d'authentification : A) graine germée dans un tube Gibson ; B) préparation des inoculum bactériens dans des tubes à essais.

II.2.6. Stockage et nomenclature des isolats

Les isolats obtenues ont été maintenus à 4°C dans des tubes contenant du milieu YMA incliné et ont été également mis en conservation à -80°C dans des eppendorfs contenant 1 ml de la préculture fraîche de chaque isolat mélangé à volume égale avec une solution de glycérol à 80%.

Chaque isolat est désigné par un code unique comprenant une lettre et trois chiffres. La première lettre désigne l'initial de la région d'étude, suivie par un chiffre indiquant la station. Le second chiffre indique le numéro de la plante au niveau de la station et le dernier chiffre est celui du numéro de nodule. Par exemple, le code G121 désigne un isolat provenant de la région de Ghardaïa, station de Daïa Ben Dahoua, deuxième plante et premier nodule.

II.2.7. Caractérisation phénotypique des isolats

La caractérisation phénotypique classique des rhizobia se base sur des critères morphologiques, symbiotiques, biochimiques, et physiologiques (Graham et *al.*, 1991). Elle nous permet d'une part de mettre en évidence l'étendue des variations phénotypiques qui existent entre les souches et d'autre part d'exploiter ces variations pour la sélection de candidats pouvant maintenir une capacité supérieure de fixation d'azote sous les variations des facteurs du milieu.

Dans ce travail, la caractérisation a été menée sur 48 souches locales (voir annexe 4) en comparaison avec deux souches de références qui sont *Sinorhizobium meliloti* 2011 et *Sinorhizobium meliloti* 1021. Ces dernières sont capables de former des nodules fixateurs d'azote chez les plantes hôtes du genre *Medicago*. Elles sont des dérivés de l'isolat type SU47 de *S. meliloti* (Wais et al., 2002). Elles nous ont été transmises par Dr Hélène BERGES, du Centre National de Ressources Génomiques Végétales (CNRGV, INRA-France).

Nous nous sommes limités à l'étude i) des critères physiologiques regroupant la croissance des isolats sur le milieu YM (Yeast Mannitol) (Vincent, 1970) à différentes températures, à la tolérance aux variations du pH et à différentes concentrations en sels et enfin à la résistance aux antibiotiques et ii) des critères symbiotiques indiquant la capacité infective et effective des différents isolats vis-à-vis de la plante hôte sous stress abiotique (N.B. partie (ii) sera traitée à part dans les chapitres 4 et 5).

II.2.7.1. Tolérance à la température

Afin d'estimer la croissance des isolats à différentes températures, les souches sont mises en culture sur le milieu YM liquide et solide et incubées pendant 72 heures à différentes températures : 4, 28, 37 et 45°C (à trois répétition).

Sur milieu liquide, les tubes ont été ensemencés par 100 µl d'une préculture fraîche et incubés dans un incubateur-agitateur à 200 tpm. Sur milieu YM solide, additionné de 1.5% d'agar, l'ensemencement des différents isolats est effectué selon la technique des quatre cadrans ou par épuisement (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994).

La croissance est estimée, sur milieu liquide, par la mesure de la DO (densité optique) à 600 nm (Wei et al., 2004) et sur milieu solide par la présence ou absence de colonies sur les boîtes de Pétri.

II.2.7.2. Tolérance au pH

Les isolats ont été évalués pour leur tolérance au pH, sur milieu YM solide et liquide, selon la procédure décrite pour le test précédent. Les valeurs de pH retenues pour ce test sont : 4, 5, 6, 6.8, 8 et 9.

II.2.7.3. Tolérance à la salinité

L'objectif de ce test est d'étudier la capacité des bactéries à résister aux conditions de salinité élevées et à déterminer les valeurs inhibitrices sur milieu YM. La tolérance à la salinité a été évaluée pour le NaCl. Le sel a été ajouté au milieu avant autoclavage aux concentrations suivantes : 1.7, 40, 80, 160, 320, 640 et 1280 mM.

Sur milieu solide, les boîtes ont étéensemencées comme dans les tests précédents et ont été ensuite mises en incubation à 28°C pendant 72 heures.

Sur milieu liquide, nous avons utilisé le Bioscreen C Microbiology Reader (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, FINLAND (<http://www.bioscreen.fi/>)), un appareil entièrement automatisé et développé pour effectuer une large gamme d'expériences en microbiologie.

Le protocole du Bioscreen est le suivant :

- Préparer les plaques pour Bioscreen : les plaques sont composées de 100 puits, d'une capacité de 300 µl/puit. La première et la dernière ligne, ainsi que la première et la dernière colonne sont remplies d'eau distillée. Dans la deuxième colonne, le milieu sans inoculum est toujours utilisé comme témoin. Le reste des lignes et des colonnes sont utilisées pour les différentes concentrations de sel et souches à étudier ;
- La DO final dans les puits est de 0,04 et le volume final est de 300 µl. Pour cela, nous mesurons la DO de notre inoculum et nous l'ajustons à 0,4. À partir de là, nous ferons une dilution au 1/10 (270 µl de milieu YEM + 30 µl d'inoculum de la souche à étudier à DO = 0.4) ;
- Recouvrir la plaque et la fermer avec un parafilm et la placer dans le bioscreen ;
- Réglage de l'appareil : l'incubation s'est effectuée à 28°C pendant 72 heures, sous agitation continue à une vitesse moyenne. La DO est réglée à 600 nm avec un intervalle de lecture de 2 heures.

II.2.7.4. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été fréquemment utilisée dans l'étude des rhizobia comme un moyen d'identification (Josey, 1979 ; Beck et *al.*, 1993, Spring et *al.*, 2009). Elle permet de caractériser et de comparer les souches entre elles. Le principe de l'antibiogramme

est de mettre en culture des bactéries, et d'appliquer un disque contenant un antibiotique, de concentration connue, afin de voir quels effets jouent sur la bactérie ciblée.

La résistance des isolats à dix antibiotiques (Acide Fusidique 10 µg (FA), Amikacine 30 µg (AK), Amoxicilline 25 µg (AMX), Chloramphénicol 30 µg (C), Colistine 10 µg (CS), Erythromycine 15 µg (E)), Kanamycine 30 µg (K), Pénicilline 6 µg (P), Spiramycine 100 µg (SP) et Vancomycine 30 µg (VA)) a été étudiée par l'application de la méthode décrite par Yattara *et al.* (2000). La boîte de pétri gélosée est inondée avec 300 µl de culture bactérienne. Puis, la suspension est étalée sur toute la surface de la gélose afin d'obtenir la quantité la plus homogène possible de bactéries à la surface et on laisse sécher la suspension pendant 5 minutes. A l'aide d'une pince stérile, on applique les disques d'antibiotiques en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu. Ainsi, 6 disques sont placés sur une boîte de 9 cm de diamètre, en prenant soin de flamber la pince à chaque nouvel antibiotique.

Après application des disques, les souches sont incubées pendant 72h à 28°C.

II.3. Résultats et discussion

II.3.1. Caractéristiques morphologiques et de croissance des isolats

Tous les isolats testés forment, au bout de trois jours (72h d'incubation à 28°C), des colonies visibles sur milieu Yeast Mannitol Agar (YMA). Les colonies formées sont de couleur blanchâtre et translucide, d'un diamètre variable (1 à 3 mm), d'une forme circulaire, convexe d'un contour régulier et d'une surface lisse (photos 4). Cette description est en accord avec celles déjà faites pour les rhizobia dans la littérature (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984). Les isolats provenant des sols de Ghardaïa ont formé des colonies plus muqueuses que celles des autres régions.



Photo 4: Aspect des colonies sur milieu YMA.

II.3.2. Authentification des isolats

Après six semaines d'inoculation, le test d'authentification a abouti à la formation de nodosités sur les racines de 117 jeunes plantules de luzerne (photo 5) (voir détail des souches en annexe 3). Ceci signifie que 117 isolats (sur un total de 148 isolats) ont été infectifs vis-à-vis de la plante hôte (tableau 4).

Tableau 4 : Nombres d'isolats infectifs obtenus par zone et par station.

Identification du site	Nom de station	Nombre des isolats infectifs	
		Par zone	Par région
O1	Hassi Ben Abdallah (ITDAS)	18	
O2	Oum Eraneb	05	
O3	Exploitation agricole de l'UKMO	06	49
O4	Chott (Ain Beida)	20	
E1	Tenedla	08	
E2	El-Meghaier	14	
E3	Djamaa	07	
E4	Guemar	13	48
E5	Reguiba	06	
G1	Daïa Ben Dahoua	06	
G2	Mansoura	03	
G3	Oued Laroui	03	
G4	Sebseb	06	20
G5	El Guerrara	02	
Total des isolats infectifs			117

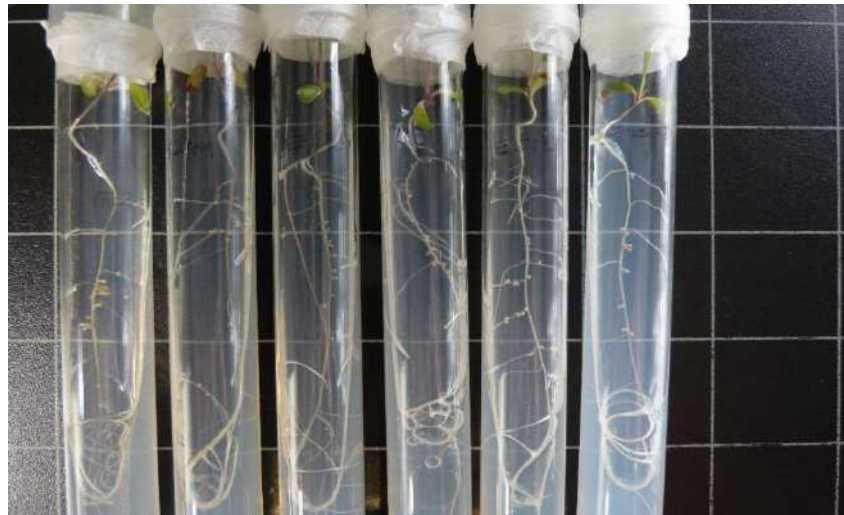


Photo 5: Formation de nodosités sur les racines de jeunes plantes de luzerne après inoculation.

II.3.3. Caractérisation phénotypique des isolats

II.3.3.1. Tolérance à la salinité

La salinité des sols sahariens, du sud de Biskra jusqu'à Touggourt, Ouargla et au-delà, a été beaucoup documentée (Durand, 1958 ; Halitim, 1988 ; Hamdy et *al.*, 1995 ; Idder et *al.*, 2014). La salinité est un facteur de stress important pour les rhizobia, car elle inhibe leur persistance et leur développement (Graham, 1998 ; Farissi, 2014). Par conséquent, une sélection de souches de rhizobium tolérantes à la salinité est d'une grande importance pour la culture de la luzerne dans ces zones touchées par ce phénomène.

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches testées présentaient un large spectre de tolérance à la salinité allant de 1,7 mM (0.1 g/l) à 640 mM (37.4 g/l) (figure 8). Par contre, aucune souche ne s'est avérée capable de croître à 1280 mM. Selon Struffi et *al.* (1998) et Zahran (1999), les rhizobia nodulant la luzerne sont plus tolérants à la salinité par rapport à d'autres espèces de rhizobiums. Nos résultats vont avec ceux de Mohammad et *al.* (1991), Embalomatis et *al.* (1994), Chen (2000) et Jebara et *al.* (2000) qui indiquent que des souches de *S. meliloti* étaient tolérantes à des concentrations de NaCl comprises entre 300–700 mM dans les sols grecs, américains, chinois et tunisiens respectivement. De même, une tolérance allant jusqu'à 800 mM de NaCl a été observée chez les rhizobia isolés de *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha* collectés dans la Sebkhha de Misserghine (Nord-ouest algérien) (Merabet et *al.*, 2006). Elboutahiri et *al.* (2010), ont pu isoler des souches de *S.*

meliloti capables de croître à 1711 mM de NaCl, échantillonnés dans les zones fortement touchées par la salinité au sud du Maroc.

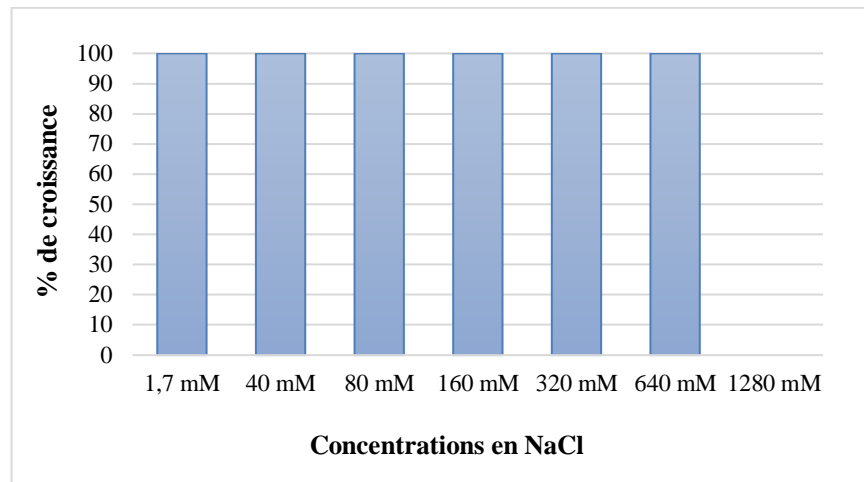


Figure 8 : Tolérance des souches nodulant la luzerne à différentes concentrations en NaCl.

Il est toutefois important de signaler que la tolérance à une concentration donnée en NaCl ne signifie pas forcément une bonne croissance des souches. La figure 9 montre que la tolérance à la salinité diminue progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration en sel.

Les résultats de l'analyse de la variance montrent des différences significatives entre les concentrations 80, 160, 320 et 640 mM où les moyennes de croissances des souches diminuent avec l'augmentation des concentrations salines. Des différences non significatives de croissance des souches sont enregistrées entre les concentrations 1.7 et 40 mM qui appartiennent au même groupe ayant la meilleure croissance.

Sous l'effet des de la salinité élevée, la survie des rhizobia dans le sol et la rhizosphère diminue, le temps de génération cellulaire augmente et l'ultrastructure cellulaire est perturbée (Mohammad *et al.*, 1991 ; Hashem *et al.*, 1998 ; Novikova et Gordienko, 1999 ; Farissi *et al.*, 2014). Quelques espèces de rhizobia s'adaptent aux conditions salines par accumulation intracellulaire de solutés organiques de faible poids moléculaire appelés osmolytes, tels que le glutamate, le tréhalose, la glycine bêtaïne et les polyamines, ou par l'accumulation de K^+ . La glycine bêtaïne est l'un des osmolytes les plus efficaces chez *S. meliloti*, qui peut être accumulé par synthèse, absorption ou les deux (Boscari *et al.* 2002).

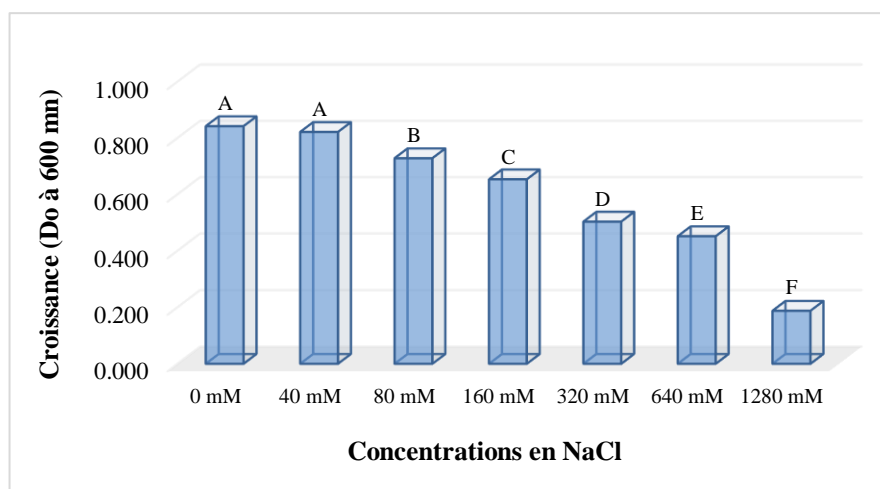


Figure 9: effet de l'augmentation des concentrations en NaCl sur la croissance des souches nodulantes de luzerne.

Les résultats de l'analyse de la variance ont montré aussi des différences significatives entre les valeurs de croissances des différentes souches sur milieu YEM liquide. Le tableau 5, ci-dessous, résume les souches ayant eu les meilleures croissances, traduites par les valeurs de DO les plus élevées.

Tableau 5 : Sélection des souches tolérantes à différentes concentrations en NaCl.

	Concentrations en NaCl						
	1.7 mM	40 mM	80 mM	160 mM	320 mM	640 mM	1280 mM
Souches	G132 A	G132 A	O152 A	E141 A	G241 A	E543 A	-
	O211 AB	G424 AB	O211 A	O223 AB	E521 A	E452 A	-
	O114 ABC	E222 ABC	O172 AB	O172 ABC	E141 A	O461 AB	-
	O452 ABC	G122 ABC	O223 AB	O321 ABCD	E114 AB	O442 ABC	-
	G321 ABCD	O152 ABCD	E222 AB	E114 ABCD	G124 AB	E251 ABCD	-
	O144 ABCDE	O172 ABCDE	E521 AB	O313 ABCD	O313 AB	E213 ABCDE	-
	O313 ABCDE	E131 ABCDE	E131 AB	G422 ABCDE	O211 ABC	O144 ABCDEF	-

Pour chaque paramètre, les moyennes dans la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, comme le détermine le test de la différence la moins significative de Fisher (LSD) à $P = 0,05$.

La provenance des rhizobias a révélé une forte influence dans la tolérance au sel observée entre les souches. Nous constatons qu'aux faibles salinités (1.7 et 40 mM), les souches G132 et G424 qui proviennent de la région de Ghardaïa avaient les meilleures croissances. Aux concentrations 80 et 160 mM, c'est plutôt les souches O152, O211 et E141, pour ne pas citer que celles-là, provenant des régions de Ouargla et El Oued qui sont les plus

résistantes. Aux plus fortes concentrations, les souches issues de la région d'El Oued étaient les plus performantes.

Les limites de tolérance à la salinité entre les rhizobia peuvent varier considérablement d'une espèce à une autre (Rai, 1983 ; Elsheikh et Wood, 1989) et même entre les souches de la même espèce (Kassem *et al.*, 1985).

La tolérance au sel pourrait être en rapport avec le taux de salinité du site d'isolement (El Hilali *et al.*, 2002). Des résultats similaires ont été rapportés par Mohammed *et al.* (2000) pour des souches nodulant l'*Acacia* en Libye et Maâtallah *et al.* (2002) pour des souches de *Mesorhizobium* nodulant le pois chiche au Maroc. Egalement, Mpeperekki *et al.* (1997) ont rapporté que l'existence de souches tolérantes à la salinité dans les sites salins peut être une indication d'une adaptation au stress osmotique qui est dû à l'augmentation de la concentration d'ions et à la variation de l'humidité du sol durant les périodes sèches.

II.3.3.2. Tolérance au pH

Les résultats relatifs aux taux de croissance des souches étudiées à différents pH montrent une diversité de réponses. Ces dernières tolèrent mieux le pH alcalin et neutre qu'acide (Figure 10A). Les souches se montrent affectées par les pH trop acides et enregistrent des taux de croissance de 32.43% et de 81.63% aux pH 4 et 5 respectivement. Aux pH peu acide (6), neutre (6.8) et alcalins (pH 8 et 9), nous avons observé 100% de croissance.

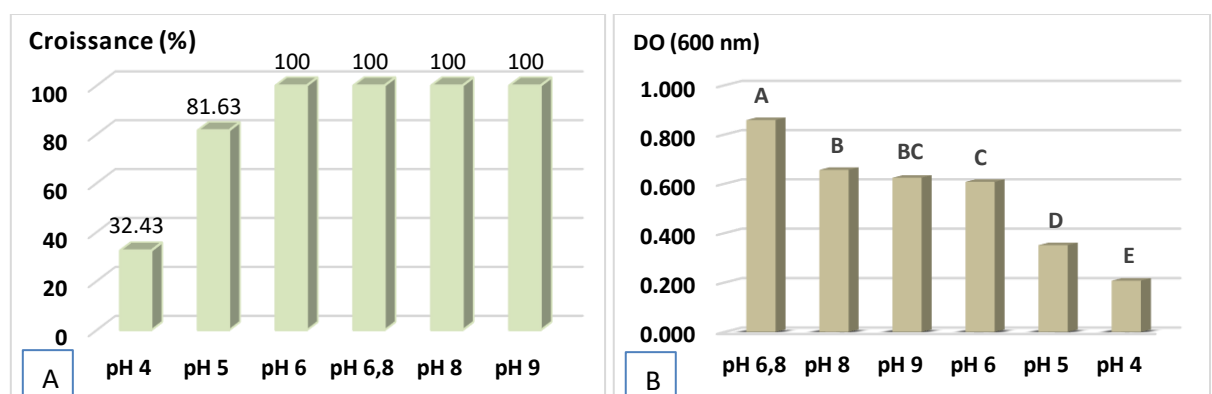


Figure 10 : Tolérance des souches (A) et importance de leur multiplication (B) à différents pH.

Plusieurs études ont confirmé que les souches de *Sinorhizobium* nodulant la luzerne étaient sensibles au pH trop acide de 3,5 (Graham, 1992 et 1994 ; Thami-Alami et al. 2010 ; Elboutahiri et al. 2010) et toléraient l'acidité de pH de 5,5 à 6,0 où la plupart des isolats se développent (Howieson et al., 1988 ; Del Papa et al., 1999). Nos résultats sont aussi en accord avec ceux d'Abo Hasani et al. (2010), Hameed et al. (2014), Thami-Alami et al. (2010) et Elboutahiri et al. (2010) qui indiquent que les souches de *S. meliloti* nodulant la luzerne étaient toutes résistantes à l'alcalinité du pH de 8 et 9.

Comme pour le cas de la tolérance au NaCl, il est important de signaler que la tolérance à un pH donné ne signifie pas forcément une bonne multiplication des souches (figure 10B). Le test anova a montré des différences significatives entre la croissance des souches aux différents pH étudiés.

Au pH 6,8, tous les isolats ont présenté une croissance maximale ce qui est en accord avec Rodrigues et al. (2006) et Shetta et al. (2011) stipulant que le pH optimal de multiplication des rhizobia se situe entre 6,5 et 7,0. Selon Bhargava et al., (2016), le pH neutre permet d'absorber une quantité appropriée de nutriments et entraîne une croissance optimale des rhizobiums.

Nous avons remarqué que l'alcalinité est moins néfaste à la survie des rhizobia que l'acidité. Aux pH alcalins, la croissance est un peu ralentie mais reste généralement importante. Par contre, aux pH 4 et 5, la croissance était significativement ralentie. L'acidité du sol limite la survie et la persistance des rhizobiums (Graham et al., 1982; Brockwell et al., 1991) par modification de la perméabilité de la membrane et l'absorption des nutriments (Bhargava et al., 2016).

Selon Zahran (1999), les rhizobia adoptent des mécanismes différents pour survivre dans les conditions acides. Le pH cytoplasmique de quelques souches tolérantes à l'acidité, comme *S. meliloti* et *R. leguminosarum*, est moins affecté par l'acidité externe (O'Hara, 1989 ; Chen et al., 1993a ; Chen et al., 1993b). Des différences dans la composition des LPS, l'exclusion et expulsion des protons H⁺ (Chen et al., 1993a ; Chen et al., 1993b), l'accumulation de polyamines cellulaires (Fujihara et al., 1993) et des taux élevés de potassium et de glutamate cytoplasmiques au niveau des cellules stressées (Aarons et Graham, 1991) ont été associés à la croissance des rhizobia à pH acide.

Douze souches, provenant des régions de Ouargla et de Ghardaïa, se sont montrées résistantes au pH 4 (O152, O413, O422, O452, G241, G124, G321, G424, G431, G4311 et G514). Selon Correa et Barneix (1997), la sélection de souches de rhizobiums plus tolérantes aux faibles pH permet d'améliorer la tolérance des légumineuses à l'acidité.

II.3.3.3. Tolérance à la température

En général, tous les isolats ont présenté une bonne croissance à 28 °C et 37 °C, caractérisée par l'apparition de colonies visibles sur milieu YEM solide et par des valeurs élevées de DO sur milieu YEM liquide (figure 11A et 11B). Toutefois, à 4 °C, seules les deux souches de références, *Sm2011* et *Sm1021*, pouvaient croître à cette température. L'augmentation de la température a entraîné une baisse sensible de la croissance. De ce fait, à 45 °C, 15 isolats seulement (O144, O152, E251, E521, E532, G242, G321, G421, G422, G431, G4311, G514, G522, *Sm2011* et *Sm1021*) se sont montrées thermotolérants.

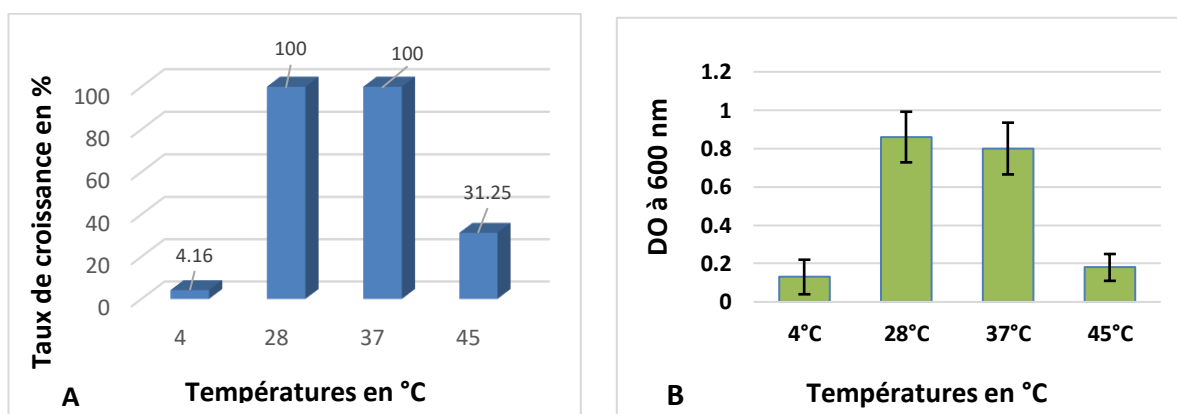


Figure 11: Tolérance des souches (A) et importance de leur multiplication (B) à différentes températures.

Il est signalé qu'aux températures extrêmes de 4 et 45 °C, des nombres réduits de colonies de petites tailles sur milieu solide et des densités optiques trop faibles sur milieu liquide ont caractérisés les isolats ayant pu croître.

Nos résultats concordent avec ceux de Graham (1992) et Zahran (1999) stipulant que les rhizobies sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance de la plupart des souches se situe entre 28°C et 31 °C. En outre, les résultats que nous avons obtenus sont comparables à ceux de Thami-Alami et al. (2010) et Hameed et al. (2014) dont les études ont été menées respectivement dans la région aride du sud du Maroc et de l'Irak.

L'effet des températures basses (4°C) sur l'arrêt de la croissance des rhizobia est signalé par Niste et *al.*, (2015). De nombreuses souches de rhizobia isolées de sols sahéliens, sénégalais et tunisiens ont été étudiées par Cacciari et *al.* (2016) et les résultats ont montré que des souches sont capables de se multiplier à 40 °C et même à 45 °C.

Il a été rapporté que les hautes températures sont parmi les principaux facteurs limitant la fixation d'azote par les rhizobia (Kishinevsky et *al.*, 1992 ; Hungria et Franco, 1993). L'action similaire des basses températures a été également rapportée dans les régions très humides ou froides (Zhang et Smith, 1996).

II.3.3.4. Résistances aux antibiotiques

Les souches sinorhizobiennes testées aux différents types d'antibiotiques étaient visiblement différentes et présentaient des profils de résistance différents. La résistance des souches était importante à la spiramycine 100 µg (SP), la vancomycine 30 µg (VA) et la colistine 10 µg (CS), alors que leurs résistances étaient faibles, mais comparables, pour les autres antibiotiques (figure 12).

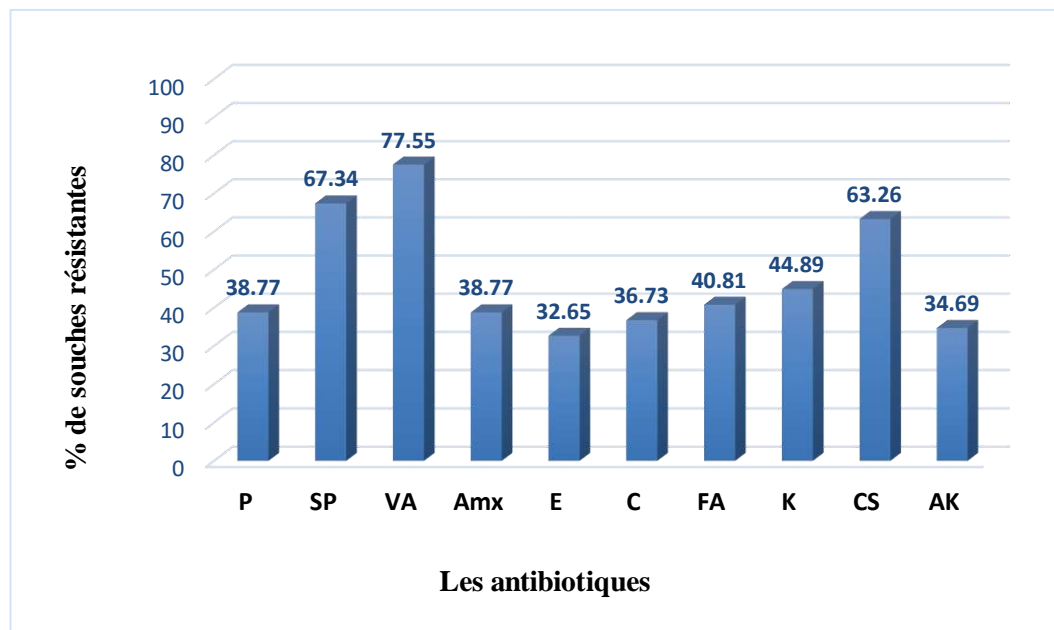


Figure 12: Effet des antibiotiques sur la croissance des souches nodulant la luzerne

Les souches provenant de la région de Ghardaïa et les souches références sont globalement tolérantes aux antibiotiques, bien qu'à différents degrés (61,17 % et 65 % de résistance respectivement). Les souches provenant des régions de Ouargla et d'El Oued

présentent, quant à elles, de faibles niveaux de résistance de l'ordre de 35 % et 43.5 %, à part quelques isolats résistants à un seul antibiotique.

La sensibilité aux antibiotiques, plus élevée chez des souches que chez des autres, peut être imputée à la biomasse microbienne moins abondante dans la rhizosphère (Grego et *al.*, 1995, in Cacciari et *al.*, 2013). Au contraire, des souches plus résistantes que d'autres peuvent être observées pendant l'utilisation en grandes quantités de certains fumiers issus d'élevages intensifs, où les antibiotiques sont couramment additionnés à l'alimentation en concentrés utilisés pour traiter les maladies des animaux et favoriser leur croissance (McManus, 1997 ; Meka et Gold, 2004).

II.3.4. Taxonomie numérique des traits phénotypiques

Les caractéristiques phénotypiques des souches ont été utilisées pour construire un dendrogramme par la méthode UPGMA (figure 13). À environ 60% de dissimilarité, les souches rhizobiennes ont été classées en trois classes phénotypiques principales. La classe la plus importante (Classe 3) contenait 29 souches provenant toutes des régions de Ouargla et d'El Oued. La classe 1 est constituée de 17 isolats provenant exclusivement de la région de Ghardaïa. Les deux souches de références *Sinorhizobium meliloti* 1021 et *S. meliloti* 2011 sont, quant à elles, classées dans une classe à part (Classe 2), plutôt proche de la classe 1 que de la classe 3.

Les résultats tirés des classes phénotypiques (figure 13, chap. III) sont fortement similaires à ceux de l'arbre phylogénétique concaténé des gènes *recA* et *glnII*. Les souches provenant de la région de Ghardaïa, appartenant aux deux espèces *S. kummerowiae* et à *S. meliloti*, sont complètement séparées de celles des régions de Ouargla et d'El Oued qui peuvent représenter une lignée distincte des espèces déjà définies. Ce résultat ne concorde pas avec celui d'El Boutahiri et *al.* (2010), qui indiquent que les souches nodulant la luzerne, appartenant à divers groupes phénotypiques, étaient également réparties dans différents groupes génotypiques et qu'il n'y avait pas de relation entre les profils génétiques et phénotypes.

Le regroupement des souches bactériennes, à travers l'analyse de leurs caractéristiques métaboliques, peut être lié à l'origine géographique. Selon El Boutahiri et *al.* (2010), l'exposition à divers stress des rhizobia nodulant la luzerne, dans les sols marginaux

du Maroc, aurait pu augmenter la diversité phénotypique et génotypique et entraîner une évolution très diverse nécessaire à leur adaptation.

Selon Rodrigues et *al.* (2018), des bactéries appartenant à des taxons différents peuvent présenter des profils métaboliques similaires, ce qui indique la capacité des bactéries appartenant à différents groupes taxonomiques à occuper la même niche écologique. Dans notre cas, l'analyse phylogénétique a confirmé que les regroupements phénotypiques des souches sont établis selon l'appartenance aux mêmes groupes taxonomiques du genre *Sinorhizobium*.

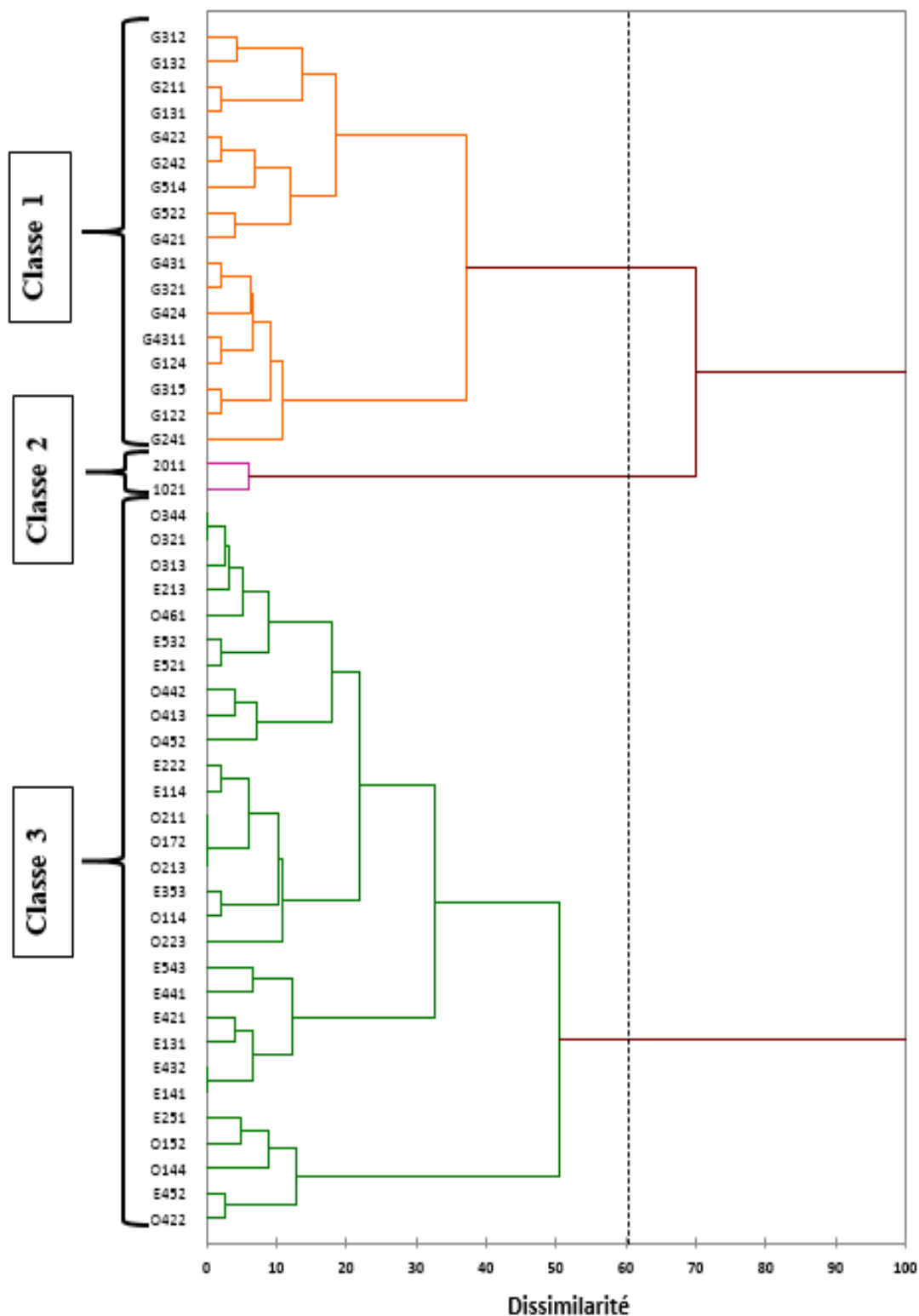


Figure 13: Dendrogramme montrant la diversité phénotypique de 48 isolats rhizobiens nodulant la luzerne. Le dendrogramme a été construit selon la méthode UPGMA, sur la base d'une matrice binaire de 27 caractères physiologiques.

II.4. Conclusion

Les résultats rapportés dans ce chapitre ont montré que les caractéristiques morphologiques et de croissance des souches étudiées étaient en accord avec celles déjà décrites sur les rhizobia dans la littérature. Le test symbiotique a abouti à l'authentification de 117 souches infectives vis-à-vis de la plante hôte. La caractérisation des souches face aux contraintes abiotiques et biotique, réalisée au laboratoire, a montré une diversité de réponses. Les profils de résistance trouvés ont permis d'établir une taxonomie numérique. Cette dernière a placé les souches provenant de Ouargla et d'El Oued dans une classe et celles de la région de Ghardaïa dans une autre. Les deux souches de références *Sm1021* et *Sm2011* sont classées dans une classe à part, plutôt proche de celle de Ghardaïa que de l'autre. Les résultats phénotypiques sont fortement similaires à ceux phylogénétiques qui classent les souches provenant de la région de Ghardaïa aux deux espèces *S. kummerowiae* et *S. meliloti*, qui sont complètement séparées de celles des régions de Ouargla et d'El Oued qui peuvent représenter une lignée distincte des espèces déjà définies.

Les résultats de cette étude renforcent les informations déjà existantes sur les rhizobia nodulant la luzerne. La caractérisation phénotypique de ces souches n'avait encore jamais été étudiée. Il est recommandé d'utiliser davantage de caractères phénotypiques afin de mieux montrer les caractéristiques distinctes des souches et d'effectuer davantage d'enquêtes supplémentaires sur d'autres souches afin de sélectionner les plus efficaces et de produire des biofertilisants efficaces, permettant d'accroître la production de cette légumineuse fourragère dans les régions semi-arides et arides du monde.

Chapitre III:

**Diversité génétique des
microsymbiotes associés à la luzerne
(*Medicago sativa* L.) dans le nord-est
du Sahara algérien**

III.1. Introduction

Il a été démontré qu'un gène hautement conservé, tel que l'*ARNr 16S*, ne convient pas à la discrimination d'espèces étroitement apparentées. Sullivan et *al.* (1996) et Jaspers et Overmann (2004) ont rapporté que des espèces bactériennes différentes possédaient des séquences de gènes d'*ARNr 16S* identiques ou presque identiques. L'utilisation récente de l'analyse de séquences multilocus (MLSA) de plusieurs gènes codant pour des protéines fonctionnelles (ex. *atpD*, *recA*, *glnII* et *rpoB* ...etc.) (Gupta, 1998; Gao et *al.*, 2001; Martens et *al.*, 2007; Silva et *al.*, 2007; Chen et *al.*, 2008; Menna et 2009; Tindall et *al.*, 2010) a donné des phylogénies qui concordent avec les phylogénies correspondantes du gène de l'*ARNr 16S*. (Gaunt et *al.*, 2001; Zhang et *al.*, 2012). Martens et *al.* (2007) ont confirmé que l'analyse MLSA des gènes de ménage est supérieure à l'*ARNr 16S* pour la discrimination d'espèces de *Sinorhizobium*.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la position taxonomique des différentes souches de la collection associées à la luzerne dans la région d'étude. Deux gènes de ménage, *recA* (une recombinaison) et *glnII* (une glutamine synthétase) et un gène symbiotique *nodC* (N-acétylglucosaminyltransférase), sont utilisés pour évaluer la diversité génétique et la phylogénie des populations de rhizobia.

III.2. Matériel et méthodes

III.2.1. Méthodes d'extraction de l'ADN

L'ADN génomique total de 60 isolats a été extrait à l'aide de colonnes DNeasy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN Ltd.) à partir de cellules rhizobiennes cultivées pendant 3 jours dans le milieu YMB à 28 °C sous agitation continue (200 rpm), conformément au protocole suivant du fabricant :

- Prendre 1 ml de chaque souche dans un microtube de 1.5 ml et centrifuger 10 min à 7500 tr / min. Jeter le surnageant ;
- Remettre le culot en suspension dans 180 µl de tampon ATL (tampon de lyse tissulaire) ;
- Ajouter 20 µl de protéinase K et mélanger soigneusement au vortex et incubé à 56 °C (1 à 3 heures) jusqu'à ce que le tissu soit complètement lysé. Vortexer de temps en temps pendant l'incubation ;

- Vortexer pendant 15 s. Ajouter 200 µl de tampon AL (tampon de lyse) à l'échantillon et bien mélanger au vortex. Ajoutez ensuite 200 µl d'éthanol (96 à 100%) et mélangez à nouveau soigneusement au vortex.
- Pipeter le mélange dans la mini colonne (filtre) de centrifugation et placer dans le tube collecteur de 2 ml. Centrifuger à 8000 tpm pendant 1 min. Jeter le tube d'écoulement et de collecte.
- Placer le filtre dans un nouveau tube collecteur de 2 ml, ajouter 500 µl de tampon AW1 (tampon de lavage 1) et centrifuger pendant 1 minute à 8000 tpm. Jeter le tube d'écoulement et de collecte.
- Placez le filtre dans un nouveau tube collecteur de 2 ml, ajoutez 500 µl de tampon AW2 (tampon de lavage 2) et centrifugez pendant 3 min à 14 000 tpm pour sécher la membrane DNeasy. Jeter le tube d'écoulement et de collecte.
- Placez le filtre dans un microtube propre de 1,5 ml ou de 2 ml et pipetez 200 µl de tampon AE directement sur la membrane de DNeasy. Incuber à la température ambiante pendant 1 min, puis centrifuger pendant 1 min 8000 tpm.
- Placer l'ADN à -20°C en attendant une éventuelle utilisation.

III.2.2. Amplification de l'ADN par la technique de PCR

Un total de 60 isolats a été sélectionné pour l'amplification de l'ADN par la technique de PCR des gènes de ménage (*glnII* et *recA*) et du gène symbiotique *nodC*.

Le principe de la méthode d'amplification d'ADN *in vitro* ou PCR (de l'anglais Polymerase Chain Reaction = Réaction de Polymérisation en Chaîne) consiste à amplifier de façon spécifique une région d'acide nucléique, dont la séquence nucléotidique est connue au moins partiellement à l'aide de deux amorces oligonucléotidiques. Chaque couple d'amorce composé d'un oligomère complémentaire de l'extrémité 3' du monobrin d'ADN à amplifier et d'un autre oligonucléotide complémentaire de l'extrémité 3' du brin antiparallèle, est susceptible de s'hybrider spécifiquement avec chacun des deux brins d'ADN aux extrémités de la région choisie pour l'amplification (Howieson et Dilworth, 2016).

La polymérisation est réalisée en présence de désoxynucléotides triphosphates : dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) et d'ADN polymérase isolé à partir de *Thermus aquaticus* (Mullis et al., 1987), une bactérie se développant à une haute température. Cette Taq polymérase fabriquée à partir des amorces une copie de chaque brin d'ADN, et ceci multiplie

par 2 le nombre initial de copies de la région d'ADN concernée. Les fragments néosynthétisés servent ensuite eux-mêmes de matrice pour initier l'étape de polymérisation du cycle suivant. La répétition des trois étapes, dénaturation, hybridation, polymérisation, aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible considérée, soit à une amplification théorique de 2ⁿ fois par génome haploïde, où n représente le nombre de cycles d'amplification réalisés.

III.2.3. Amorces d'amplification

L'amplification des gènes nécessite, en plus de l'ADN, des amorces spécifiques. Les gènes de ménages *glnII* et *recA* et le gène symbiotique *nodC* ont été amplifiés en utilisant respectivement les amorces suivantes: GSII-1F (5'-AACGCAGATCAAGGAATTTCG-3') et GSII-4R (5'-GCGACGATCTGGTGGTAGGGGGT-3') (Turner et Young, 2010) ; *recA*_41F (5'-TTCGGCAAGGGMTCGRSATSATG-3') et *recA*_640R (5'-ACATSACRCCGATCTTCATGC-3') (Vinuesa et al., 2005); *nodC*_for540 (5'-TGATYGAYATGGARTAYTGGCT-3') et *nodC*_rev1160 (5'-CGYGACARCCARTCGCTRTTG-3') (Sarita et al., 2005). Les amorces utilisées ont été fournies par Sigma Aldrich Spain (Madrid).

III.2.4. Conditions d'amplification et cycle PCR

La réaction de PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 2,5 µl de tampon de réaction (10 fois concentré) avec MgCl₂ (Biotools), 2 µl d'ADN, 1 µl de Taq polymérase (Biotools), 0,5 µl de dNTP, 1 µl de chaque amorce et 17 µl d'eau distillée.

Les programmes thermiques pour les réactions PCR de *glnII*, *recA* et *nodC* ont été réalisés comme suit :

Etape 1: 95°C 90s (préchauffage)	}	Pour <i>glnII</i> et <i>recA</i>
Etape 2: 95°C 45s × 35 cycles (dénaturation)		
Etape 3 : 55°C 45s (hybridation)		
Etape 4: 72°C 2min (élongation)		
Etape 5: 72°C 7min (élongation)		
Etape 1: 95°C 3 min (préchauffage)	}	Pour <i>nodC</i>
Etape 2: 95°C 1 min × 35 cycles (dénaturation)		
Etape 3: 55°C 1 min (hybridation)		
Etape 4: 72°C 2 min (élongation)		
Etape 5: 72°C 7 min (élongation)		

III.2.5. Quantification et purification des produits de la PCR

La quantité d'ADN a été déterminée en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop (NanoDrop ND1000) (annexe 4). Les amorces non incorporées et les dNTPs ont été retirés des mélanges de PCR avec PCR Clean-up selon le protocole décrit par le fabricant (Macherey-Nagel).

III.2.6. Contrôle de la réaction de PCR par électrophorèse

Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1% immergé dans un tampon 10×TBE (Tris-borate-EDTA) (Del Papa et *al.*, 1999). Après dissolution de l'agarose à chaud, la solution refroidie dans laquelle on ajoute du TBE, est coulée dans un moule muni de peignes. Le gel, ainsi solidifié, est transféré dans la cuve d'électrophorèse remplie du même tampon pour la migration.

Un volume de 5 µl de produit PCR de chaque souche est additionné à 5 µl de colorant de charge Orange G (Sigma-Aldrich), puis déposé dans un puits du gel. La migration s'effectue dans un champ électrique de 100 volts pendant environ 1 heure.

Pour chaque électrophorèse, nous avons prévu un contrôle positif et un contrôle négatif. Le control positif consistait en un fragment d'ADN, déjà amplifié de *Rhizobium leguminosarum*, de taille connue et égale à celle du gène cible. Le contrôle négatif consiste seulement en un tampon de réaction mélangé à l'eau distillée.

Les gels ont été colorés avec SYBR® safe (Invitrogen) et visualisés avec un système Gel Doc EZ (Bio-Rad). La taille des fragments est estimée grâce à une échelle de référence de poids moléculaire commerciale de 1 kb (Nippon Genetics).

III.2.7. Séquençage direct des produits PCR

Les réactions de séquençage ont été réalisées à Stabvida (Lisbonne, Portugal). La qualité des chromatogrammes de séquences a été vérifiée et modifiée manuellement avec le logiciel BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) et automatiquement avec le logiciel DNA Baser Assembler v4.36.0 (Heracle BioSoft, <http://www.DnaBaser.com>).

III.2.8. Analyse et alignement des séquences

Initialement, une recherche par BLAST (Altschul et *al.*, 1990) a été effectuée via le site Web du portail NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) aux fins d'identification préliminaire. Les séquences des espèces de références fortement similaires à nos souches ont été téléchargées. Les analyses phylogénétiques ont été effectuées à l'aide du logiciel MEGA 6.06 (Tamura et *al.*, 2013). Un arbre phylogénétique NJ (Neighbor Joining) a été construit à l'aide du modèle d'évolution Kimura 2 paramètre (Kimura, 1980). La stabilité des groupements a été vérifiée par une analyse "bootstrap" de 1000 répétitions.

III.3. Résultats et discussions

III.3.1. Résultats du contrôle de la réaction de PCR par électrophorèse

La PCR réalisée sur les gènes *glnII*, *recA* et *nodC*, respectivement, a permis d'en amplifier les trois gènes de 48 souches (sur un total de 60 souches prises pour cette étude). Cette amplification a généré une bande unique pour chaque gène révélée par électrophorèse chez l'ensemble des souches et évaluée visuellement par comparaison au marqueur utilisé (figures 14, 15 et 16).

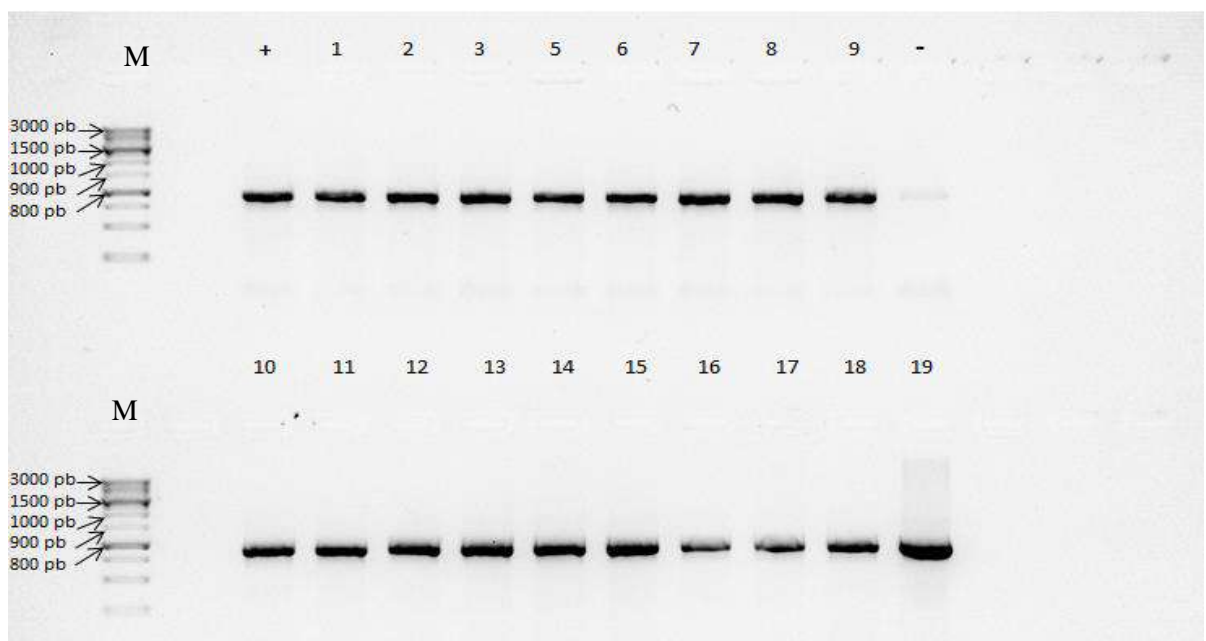


Figure 14: Gel d'électrophorèse montrant l'amplification partielle du gène *glnII* (quelques 800 pb) des isolats nodulant la luzerne. Puits : M = marqueur de poids moléculaire de 100 pb (de 100 pb à 3 kb) ; + = témoin positif (souche de *Rhizobium leguminosarum*) ; - = témoin négatif ; 1 à 19 : isolats de cette étude.

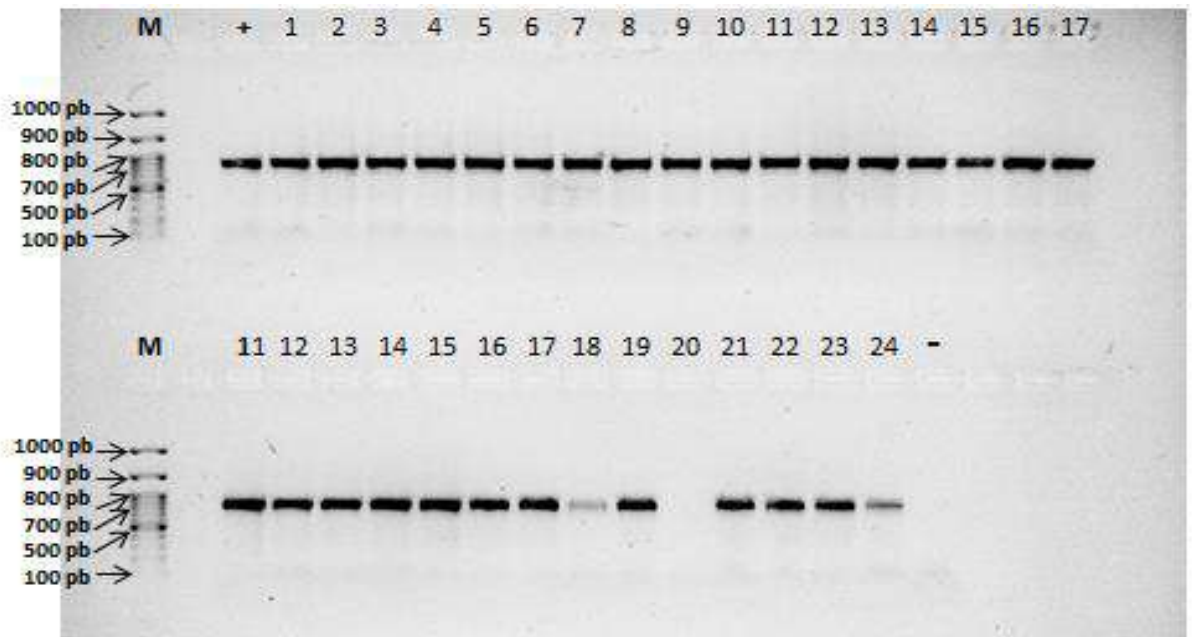


Figure 15: Gel d'électrophorèse montrant l'amplification partielle du gène *recA* (quelques 700 pb) des isolats nodulant la luzerne. Puits : M = marqueur de poids moléculaire de 100 pb (de 100 pb à 1 kb) ; + = témoin positif (souche de *Rhizobium leguminosarum*) ; - = témoin négatif ; 1 à 24 : isolats de cette étude ; l'isolat 21 n'a pas été amplifié ce qui nous a contraint de refaire sa PCR.

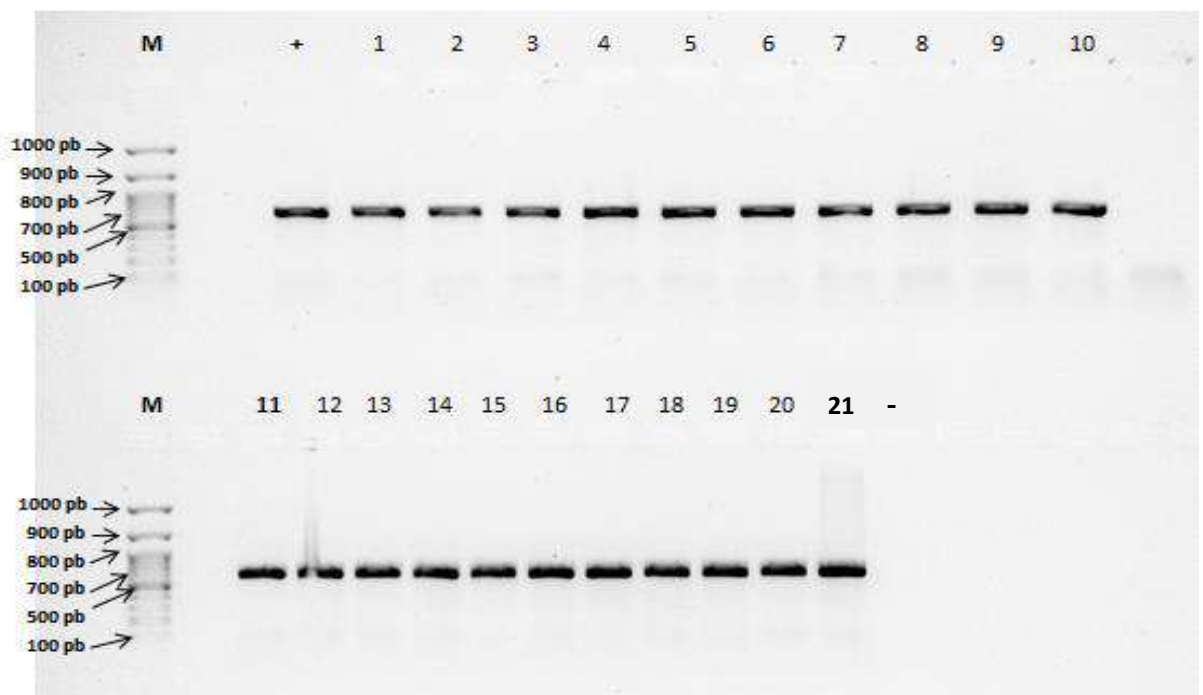


Figure 16: Gel d'électrophorèse montrant l'amplification partielle du gène *nodC* (quelques 600 pb) des isolats nodulant la luzerne. Puits : M = marqueur de poids moléculaire de 100 pb (de 100 pb à 1 kb) ; + = témoin positif (souche de *Rhizobium leguminosarum*) ; - = témoin négatif ; 1 à 20 : isolats de cette étude.

III.3.2. Analyse phylogénétique

Sur les 60 souches présélectionnées, 48 seulement ont eu une amplification des trois gènes cibles. Un fragment *recA* de 596 pb a été amplifié avec les amorces *recA_41F* et *recA_640R* (Vinuesa et al., 2005). Des séquences partielles de *glnII*, 841 et 844 pb, ont été obtenues avec les amorces *GSII-1F* et *GSII-4R* (Turner et Young, 2010). Un fragment de *nodC* partiel (552 pb) a été amplifié avec les amorces *nodC_for540* et *nodC_rev1160* (Sarita et al., 2005) d'une longueur de 521 pb.

Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant la méthode Neighbour-Joining (NJ) et le modèle d'évolution de Kimura à deux paramètres. L'analyse Bootstrap est basée sur 1000 répliquions.

Tableau 6: Similarités des séquences entre 48 souches isolées à partir de nodosités racinaires de luzerne et les souches types apparentées pour les gènes *glnII*, *recA* et *nodC*.

Souches types	Gènes marqueurs et similarités des séquences avec les souches types							
	<i>glnII</i>		<i>recA</i>		<i>glnII + recA</i>		<i>nodC</i>	
	Similarité %	Nombres de souches	Similarité %	Nombre de souches	Similarité %	Nombre de souches	Similarité %	Nombre de souches
<i>S. meliloti</i> USDA 1002 ^T	99%	14	100%	05	99%	14	99%	18
	98%	10	99%	06	98%	27	97%	08
	97%	24	98%	37	97%	07	96%	18
							89%	04
<i>S. kummerowiae</i> CCBAU 71714 ^T	100%	04	99%	04	99%	13	96%	02
	99%	10	98%	44	98%	35	95%	13
	98%	33					94%	29
	97%	01					90%	04
<i>S. medicae</i> A321 ^T	91%	01	91%	48	92%	47		
	92%	46			91%	01		
	93	01						
<i>S. medicae</i> USDA 1037							100%	02
							99%	13
							96%	29
							90%	04

III.3.3. Phylogénie des gènes de ménage

Les souches étudiées sont plus étroitement apparentées à *S. meliloti* et *S. kummerowiae* qu'aux autres espèces appartenant au genre *Sinorhizobium*, pour la phylogénie des gènes de ménage (tableau 6). L'analyse des séquences des gènes *glnII* et *recA* a révélé respectivement des similarités de 97,56–99,52 % et 98,24–100 % avec la souche type *S. meliloti* USDA

1002^T et 97,69-100 % et 98,22-99,56 % avec les souches type *S. kummerowiae* CCBAU 71714^T et seulement 91,69-93,34 % et 91,19-91,56 % avec la souche type *S. medicae* A321^T.

III.3.3.1. Phylogénie du gène *glnII*

L'arbre phylogénétique correspondant au gène *glnII* (Fig. 17) montre que les souches testées sont regroupées en deux groupes avec un support bootstrap élevé (une valeur bootstrap de 99 pour le groupe I et de 70 pour le groupe II). Le groupe I est constitué de 14 souches provenant exclusivement de la région de Ghardaïa, étroitement apparentés aux souches de référence *S. kummerowiae* CCBAU 71714^T et *S. meliloti* USDA 1002^T. Treize souches (G421, G422, G242, G424, 431, G4311, G514, G211, G242, G315, G321, G122 et G124) sont groupées avec *S. kummerowiae* CCBAU 71714^T avec des similarités 99,82 à 100% et une souche uniquement, qui est G312, avec *S. meliloti* USDA 1002^T avec une similarité de séquence de 99,52%. Le groupe II est composé de 34 isolats provenant des régions d'El Oued et de Ouargla (sauf G131, G132 et G522 provenant de Ghardaïa), qui sont séparés des souches types de référence et suggèrent que ces nouvelles souches peuvent représenter une lignée distincte des espèces définies. Les similitudes entre les souches de ce groupe et les souches de type *S. kummerowiae* CCBAU 71714^T et *S. meliloti* USDA 1002^T sont respectivement de 97,69 à 98,58% et de 97,46 à 98,19%.

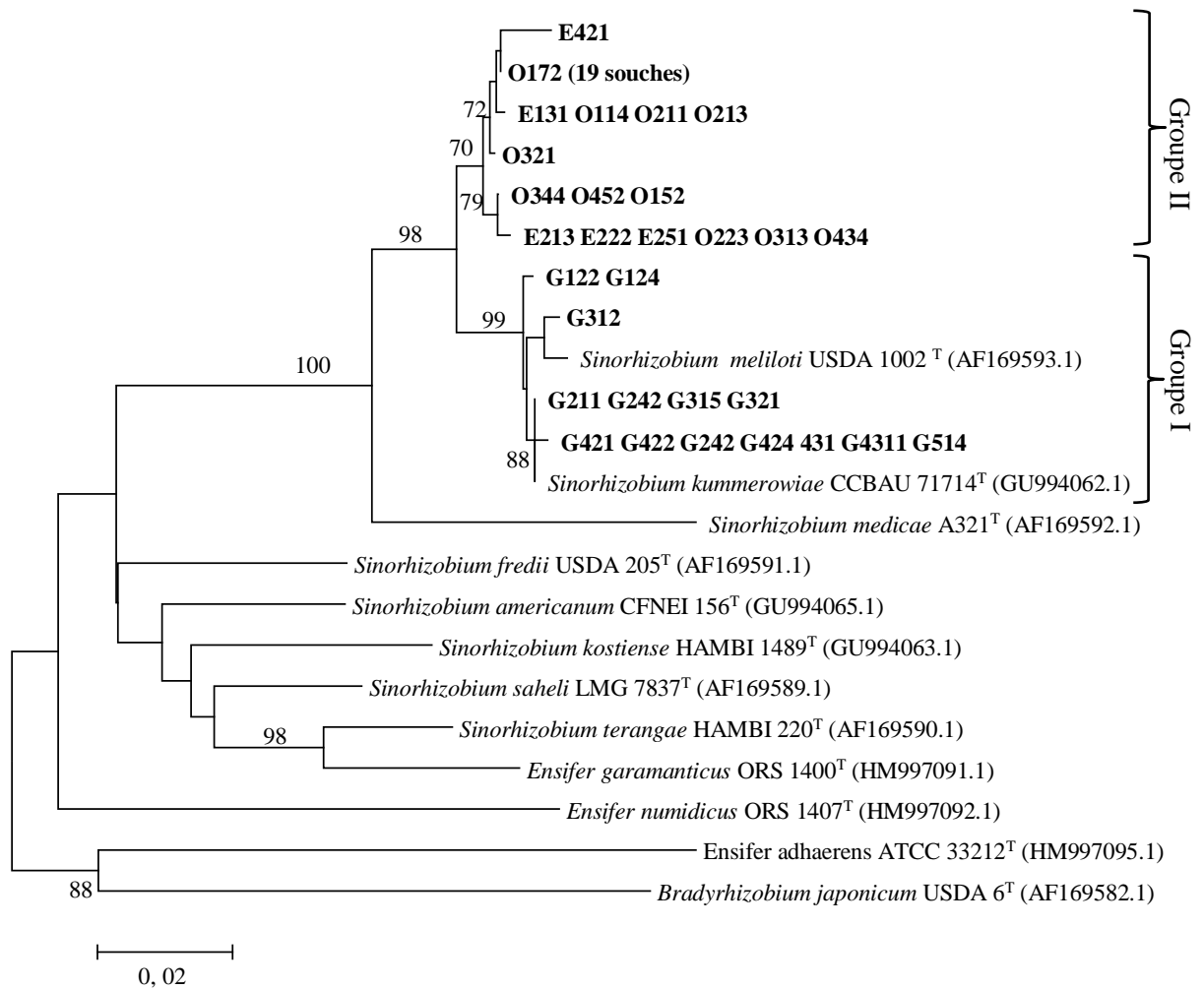


Figure 17 : Arbre phylogénétique NJ du gène *glnII* (539 pb) montrant la relation entre les souches nodulantes de la luzerne (mentionnées en gras) et les espèces appartenant au genre *Sinorhizobium* – *Ensifer*. Les valeurs de bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches. Les numéros d'accèsion GenBank sont indiqués entre parenthèses. *Bradyrhizobium japonicum* USDA6^T est utilisée comme groupe externe. Les souches types sont indiquées par la lettre T en exposant. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site.

III.3.3.2. Phylogénie du gène *recA*

Les souches testées sont regroupées en 2 groupes distincts avec des valeurs de bootstrap très élevées de l'ordre de 97 pour le groupe I et de 93 pour le groupe II (Fig. 18). Le groupe I est composé de 14 souches provenant toutes de la région de Ghardaïa et fortement liées aux souches types *S. meliloti* USDA 1002^T et *S. kummerowiae* CCBAU 71714^T. Dix souches (G122 G124 G211 G241 G242 G312 G315 G321 G421 G422) sont regroupées avec la souche type *S. meliloti* USDA 1002^T avec une similarité de séquence 100 %. Quatre autres souches (G424 G431 G4311 G514) sont regroupées avec la souche de référence *S. kummerowiae* CCBAU 71714^T et présentant une similarité de séquence de 99,24% (figure 18).

Le groupe II, quant à lui, est composé de trente-quatre souches issues des régions d'El Oued et de Ouargla (à l'exception de G131, G132 et G522 qui proviennent de Ghardaïa) et sont regroupés à part, c'est-à-dire que leurs similarités restent très élevées avec les souches de référence *S. meliloti* USDA 1002^T et *S. kummerowiae* CCBAU 71714^T (98,22 à 98,67%) mais forment sur l'arbre un clade individualisé.

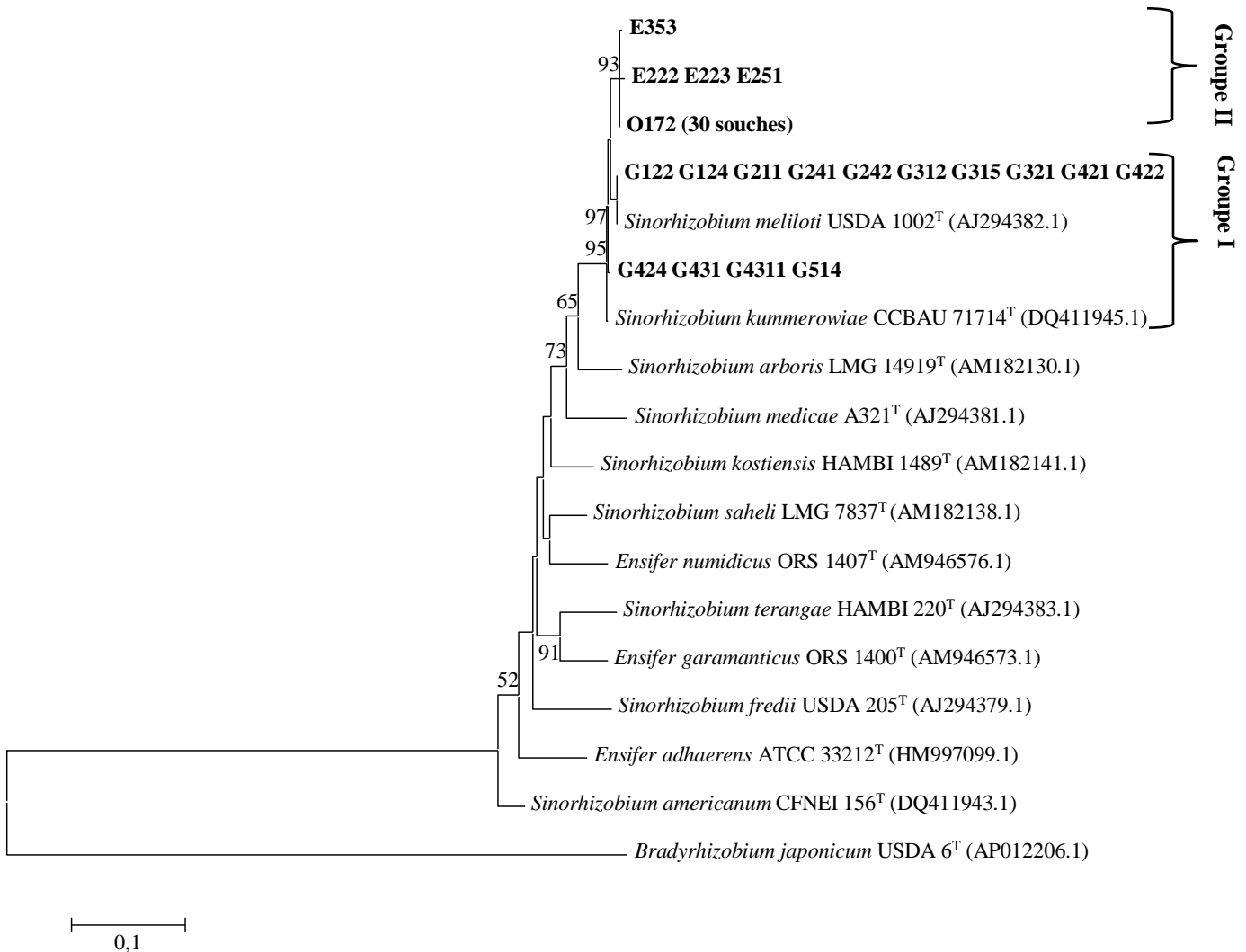


Figure 18 : Arbre phylogénétique NJ du gène *recA* (430 pb) montrant la relation entre les souches isolées de la luzerne (mentionnées en gras) et les souches types appartenant au genre *Sinorhizobium* – *Ensifer*. Les valeurs de bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches. Les numéros d'accèsion GenBank sont indiqués entre parenthèses. *Bradyrhizobium japonicum* USDA6^T est utilisée comme groupe externe. Les souches types sont indiquées par la lettre T en exposant. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site.

III.3.3.3. Phylogénie des gènes de ménage (*recA* + *glnII*)

Afin d'affiner la phylogénie de nos souches, un arbre phylogénétique a été reconstitué à partir de séquences de gènes de ménages concaténés des gènes *glnII* et de *recA* (Fig. 19). Les résultats du regroupement des souches sont généralement similaires à ceux des arbres de gènes individuels. Les 48 souches ont été regroupées en 2 groupes différents. Quatorze souches appartiennent au groupe I avec une valeur de bootstrap de 98 %. Sept souches (G122, G124, G211, G242, G315, G321 et G321) sont regroupées avec la souche de référence *S. meliloti* USDA 1002^T avec une similarité de séquences de 99,48 à 99,69 % et sept autres (G431, G4311, G514, G424, G241, G421 et G422) sont liées avec la souche de référence *S. kummerowiae* CCBAU 71714^T avec des taux de similarité de 99,38 à 99,69 %.

Il est à noter que toutes les souches composant le groupe I proviennent de la région de Ghardaïa. Le groupe II, composé de 34 souches provenant exclusivement des régions d'El Oued et de Ouargla (à l'exception des trois souches, précédemment mentionnées dans l'analyse individuelle des gènes de ménage, issus de la région de Ghardaïa), forme clairement un groupe séparé des souches de référence et du groupe I de cette étude avec une valeur du bootstrap pour ce groupe est de 97%. Les similarités entre les souches du Groupe 2 et les souches de référence les plus proches sont respectivement de 97,73 à 98,25 % avec *S. meliloti* USDA 1002^T et de 98,04 à 98,56% avec *S. kummerowiae* CCBAU 71714^T.

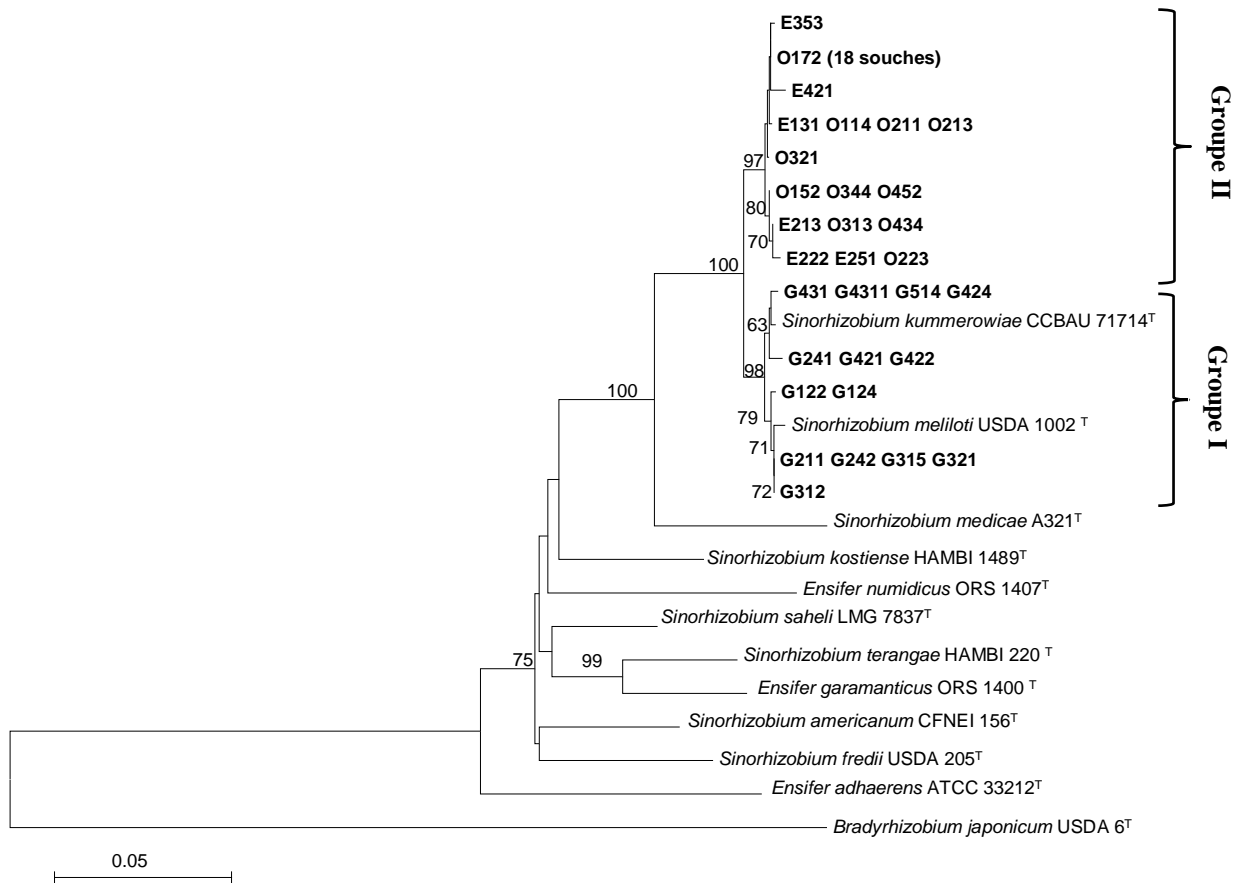


Figure 19 : Arbre phylogénétique NJ construit à partir des gènes de ménage concaténés *recA* et *glnII* (969 pb) montrant les relations phylogénétiques entre les souches nodulant la luzerne et les espèces du groupe *Sinorhizobium* – *Ensifer*. Les valeurs de bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches. *Bradyrhizobium japonicum* USDA6^T est utilisée comme groupe externe. Les souches types sont indiquées par la lettre T en exposant. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site. Les numéros d'accèsion de GenBank des souches types sont indiqués en annexe 5.

III.3.4. Phylogénie du gène symbiotique *nodC*

L'arbre phylogénétique du gène *nodC* a placé les souches dans trois groupes distincts, avec des valeurs de bootstrap de 100% pour les groupes I et III et de 99% pour le groupe II, comme présenté par la figure 20. Les souches des groupes I et II proviennent des trois zones d'étude et sont regroupées respectivement avec les souches types *S. meliloti* USDA 1002^T et *S. medicae* A321^T avec des similarités des séquences de l'ordre de 97,05 à 99,66% et de 99,65 à 100 %. Les souches G431, G4311 et G514 du groupe III présentent une similarité de séquence élevées avec la souche *S. meliloti* LAIII42 (99,66 %) et proviennent de la région de Ghardaïa.

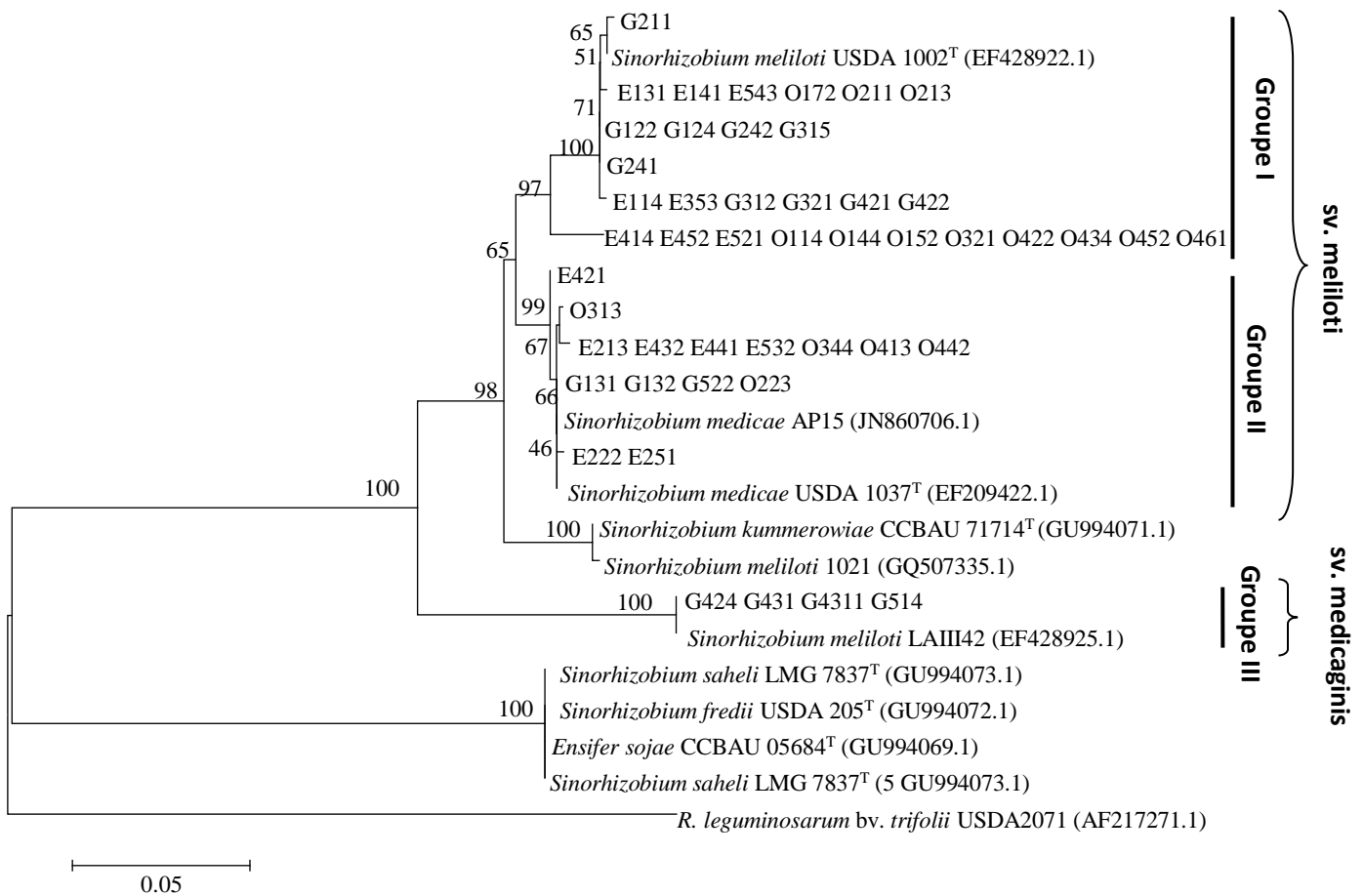


Figure 20 : Arbre phylogénétique NJ du gène partielles *nodC* (479 pb) montrant les relations phylogénétiques entre les souches nodulant la luzerne et les espèces du groupe *Sinorhizobium* – *Ensifer*. Les valeurs de bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au-dessus des branches. Les souches types sont indiquées par la lettre T en exposant. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site.

III.4. Discussion

Dans cette étude, nous avons analysé pour la première fois une collection de rhizobia composée de 48 souches obtenues à partir de nodosités racinaires de la luzerne cultivée *Medicago sativa* L., à l'aide de séquences génétiques des gènes *recA*, *glnII* et *nodC* pour l'analyse phylogénétique.

III.4.1. Analyse phylogénétique des gènes de ménage

De nombreuses études ont décrit les *S. meliloti* et *S. medicae* comme les seuls rhizobia capables de noduler la luzerne (Carelli et al., 2000; Biondi et al., 2003; Langer et al., 2008; Elboutahiri et al., 2010). L'analyse phylogénétique des gènes de ménage *recA* et *glnII* a montré que c'est plutôt *S. meliloti* et *S. kummerowiae* qui sont les microsymbiotes dominants de *Medicago sativa* dans les régions sahariennes de l'Algérie. Nos souches étaient étroitement liées à *S. meliloti* et à *S. kummerowiae* plutôt qu'à d'autres espèces du genre *Sinorhizobium*. L'analyse des séquences de *recA* et de *glnII* a révélé respectivement des similarités de 98–100% et 97–99% avec la souche type *S. meliloti* USDA1002^T, 98-99% et 98-100% avec la souche type *S. kummerowiae* CCBAU71714^T et seulement 91% et 91-93% de la souche de type *S. medicae* A321^T. Nos résultats convergent avec ceux de Wei et al. (2002) et Toularoud et al. (2016) qui ont mentionné que *S. kummerowiae* pourrait noduler efficacement la luzerne dans les sols chinois et turcs. Baba Arbi et al. (2015) et Chaïch et al. (2016) ont récemment signalé la présence de *S. kummerowiae* dans les zones d'étude comme microsymbiote dominant avec *S. meliloti* chez les légumineuses spontanées *Medicago littoralis*, *Melilotus indicus* et *Genista saharae*.

La figure 19 montre que les souches ont été regroupées en 2 groupes différents : Le groupe I comprend 7 isolats étroitement liés avec *S. Kummerowiae* présentant une similarité de séquence de 99,39 à 99,69% et 7 autres avec *S. meliloti* avec une similarité de 98,97 à 99,17% respectivement. Trente-quatre souches composant le groupe II ont été séparées des souches de référence et suggèrent que ces nouveaux isolats pourraient représenter une lignée distincte des espèces déjà définies. Comme suggéré par Toularoud et al. (2016), d'autres analyses phylogénétiques des gènes de ménage peuvent aider à résoudre davantage la relation taxonomique entre *S. kummerowiae* et *S. meliloti*, qui ne peuvent être au final qu'une seule espèce vu la ressemblance existant entre elles.

Les résultats tirés de l'arbre concaténé (Figure 19) sont généralement similaires à ceux des arbres des gènes individuels (Figures 17 et 18). Les isolats d'origine de Ghardaïa appartiennent aux deux espèces *S. kummerowiae* et à *S. meliloti* et sont complètement séparés de ceux de Ouargla et d'El Oued, ce qui peut représenter une lignée distincte des espèces déjà définies.

3.4.2. Analyse phylogénétique des gènes symbiotiques

Le gène *nodC* est très important pour la nodulation et la fixation de l'azote chez toutes les espèces rhizobiennes (Laguerre et al., 2001). Les similarités entre les séquences de *nodC* et le spectre d'hôtes de rhizobia sont utilisées pour définir les symbiovars chez les rhizobia (Tian et al., 2012; Peix et al., 2015). À ce jour, neuf symbiovars ont été décrits au sein du genre *Sinorhizobium*, à savoir *mediterraneanse*, *acaciellae*, *fredii*, *lancerottense*, *medicaginis*, *meliloti*, *rigiduloides*, *acacieae* et *sesbaniae* (Lortet et al., 1996 ; Villegas et al., 2006; Rogel et al., 2011 ; Léon-Barrios et al., 2011; Mnasri et al., 2012; Gubry-Rangin et al., 2013).

Un arbre phylogénétique construit selon la méthode NJ, des séquences du gène *nodC*, a révélé trois groupes bien distincts avec des valeurs de bootstrap de 97, 99 à 100% (figure 20). Vingt-neuf souches appartiennent au groupe I, composé de souches présentant une similarité de 97,05 à 99,66% avec *S. meliloti* USDA 1002^T. Le groupe II est composé de quinze souches présentant une similitude de 99,48 à 100% avec la souche *S. medicae* AP15. Trois souches distinctes formant le groupe III présentent une similarité de 99,66% avec *S. meliloti* LAIII42.

Pour étiqueter les groupes résultants, nous avons utilisé le système de biovars symbiotiques ou symbiovars (équivalent aux biovars) proposé par Rogel et al. (2011) et De Meyer et al. (2011). Ainsi, les souches de *Sinorhizobium* utilisées dans cette étude appartiennent à deux types de symbiovars : *meliloti* (groupes I et II) et *medicaginis* (groupe III) décrits par Villegas et al. (2006). Ces résultats s'expliquent par le fait que les isolats testés ainsi que *S. meliloti* et *S. medicae* ont la même plante hôte.

Plusieurs études ont montré que l'histoire évolutive des gènes chromosomiques peut être différente de celle des gènes symbiotiques. Ces études s'appuient sur l'analyse phylogénétique comparée des séquences des gènes *nod*, *nif* et de gènes chromosomiques (Mergaert et al., 1997 ; Haukka et al., 1998 ; Laguerre et al., 2001). La classification résultant de l'analyse du gène symbiotique *nodC* reflète la spécificité d'hôte, tandis que la phylogénie basée sur les gènes chromosomiques est indépendante de la plante hôte (Laguerre et al., 2001). La comparaison entre la phylogénie de l'*ADNr16S* des rhizobiums et la phylogénie de leur légumineuse hôte permet également de conclure que la taxonomie des rhizobiums ne reflète pas les propriétés symbiotiques. Les symbiovars peuvent être partagées par différentes espèces en raison des transferts latéraux de gènes symbiotiques (Rogel et al., 2011).

III.5. Conclusion

La présente étude fournit la première analyse de la diversité phylogénétique des rhizobia indigènes nodulant la luzerne au Sahara septentrional est-algérien. Les informations générées à partir des séquences de gènes de ménages combinés (*recA* et *glnII*) ont clairement montré que les souches de la collection étaient toutes affiliées au genre *Sinorhizobium*. L'analyse phylogénétique a montré l'existence de deux groupes distincts où les souches du premier groupe, d'origine de Ghardaïa, appartiennent aux espèces *S. meliloti* et *S. kummerowiae*. Les souches composant le groupe II, originaires de Ouargla et d'El Oued, ont été séparées des souches de référence et suggèrent que celles-ci pourraient représenter une lignée distincte des espèces déjà définies.

La phylogénie des gènes chromosomiques était différente de celle du gène symbiotique *nodC*. La classification résultant de l'analyse du gène *nodC* reflète la spécificité d'hôte, tandis que la phylogénie basée sur les gènes chromosomiques est indépendante de la plante hôte.

La détermination du statut taxonomique exacte des souches de la collection étudiées par d'autres techniques moléculaires, en l'occurrence le séquençage du gène de l'*ADNr 16S* ainsi que d'autres gènes de ménage, est à entreprendre dans le futur.

Chapitre IV :

**Amélioration de la croissance de la
luzerne sous stress hydrique par
inoculation avec des souches locales
du genre *Sinorhizobium*.**

IV.1. Introduction

Les légumineuses sont capables d'établir une symbiose avec les bactéries rhizobiennes et former des nodules où les bactéries trouvent les conditions appropriées pour réduire l'azote atmosphérique en ammoniac (Palma et *al.*, 2013). La fixation symbiotique d'azote entre rhizobia et plus de 100 légumineuses importantes en agriculture contribue pour au moins la moitié de l'azote annuel fixé dans le sol (Peoples et Craswell, 1992) et constitue une alternative durable aux produits chimiques de fertilisation dans les zones touchées par la sécheresse.

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est une importante légumineuse fourragère largement cultivée dans le monde (Chao et *al.*, 2009) et est la plus importante culture de légumineuses fourragères des zones arides et semi-arides d'Afrique du Nord (Elboutahiri et *al.*, 2010) en raison de son faible coût de production, sa qualité élevée (digestibilité et teneur en protéines) et sa distribution saisonnière tout au long de l'année (Castroluna, 2009).

La sécheresse est responsable des pertes de récoltes les plus importantes dans le monde et devraient s'aggraver dans le futur, renforçant l'intérêt international pour la tolérance des cultures à la sécheresse (Sofi et *al.*, 2017). Antolín et *al.* (1995) ont signalé que les feuilles de luzerne nodulées étaient moins sensibles à la diminution de leur teneur en eau, car elles maintenaient un taux de photosynthèse nette et de chlorophylle plus élevés sous un stress modéré que les plantes non nodulées fertilisées à l'azote.

L'objectif visait dans ce chapitre était d'examiner la croissance et la nodulation chez une population locale de luzerne provenant de la région de Ouargla, inoculée par quatre souches locales de *Sinorhizobium sp.* et deux souches introduites, utilisées comme références, sous différentes doses d'irrigation.

IV.2. Matériel et méthodes

IV.2.1. Souches bactériennes et conditions de croissance

Un total de six souches a été utilisé dans cette étude. Quatre souches (O152, O172, E131 et E222) isolées à partir des nodules racinaires de luzerne (*Medicago sativa* L.) cultivée à Ouargla et El Oued ont été sélectionnées parmi quarante-huit autres, précédemment caractérisées, pour leur résistance aux facteurs pédoclimatiques prédominants dans ces

régions (pH, température et salinité) et aux antibiotiques (tableau 7). Elles ont été même caractérisées génétiquement et placées comme souches appartenant aux genres *Sinorhizobium*. Deux souches étroitement apparentées *Sm1021* et *Sm2011* de *Sinorhizobium meliloti*, utilisées comme références et capables de former des nodules fixateurs d'azote chez les plantes hôtes du genre *Medicago* ont également été incluses. Ces deux souches sont les dérivés de l'isolat type SU47 de *S. meliloti* (Wais et al., 2002). Elles ont été envoyées par Dr Hélène BERGES du centre de génomique des plantes (CNRGV, INRA-France).

Tableau 7 : Codes des souches, plante hôte d'isolement, localisation géographique et type de climat.

Souches	Plante hôte	Site d'échantillonnage	Localisation	Types de climat
E131	<i>M. sativa</i>	Tenedla	Lat. 33°67'58''N Long. 6°03'72''E	Hyperarid
E222	<i>M. sativa</i>	El-Meghaier	Lat. 33°56'25''N Long. 5°92'71''E	Hyperarid
O152	<i>M. sativa</i>	Hassi Ben Abdallah	Lat. 32°00'77''N Long. 5°46'27''E	Hyperarid
O172	<i>M. sativa</i>	Hassi Ben Abdallah	Lat. 32°00'77''N Long. 5°46'27''E	Hyperarid

Les souches bactériennes ont été cultivées à 28 °C pendant 72h sur un incubateur agitateur (200 tpm) dans le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent, 1970).

IV.2.2. Matériel végétal

Une population locale de luzerne (*Medicago sativa* L.) originaire de l'oasis de Ouargla, où elle est cultivée depuis plusieurs décennies et est toujours largement utilisée par les agriculteurs locaux, a été choisie pour cette étude. Un test de germination des graines a été mis en œuvre afin de vérifier leur capacité germinative selon la méthode décrite par Mouradi et al. (2015) et Farissi et al. (2016). Les graines ont été mises à germer à 25 °C à l'obscurité totale dans des boîtes de Pétri contenant un papier filtre arrosé par l'eau distillée. Trois répétitions de 40 graines par répétition ont été effectuées. Une graine a été considérée germée lorsque la radicule dépasse de 2 mm le tégument de la graine. La durée de l'expérience recommandée était de 06 jours, pendant laquelle on comptait quotidiennement le nombre de graines germées.

$$\text{Taux de germination (\%)} = (\text{Nt} / \text{Ni}) \times 100$$

Avec : **Nt**, le nombre de semences germées au temps t ; **Ni**, le nombre de semences mises à germer.

Une fois la capacité germinative vérifiée, les graines ont été stérilisées en surface par immersion dans l'éthanol 95% pendant 10 secondes, puis dans une solution de HgCl₂ acidifiée à 0,1% pendant 5 à 7 minutes et suivi de six rinçages successifs à l'eau distillée stérile (Somasegaran et Hoben, 1985). Après cela, les graines ont été trempées pendant une nuit dans de l'eau distillée stérile au réfrigérateur à 4 °C.

IV.2.3. Plan expérimental

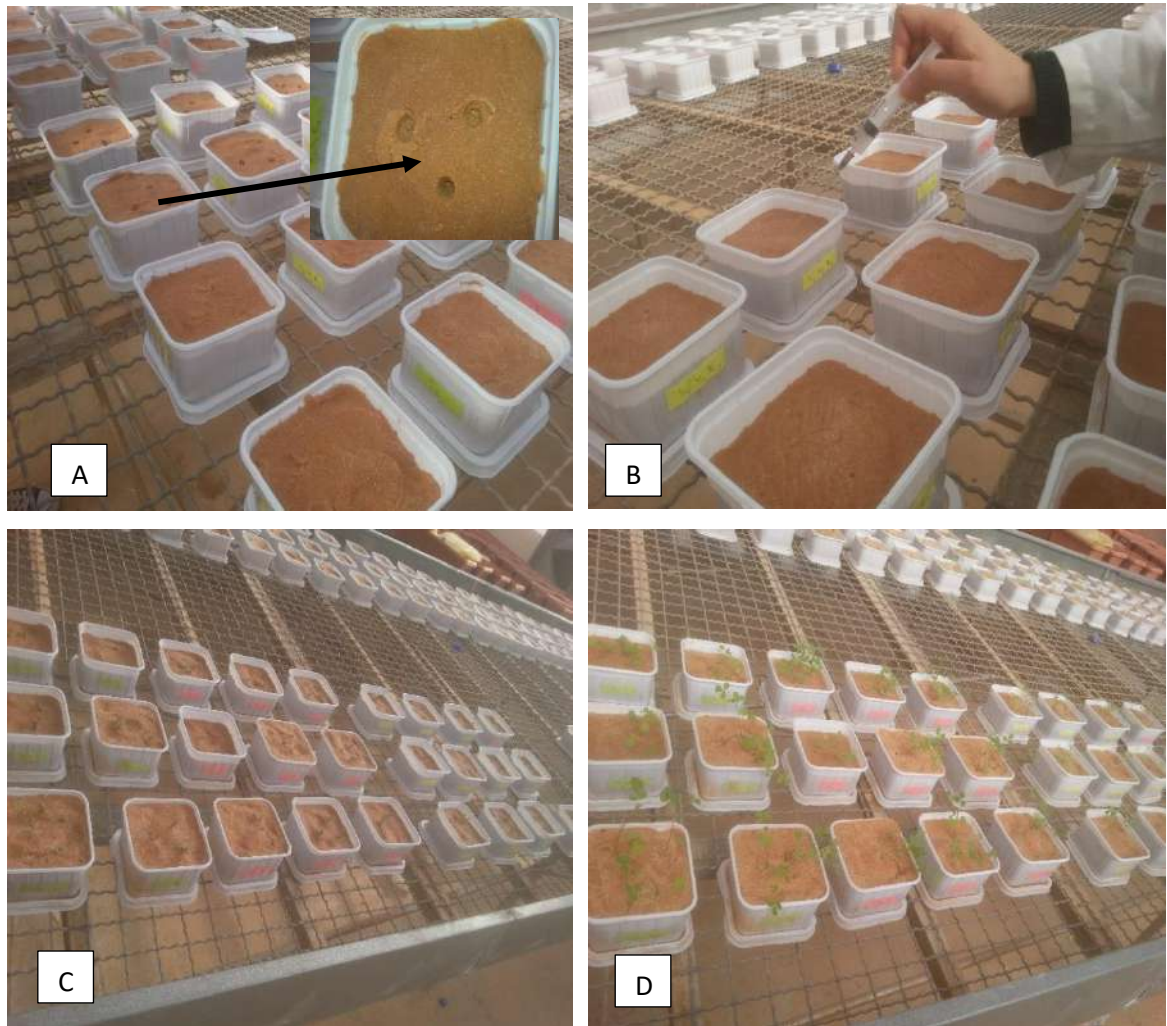
Cette étude a été réalisée comme une expérience factorielle basée sur un plan complètement randomisé avec trois répétitions dans une serre semi-contrôlée de la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, de l'Université de Ouargla (de février à avril 2017). Les conditions de croissance étaient de 20/25 °C et de 50/60 % d'humidité relative.

Nous avons utilisé comme substrat de culture un sable provenant de la zone de Sidi Khouiled (région de Ouargla), appartenant au grand erg oriental, qui avait subi une série d'opérations avant d'être utilisé, selon la méthode indiquée par Djerroudi et *al.* (2017). Le sable a été préalablement tamisé pour enlever toutes traces d'impuretés d'origine végétale ou animale puis lavé avec d'Acide Chlorhydrique (HCl) pendant 15 à 20 minutes pour éliminer les carbonates, les chlorures...etc. Ensuite, il a subi une série de lavage successifs à l'eau distillée (5 à 6 fois) afin d'éliminer toute trace de chlorure et mis à sécher à l'air libre.

Des mesures de pH et de conductivité électrique (CE) ont été effectuées avant et après traitement du sable comme décrit par Pansu et Gautheyrou (2003). Le pH est un indicateur de l'état de fertilité du sol qui fournit des informations sur l'activité microbienne, sur la présence de certains sels toxiques et sur le degré d'assimilabilité des éléments par les plantes. Le classement des pH de sol a été fait selon les normes internationales (Aubert, 1978) (annexe 6) et est déterminé par la méthode électrométrique (pH mètre), selon un rapport sol/eau (1/2,5). La mesure de CE renseigne sur sa salinité et déterminée par un conductimètre avec un rapport sol/eau (1/5) selon les normes de salinité USSL Staff (1954) et Aubert (1978) (annexe 7). Enfin, Une stérilisation s'en est suivie au four pasteur pendant 2 heures à 180°C.

Les graines ont été semées dans des pots en plastique de forme carrée, d'un litre de volume et remplis de sable stérile (photo 6A). Six graines ont été semées par pot: deux

graines ont été placées dans chacune des 3 petites cavités dans lesquelles 1 ml d'inoculum fraîchement récolté a été ajouté (photo 6B). Des graines non inoculées ont été utilisées comme témoins (T). Au total, 84 traitements ont été testés. Le traitement consistait à inoculer ou non les graines de luzerne par une seule souche de *Sinorhizobium sp.* à un seul niveau de dose d'irrigation.



Photos 6: Description de quelques étapes de la mise en place du protocole expérimental et la croissance des plantes: **A)** semis des graines ; **B)** inoculation bactérienne ; **C)** germination et levée des jeunes plantules ; **D)** plantules en phase de croissance.

Les pots étaient arrosés tous les deux jours, pendant les deux premières semaines, avec 100 ml de la solution nutritive de Fahraeus exempte d'azote (Vincent, 1970) dont la composition est mentionnée en annexe 2. Après 15 jours, les plantules ont été éclaircies à trois plantes par pot et un arrosage avec les différentes doses d'eau a été appliqué pendant huit

semaines. Les limites d'eau imposées étaient de 25% (D2), 50% (D3) et 75% (D4) de la capacité au champ (100% = D4= 100 ml).

IV.2.4. Mesures de la croissance et de la biomasse des plantes

Les plantes ont été prélevées 10 semaines après le semis. Les plantes ont été soigneusement retirées du substrat et lavées doucement sous l'eau du robinet (photo 7). 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 trois plantes pour obtenir une moyenne par pot. 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 à 75 °C dans une étuve pendant 48 h et les poids secs (PS) ont été enregistrés (Wang et *al.*, 2018). Les mesures du poids ont été effectuées à l'aide d'une balance électronique.



Photo 7: Croissance différentielle des plantes de luzerne en fonction de la quantité d'eau d'arrosage.

IV.2.5. 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 Fisher à un niveau de probabilité de 5%.

IV.3. Résultats et discussion

IV.3.1. Taux de germination des graines

La faculté germinative des graines était jugée satisfaisante avec un taux moyen de $91,5 \pm 5,1\%$.

IV.3.2. Valeurs de pH et de CE du sable

Les résultats des analyses physico-chimiques de nos échantillons de sable sont mentionnées dans le tableau 8. L'interprétation des résultats est faite selon les normes indiquées en annexes 6 et 7.

Tableau 8 : Résultats des analyses physicochimiques de sable avant et après traitement.

Paramètres	Sable avant traitement	Sable après traitement
CE (dS/m)	2.03 ± 0.05	0.61 ± 0.014
pH	7.2 ± 0.082	6.63 ± 0.047

Il est remarqué que les paramètres étudiés montrent des valeurs différentes avant et après traitement du sable. Selon les échelles de pH citée par USSL (1954) et AUBERT (1978), les valeurs obtenues montrent que le sable avant déminéralisation présentait des valeurs indiquant un sable salé et très légèrement alcalin. La déminéralisation a permis d'avoir un sable peu salé et très légèrement acide.

D'après Orloff (2007), la disponibilité maximale des nutriments pour la plupart des cultures se produit lorsque les valeurs de pH se situent entre 6,0 et 7,0. Cependant, des valeurs de pH comprises entre 6,3 et 7,5 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 en luzerne, en fonction des ions spécifiques présents dans la solution sol-eau (Orloff, 2007). Comme la CE obtenue est inférieure à 2 ds/cm, nous concluons que le sable traité ne pose pas de problèmes ou de propriétés nuisibles au processus de symbiose rhizobium-légumineuse.

IV.3.4. Croissance et rendement sous stress hydrique

Les quatre traitements d'irrigation ont permis de développer différents degrés de réponse au stress hydrique chez les plants de luzerne. La croissance totale et le rendement ont été significativement affectés (Figure 21). Le stress hydrique croissant (D2, D3 et D4) a progressivement réduit la croissance de la plante exprimée en hauteur, longueur de la racine, poids sec des racines et des tiges et nombre de nodules par rapport aux plantes non stressées (D1).

Il a été établi que le stress dû à la sécheresse est un facteur très important limitant la croissance et le développement des plantes (Shao et *al.*, 2008; Bhargava et Sawant, 2013). Nos résultats convergent avec ceux de Carter et Sheaffer (1983), Hall (1993) et Safarnejad (2008) qui ont mentionné que la sécheresse affectait négativement l'élongation des tiges et des racines ainsi que la croissance générale de la luzerne. La quantité et la qualité de la croissance et du rendement des plantes en sont également affectés (Jaleel et *al.*, 2009; Zlatev et Lidon, 2012).

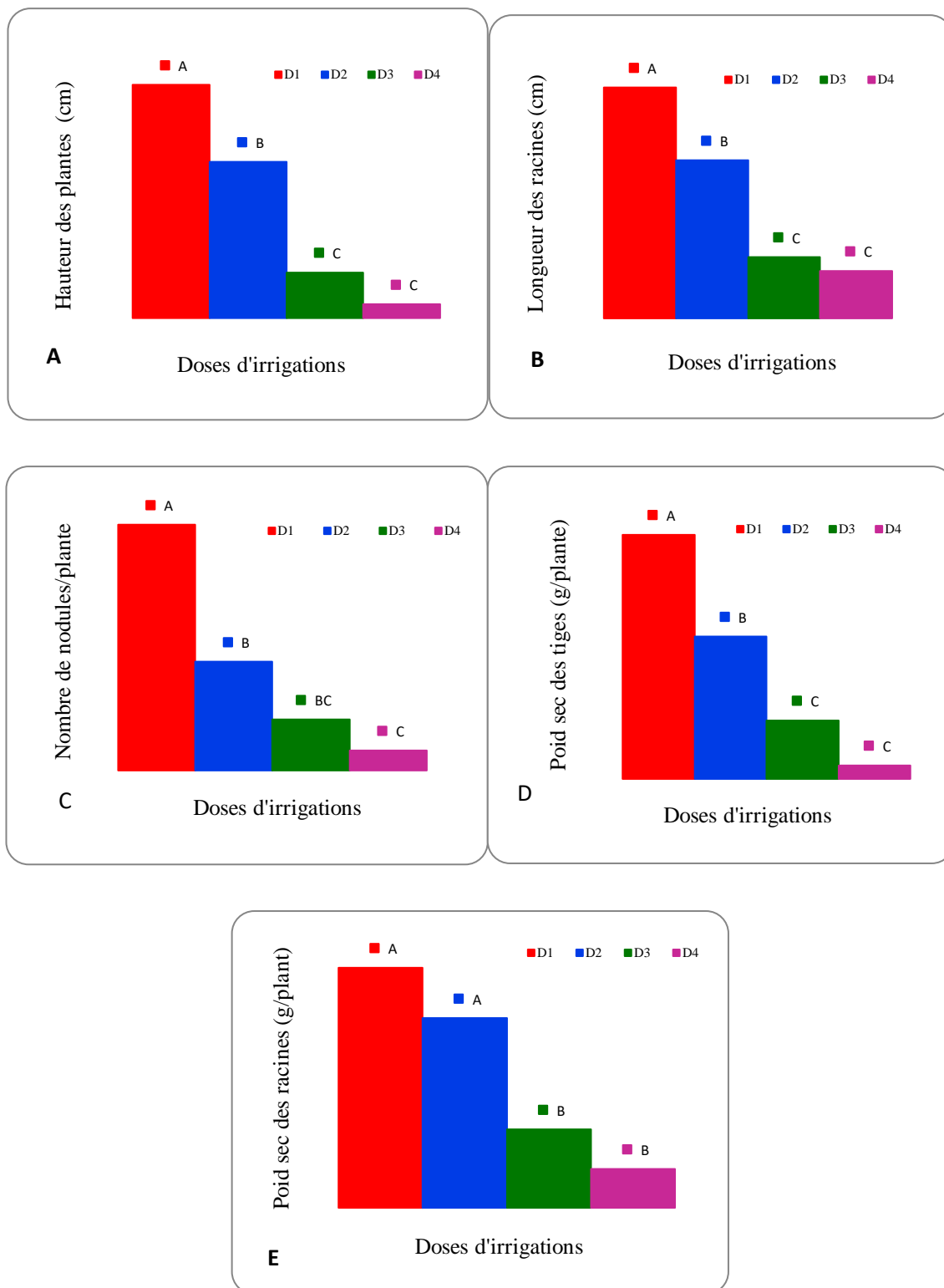


Figure 21: Effets du stress hydrique sur la hauteur de la plante (A), la longueur de la racine (B), les poids des tiges et des racines (C et D) et le nombre de nodules (E).

Aux doses d'irrigation D2 et D3, la croissance par rapport aux plantes non stressées D1 a été réduite respectivement de 30 et 80% de la hauteur de la plante et de 31 et 72% de la longueur des racines. De même, le poids sec des tiges et des racines a diminué, mais cet effet

négatif était plus prononcé sur les tiges (39 et 75%) que sur les racines (pas de différence significative entre D1 et D2 et 66% entre D1 et D3). Nos résultats confirment que la croissance des tiges est souvent plus affectée par le stress hydrique que les racines car les racines ont une plus grande capacité d'osmorégulation que les tiges (Sarmadnia et Koucheki, 1992; Safarnejad, 2008).

Un nombre réduit de nodules a également été observé après l'application d'un stress hydrique. Des réductions de 54, 79 et 91,62% ont été observées avec les doses D2, D3 et D4 respectivement par rapport à la dose D1.

IV.3.5. Effet de l'inoculation sur la croissance et le rendement

Les souches rhizobiennes réagissent différemment aux conditions environnementales défavorables telles que les températures élevées, le pH bas du sol, la sécheresse et la présence de pesticides, d'antibiotiques et de métaux lourds (Hefny et *al.*, 2001). Les données obtenues ont montré que l'inoculation et son interaction avec les niveaux d'irrigation avaient un effet significatif sur la croissance et le rendement des plantes (tableau 9).

Les réponses des plantes de luzerne étaient clairement différentes selon les souches inoculantes. Nos résultats sont en accord avec ceux de Bradić et *al.* (2003) qui stipulent que l'efficacité symbiotique varie selon les différentes souches de *S. meliloti*. La sévérité du stress induit par les doses D3 et D4 a respectivement provoqué le flétrissement des plantes non inoculées (T) et de celles inoculées avec la souche E222 (dans D3) et les souches E131, E222 et O172 (dans D4). Les plantes inoculées avec Sm2011, O152, Sm1021, O172 et E131 à la dose D3 et Sm2011, O152 et Sm1021 à la dose D4 étaient résistantes.

Tableau 9 : Effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance et de rendement de la luzerne soumise au stress hydrique.

Dose d'irrigation	Souches	Hauteur des tiges (cm)	Poids sec des tiges (g/plante)	Longueur des racines (cm)	Poids sec des racines (g/plant)	Nombre de nodules/plante
	Sm1021	18.667 a	1.170 a	15.611 ab	1.817 a	22.667 ab
	O152	16.278 ab	0.630 ab	16.167 ab	1.440 ab	9.887 bc
	O172	13.722 abc	0.637 ab	17.111 ab	1.170 ab	7.997 c
	Sm2011	14.833 ab	0.597 b	14.722 ab	1.047 ab	14.667 abc
	E131	11.833 bc	0.303 b	21.000 a	0.640 b	25.780 a
	E222	14.389 ab	0.547 b	15.389 ab	0.883 ab	9.110 bc
	T	6.667 c	0.325 b	10.500 b	0.500 b	0.000 c
	P > F	0.003	0.04	0.060	0.008	0.001
D1 (100%)	Significatif	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
	Sm2011	13.000 a	0.567 ab	12.667 a	1.577 a	9.777 a
	O152	13.222 a	0.657 a	12.500 a	1.347 ab	6.887 ab
	O172	13.111 a	0.533 abc	13.333 a	1.310 ab	6.443 ab
	E131	7.222 ab	0.190 cd	13.167 a	0.540 bc	7.777 ab
	Sm1021	6.278 ab	0.273 bcd	7.889 a	0.523 bc	8.447 a
	E222	10.500 ab	0.185 cd	9.583 a	0.520 bc	1.165 ab
	T	2.556 b	0.043 d	7.167 a	0.110 c	0.000 b
	P > F	0.002	0.00	0.024	0.000	0.008
D2 (75%)	Significatif	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
	Sm2011	8.222 a	0.407 a	9.389 a	1.207 a	7.663 a
	O152	6.389 ab	0.370 a	8.056 ab	0.640 ab	8.550 a
	Sm1021	3.444 bc	0.157 b	6.389 ab	0.543 b	2.890 b
	O172	0.722 cd	0.073 b	3.056 bc	0.050 b	0.000 b
	E131	0.333 cd	0.010 b	2.611 bc	0.020 b	0.110 b
	T	0.000 d	0.000 b	0.000 c	0.000 b	0.000 b
	E222	0.000 d	0.000 b	0.000 c	0.000 b	0.000 b
	P > F	< 0.0001	< 0.0001	0.001	< 0.0001	< 0.0001
D3 (50%)	Significatif	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
	Sm2011	2.278 ab	0.100 a	9.056 a	0.500 a	4.000 a
	O152	2.556 a	0.077 b	7.333 ab	0.533 a	2.887 ab
	Sm1021	0.889 bc	0.060 b	6.389 b	0.187 b	0.667 bc
	E131	0.000 c	0.000 c	0.000 c	0.000 c	0.000 c
	E222	0.000 c	0.000 c	0.000 c	0.000 c	0.000 c
	O172	0.000 c	0.000 c	0.000 c	0.000 c	0.000 c
	T	0.000 c	0.000 c	0.000 c	0.000 c	0.000 c
	P > F	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.000
D4 (25%)	Significatif	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui

Pour chaque paramètre, les moyennes dans la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, comme le détermine le test de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher à P = 0,05.

Une différence significative a été observée entre la réponse des six souches par rapport à la hauteur et au poids sec des tiges soumises aux stress hydriques (tableau 9). Les souches Sm2011 et O152 ont augmenté la hauteur des tiges et leur poids sec et ont formé les couples

symbiotiques les plus efficaces par rapport aux autres souches et aux témoins non inoculés et cela à tous les niveaux de stress hydrique.

Les souches rhizobiennes ont affecté de manière significative la longueur et le poids sec des racines sous stress hydrique par rapport aux témoins non inoculés (tableau 9). Les valeurs de longueurs de racines les plus élevées ont été enregistrées chez les plantes inoculées par les souches Sm2011 et O152.

IV.3.6. Effet de l'inoculation sur la nodulation

Les résultats de l'expérience ont révélé que l'inoculation dans des conditions de stress hydrique affectait de manière significative le nombre de nodules chez la luzerne (tableau 9 et figure 21E). Sous stress sévère (D3 et D4), le nombre de nodules le plus élevé a été significativement obtenu avec les souches O152 et Sm2011. Sous contrainte modérée (D2), les souches Sm2011 et Sm1021 présentaient la meilleure nodulation, bien que Sm1021 ne soit pas la souche la plus efficace. Plusieurs auteurs ont souligné l'effet négatif d'un déficit hydrique prolongé et intense sur la nodulation (Bouniols et *al.*, 1985; Athar et Johanson, 1996; Boutraa et Sanders, 2001). Le stress hydrique induit une réduction de l'infection et de la nodulation des légumineuses (Zahran, 1999) et la longévité des nodules (Hungaria et Vargas, 2000). Ainsi, l'assèchement progressif des sols sableux, tels que les sols sahariens, réduit ou élimine complètement les populations bactériennes.

IV.4. Conclusion

Il a été constaté dans cette étude que le déficit en eau réduisait de manière significative la croissance totale et le rendement de la luzerne. Le stress hydrique croissant a progressivement affecté la croissance de la plante, exprimée par la hauteur de la plante, la longueur des racines, le poids sec des racines et des tiges et le nombre de nodules par rapport aux plantes non stressées. L'inoculation avec des souches de *S. meliloti* a amélioré la capacité de la plante à résister à la sécheresse.

Les réponses des plantes de luzerne étaient clairement différentes selon les souches inoculantes. Nos résultats ont également montré que les souches Sm2011 et O152 augmentaient la nodulation et tous les paramètres de croissance étudiés et formaient les meilleurs couples symbiotiques par rapport aux autres souches et cela pour tous les niveaux de stress hydrique.

Chapitre V :

**Amélioration de la croissance de la
luzerne sous stress salin par
inoculation avec des souches locales
du genre *Sinorhizobium*.**

V.1. Introduction

La salinité dans les sols agricoles fait référence à la présence de fortes concentrations de sels solubles autour de la rhizosphère. Ces concentrations de sels solubles, du fait de leurs pressions osmotiques élevées, affectent la croissance des plantes en limitant l'absorption de l'eau et des ions nutritionnels essentiels par les racines (Tester et Davenport, 2003). La salinité est l'un des facteurs limitant la productivité des cultures en général et de celle de luzerne en particulier (Mezni et *al.*, 1999 ; Ibriz et *al.*, 2004), avec des effets néfastes sur la germination, la vigueur et le rendement des cultures (Munns et Tester, 2008).

Lors de l'interaction symbiotique légumineuses-rhizobiums, la nodulation et la fixation de l'azote sont fortement limités par la salinité, ce qui peut nuire au rendement des légumineuses (Mohammad et *al.*, 1991). Selon Paul et Lade (2014), les microorganismes qui vivent en association étroite avec les racines des plantes jouent un rôle important dans la réduction de l'effet du stress sur les cultures dans les sols salins en raison de leurs propriétés uniques de tolérance aux conditions extrêmes, de leur interaction avec les plantes cultivées et de leurs stratégies de résistance déployées.

L'objectif de ce chapitre est l'étude de la croissance et de la nodulation chez une population de luzerne, provenant de la région de Ouargla, inoculée par quatre souches locales de *Sinorhizobium sp.* et deux souches introduites, utilisées comme références, sous trois différentes concentrations de salinité.

V.2. Matériel et méthodes

V.2.1. Souches bactériennes et conditions de croissance

Nous avons pris dans cette étude six souches rhizobiennes. Quatre souches locales (O152, O172, E131 et E222) provenant de Ouargla (Hassi Ben Abdallah) et d'El Oued (Tenedla et El-Meghaier), sélectionnées parmi quarante-huit autres précédemment caractérisées par rapport aux facteurs pédoclimatiques prédominants dans ses régions (pH, température et salinité) et à différents antibiotiques. En outre, elles ont été même caractérisées génétiquement et placées comme souches appartenant aux genres *Sinorhizobium* (tableau 10). Deux souches étroitement apparentées *Sm1021* et *Sm2011* de *Sinorhizobium meliloti*, utilisées comme références et capables de former des nodules fixateurs d'azote chez les plantes hôtes du genre *Medicago* ont également été incluses. Ces deux souches sont les dérivés de l'isolat

type SU47 de *S. meliloti* (Wais et al., 2002). Elles ont été envoyées par Dr Hélène BERGES du centre de génomique des plantes (CNRGV, INRA-France).

Tableau 10 : Codes des souches, plante hôte d'isolement, localisation géographique et type de climat.

Souches	Plante hôte	Site d'échantillonnage	Localisation	Types de climat
E131	<i>M. sativa</i>	Tenedla	Lat. 33°67'58''N Long. 6°03'72''E	Hyperarid
E222	<i>M. sativa</i>	El-Meghaier	Lat. 33°56'25''N Long. 5°92'71''E	Hyperarid
O152	<i>M. sativa</i>	Hassi Ben Abdallah	Lat. 32°00'77''N Long. 5°46'27''E	Hyperarid
O172	<i>M. sativa</i>	Hassi Ben Abdallah	Lat. 32°00'77''N Long. 5°46'27''E	Hyperarid

Les souches bactériennes ont été cultivées à 28°C pendant 72h sur un incubateur agitateur (200 tr / min) dans le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent, 1970).

V.2.2. Matériel végétal

Une population locale de luzerne (*Medicago sativa* L.) originaire de l'oasis de Ouargla, où elle est cultivée depuis plusieurs décennies et est toujours largement utilisée par les agriculteurs locaux, a été choisie pour cette étude.

Les graines ont été stérilisées en surface par immersion dans l'éthanol 95% pendant 10 secondes, puis dans une solution de HgCl₂ acidifiée à 0,1 % pendant 5 à 7 minutes et suivi de six rinçages successifs à l'eau distillée stérile (Somasegaran et Hoben, 1985). Après cela, les graines ont été trempées pendant une nuit dans de l'eau distillée stérile au réfrigérateur à 4 °C.

V.2.3. Substrat de culture

Nous avons utilisé comme substrat de culture un sable qui provient de la zone de Sidi Khouiled (région de Ouargla), appartenant au grand erg oriental, qui avait subi une série d'opérations avant d'être utilisés, selon la méthode indiquée par Djerroudi et al. (2017). Il a été préalablement tamisé pour enlever toutes traces d'impuretés d'origine végétale ou animale puis lavé avec d'Acide Chlorhydrique (HCl) pendant 15 à 20 minutes pour éliminer les

carbonates, les chlorures etc... Ensuite, il a subi une série de lavage successifs à l'eau distillée (5 à 6 fois) afin d'éliminer toute trace de chlorure et mis à sécher à l'air libre. Enfin, Une stérilisation s'en est suivie au four pasteur pendant 2 heures à 180°C.

V.2.4. Plan expérimental

L'étude a été réalisée comme une expérience factorielle basée sur un plan complètement randomisé avec trois répétitions dans une serre semi-contrôlée de la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Ouargla (de février à avril 2017). Les conditions de croissance étaient de 20/25 °C et de 50/60 % d'humidité relative.

Les graines ont été semées dans des pots en plastique de forme carrée, d'un litre de volume et remplis de sable stérile. Six graines ont été semées par pot: deux graines ont été placées dans chacune des 3 petites cavités dans lesquelles 1 ml d'inoculum fraîchement récolté a été ajouté. Des graines non inoculées ont été utilisées comme témoins (T).

Pendant les deux premières semaines, les pots étaient arrosés tous les deux jours avec 100 ml (capacité au champ) de la solution nutritive de Jensen exempte d'azote (Zhao et al., 1997) dont la composition est citée en annexes. Après 15 jours, les plantules ont été éclaircies à trois plantes par pot et un arrosage sous différents niveaux de salinité été appliqué pendant huit semaines. Les trois concentrations de salinité retenues dans cette étude étaient : C0 = 0 mM, C1 = 40 mM/l et C2 = 80 mM/l d'NaCl/litre.

Au total, 63 traitements ont été testés. Le traitement consistait à inoculer ou non les graines de luzerne par une seule souche de *Sinorhizobium sp.* à un seul niveau de dose d'irrigation (N.B. chaque traitement est répété 03 fois).

V.2.5. Mesures de la croissance et de la biomasse des plantes

Les plantes ont été prélevées 10 semaines après le semis. Les plantes 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 trois plantes pour obtenir une moyenne par pot. 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. Selon Wang et al. (2018), les racines et les tiges ont été

séchées séparément à 75 °C dans une étuve pendant 48 h et les poids secs (PS) ont été enregistrés. Les mesures du poids ont été effectuées à l'aide d'une balance électronique.

V.2.6. 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 Fisher à un niveau de probabilité de 5%.

V.3. Résultats et discussion

V.3.1. Croissance et rendement sous stress salin

Le stress salin a eu un effet important sur la croissance et le rendement en biomasse des plantes de luzerne par rapport à la situation sans stress (figure 22). L'augmentation de la concentration en NaCl affecte significativement la croissance exprimée par les hauteurs des tiges et les longueurs des racines, la biomasse végétale exprimée en poids sec des parties aériennes et souterraines et le nombre de nodules formés. L'effet de la salinité sur l'interaction symbiotique inhibe non seulement la formation des nodules, mais entraîne également la réduction de la croissance de la plante hôte (Munns and Tester, 2008 ; Predeepa et *al.*, 2010).

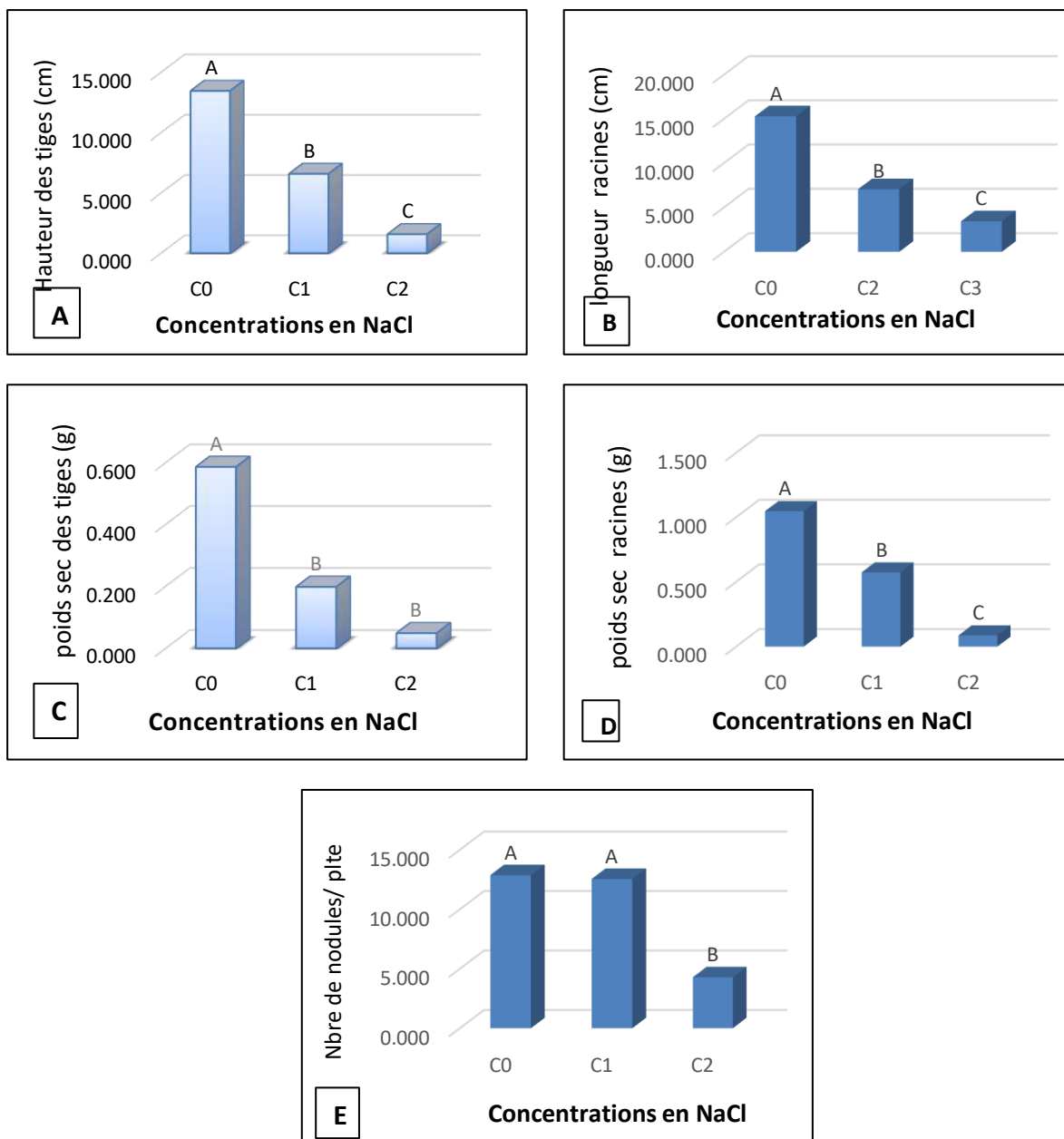


Figure 22: Effets des traitements salins sur A) hauteur des tiges B) longueur des racines C) poids sec des tiges D) poids sec des racines et E) nombre de nodules des plantes de luzerne.

Les effets négatifs de la salinité étaient prononcés de la même manière sur les tiges et sur les racines (tableau 11). Les hauteurs des tiges et longueurs des racines ont été réduites de 51.08 à 83%, 54 à 77.62% respectivement à 40 et 80 mM de NaCl par rapport à la situation témoin sans salinité. Le rendement en matière sèche des tiges et des racines a été réduit respectivement de 66.10 à 91.52% et de 51.04 à 90.62%, à 40 et à 80 mM de NaCl respectivement. Il est à signaler que le nombre de nodules n'a pas été affecté à la concentration C1, alors qu'il été réduit de 66.74% à la concentration C2.

L'effet de la salinité sur les plantes se manifeste par un effet osmotique et/ou ionique (Na^+ et Cl^-) inhibant les différents processus physiologiques et biochimiques qui gouvernent leur croissance et leur développement (Farissi et *al.*, 2011) et peut avoir un effet néfaste sur les populations microbiennes du sol du fait de sa toxicité directe et du stress osmotique qu'il génère (Tate, 1995). La croissance de la majorité des plantes est réduite ou inhibée quand la concentration en sel (NaCl) dans l'environnement racinaire s'élève au-dessus de 100 mM NaCl (Greenway et Munns, 1980). Selon Ibriz et *al.* (2004), in Farissi et *al.* (2014), les populations marocaines de luzerne ont montré que le sel entraîne une réduction des productions de matière sèche aérienne et racinaire dès 70 mM de NaCl . Nos résultats montrent que l'effet de la salinité sur la population de Ouargla est significatif à 40 mM et que les plantes persistent à 80 Mm de NaCl même après deux mois de stress (figure 19 et tableau 11). L'effet principal du stress salin est de réduire la croissance des plantes (Munns, 2002) et le choix de plantes tolérantes au sel, présentant généralement moins de réduction de croissance est un critère à rechercher.

Tableau 11: Effet du stress salin sur la hauteur des tiges, longueur des racines, poids sec des tiges et racines et nombre de nodules.

[NaCl]	Paramètres				
	HT	PST	LR	PSR	NN
C0	13,452 a	0,586 a	15,286 a	1,047 a	12,872 a
C1	6,585 b	0,198 b	7,042 b	0,573 b	12,554 a
C2	1,571 c	0,049 b	3,427 c	0,087 c	4,284 b
Pr > F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
Significatif	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui

Pour chaque paramètre, les moyennes dans la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, comme le détermine le test de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher à $P = 0,05$.

Bertrand et *al.* (2015) ont rapporté que la croissance des racines était moins affectée par le NaCl que la croissance des tiges bien que les racines soient directement exposées au stress salin. Cette diminution de croissance peut être attribuée à l'accumulation d'ions toxiques tels que le sodium et le chlore dans les tissus végétaux, où ils peuvent perturber les activités enzymatiques (Bordeleau et Prévost, 1994).

Le tableau 11 montre qu'à 40 mM de NaCl , le nombre de nodules produit n'a pas été affecté montrant des différences non significatives avec la condition 0 mM d' NaCl . A 80 mM, la nodulation était réduite de 67%. De nombreuses études ont montré que la salinité du sol

diminuait la colonisation et la nodulation des plantes et réduisait considérablement la fixation de N₂ et l'activité nitrogénase des légumineuses nodulées (Elsheikh et Wood, 1995; Zahran, 1999), ce qui se répercute directement sur la croissance des populations de *Medicago*. Parmi les autres effets de la salinité sur la nodulation figurent la formation de nodules non fonctionnels à structure anormale et la dégradation de la membrane pér bactéroidienne (Bolanos et al., 2003), le chimiotactisme bactérien, la colonisation, le recourbement des racines (Tu, 1981) et leur déformation (Singleton et al., 1982). La réduction de la respiration nodulaire (Delgado et al. 1994), la teneur en leghémoglobine (Delgado et al., 1993) et une activité altérée de fixation de l'azote (Bordeleau et Prévost, 1994) ont également été observés en tant qu'effets indésirables du sel.

V.3.2. Effet de l'inoculation sur la croissance et le rendement

Les résultats de l'analyse de la variance montrent l'effet significatif du stress salin sur les paramètres de croissance des plantes luzerne inoculée avec des souches rhizobiennes (tableau 12).

Les effets du traitement salin et de l'inoculation sur les paramètres étudiés étaient clairement significatifs. Comme nous l'avons noté précédemment, l'augmentation de la concentration saline influe négativement sur les paramètres de croissance et de rendement des plantes de luzerne. Cependant, les réponses des plantes, face à la salinité, étaient clairement différentes selon les souches inoculantes.

Tableau 12: Réponses de la luzerne cultivée à l'inoculation par six souches rhizobiennes sous différentes conditions de salinité.

Salinité	Souches	HT (cm)	PST (g)	LR (cm)	PSR (g)	NN/plante
	Sm1021	18,667 a	1,170 a	15,611 ab	1,817 a	22,667 ab
	O152	16,278 a	0,630 ab	16,167 ab	1,440 ab	9,887 bcd
	O172	13,722 a	0,637 ab	17,111 ab	1,170 abc	7,997 cd
	Sm2011	14,833 a	0,597 b	14,721 ab	1,047 abc	14,667 abc
	E131	11,833 ab	0,303 b	21,000 a	0,640 bc	25,780 a
	E222	14,389 a	0,547 b	15,389 ab	0,883 abc	9,110 cd
	T0	4,444 b	0,217 b	7,000 b	0,333 c	0,000 d
	Pr > F	0,001	0,002	0,016	0,003	0,000
C0 (0 mM)	Significatif	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
	Sm2011	15,043 a	0,407 a	9,720 a	1,193 a	23,110 a
	E131	7,220 bcd	0,333 ab	10,387 a	0,930 ab	21,107 a
	O172	8,323 abc	0,280 abc	9,110 a	0,857 ab	11,330 ab
	Sm1021	8,533 ab	0,197 abc	6,860 ab	0,453 abc	6,667 ab
	O152	6,253 bcd	0,139 abc	9,053 a	0,323 bc	13,220 ab
	E222	0,720 cd	0,028 bc	4,167 ab	0,256 bc	12,443 ab
	T1	0,000 d	0,000 c	0,000 b	0,000 c	0,000 b
	Pr > F	0,000	0,003	0,005	0,003	0,022
C1 (40mM)	Significatif	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
	O172	4,643 a	0,563 ab	0,127 a	0,750 a	8,883 a
	Sm2011	3,000 a	0,797 a	0,110 a	0,577 a	4,000 c
	Sm1021	3,037 a	0,360 bc	0,100 a	0,373 ab	8,933 a
	E131	2,443 ab	0,310 bc	0,083 a	0,410 a	7,220 ab
	O152	2,163 ab	0,213 bc	0,063 ab	0,363 ab	6,540 b
	T2	0,000 b	0,000 c	0,000 b	0,000 b	0,000 d
	E222	0,000 b	0,000 c	0,000 b	0,000 b	0,000 d
	Pr > F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
C2 (80mM)	Significatif	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui

Pour chaque paramètre, les moyennes dans la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, comme le détermine le test de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher à P = 0,05.

A la concentration C0, l'inoculation avec la souche référence *Sm1021* a donné les meilleurs résultats symbiotiques, suivie par les souches O152, O172 et *Sm2011* respectivement. La hauteur des tiges, longueur des racines, poids secs des tiges et racines étaient améliorés de 76, 55.11, 81 et 81.60 % respectivement par rapport au témoin T0 sans inoculation.

Aux concentrations C1 et C2, les résultats montrent que l'inoculation contribue significativement à l'amélioration des paramètres étudiés par rapports aux témoins T1 et T2

sans inoculation, sauf dans le cas de la souche E222 à la concentration C2 où les plantes de cette condition étaient mortes. Les souches *Sm2011*, E131, O172 et *Sm1021* étaient les plus efficaces à la concentration C1 et les souches O172, *Sm2011*, *Sm1021* et E131 le sont à la concentration C2. La souche E222 était la moins efficace dans toutes les conditions de l'étude.

Le succès des symbioses rhizobium-légumineuses sous le stress salin nécessite la sélection de rhizobiums indigènes tolérants, isolés des sols salins (Zahran, 1991). Selon El-Mokadem *et al.* (1991) et Bertrand *et al.* (2011), les rhizobiums tolérants au sel pourraient potentiellement garder un niveau élevé de fixation de l'azote et d'améliorer le rendement des légumineuses soumises à un stress salin. Il a été suggéré, par Mohammad *et al.* (1989), que les plantes de *M. sativa* tolérantes au stress salin présentaient une plus grande tolérance à la sécheresse lorsqu'elles étaient inoculées avec une souche de *S. meliloti* tolérante au stress salin. L'un des modes d'action de la souche *Rm1521* (souches nodulant la luzerne) pourrait être lié à sa force de rétention pour les solutés, comme le montre l'accumulation plus importante de glucides dans les nodules des plantes inoculées avec cette souche (Bertrand *et al.*, 2015).

Il est connu que les sucres solubles jouent un rôle dans la protection des membranes et des enzymes contre le stress (Hare *et al.*, 1998; Kaplan et Guy, 2004). Par exemple, une augmentation des concentrations de pinitol a été observée dans les racines (Fougère *et al.*, 1991) ainsi que dans les feuilles de luzerne soumise au stress salin (Aranjuelo *et al.*, 2011).

V.3.3. Effet de l'inoculation sur la nodulation

La nodulation des plantes a montré des différences significatives en réponses à l'inoculation avec les six souches rhizobiennes, sous les trois niveaux de salinité (tableau 12). A la concentration C0, la souche E131 a contribué à la formation du plus grand nombre de nodules, suivie par *Sm1021*, O172 et 152 respectivement. A la concentration C1, la souche *Sm1021* semblait être affectée par la salinité, alors que la souche E131 a gardé son pouvoir nodulant. Il semble que les souches *Sm1021* et O172 soient des microsymbiotes hautement compétitifs à la forte salinité C2, avec une augmentation de la nodulation de l'ordre de 19 à 100% par rapport aux autres souches. Il est à signaler que les témoins T0, T1 et T2 n'ont pas formé de nodules.

La formation de nodules est un paramètre essentiel dans une relation symbiotique efficiente et leur présence est souvent le signe d'une compatibilité entre une variété de légumineuse et la souche de bactérie en présence. Leur absence ou insuffisance annule ou réduit le processus de fixation biologique de l'azote (Aboubacar et *al.*, 2013). Ainsi, l'inoculation augmente la biomasse de nodules et encourage une agriculture durable respectueuse de l'environnement en répondant parfaitement à la fixation biologique de l'azote (Adewusi et *al.*, 2008).

V.4. Conclusion

Nous avons constaté dans cette étude que la salinité affecte négativement la croissance et le rendement de la luzerne cultivée. Les souches rhizobiennes utilisées affectent différemment la capacité de la plante à résister à la salinité. En condition non saline, les souches *Sm1021* et *0152* se sont montrées très efficaces avec la plante hôte et contribuent à de meilleurs résultats symbiotiques. La souche *0172*, halotolérante *in vitro*, l'a confirmé aussi *in vivo* et a fourni aux plantes de luzerne des avantages majeurs leur permettant de résister à un stress important dû au NaCl. L'utilisation de souches tolérantes dans les sols salés, tels que les sols des régions d'étude, ouvre ainsi une stratégie potentielle et prometteuse en agriculture durable et permet de maintenir la productivité des légumineuses dans des conditions difficiles.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Le développement de nouveaux systèmes de production agricole qui renforcent l'utilisation des ressources naturelles écologiquement non polluants et qui permettent de réduire l'usage d'engrais notamment riches en azote a permis de concentrer l'attention sur le rôle potentiel de la fixation biologique de l'azote. En effet, durant les dernières décennies, la reconnaissance de l'importance de la symbiose rhizobia-légumineuse a joué un rôle considérable dans l'accroissement du rendement des légumineuses cultivées, dans l'amélioration de la fertilité du sol et dans la réhabilitation des sols appauvris.

Les travaux menés au cours de cette thèse sur l'étude de la symbiose entre une population locale de luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) et son partenaire rhizobien, provenant de trois régions du Sahara septentrional est-algérien, nous ont permis d'évaluer la biodiversité des microsymbiotes en vue d'établir leur position taxonomique et d'en tester l'efficacité de certaines souches pour l'inoculation de la luzerne en vue d'améliorer sa croissance sous contraintes abiotiques. Jusqu'à nos jours, aucune étude précise n'a été menée pour étudier la diversité des bactéries symbiotiques de luzerne au sud algérien et moins encore son inoculation. Il a été donc crucial pour nous de pouvoir caractériser les souches indigènes sur des bases précises et selon les normes internationales.

A cet effet, des campagnes de prospection et de collecte d'échantillons de sol, ayant comme précédent cultural la luzerne, et de plantes nodulées de luzerne ont été menées pendant la période du printemps des années 2013 et 2014 à travers 15 zones relevant des régions de Ouargla, d'El Oued et de Ghardaïa. Une collection de 121 isolats effectifs ont été authentifiés après inoculation des plantules de luzerne dans des tubes Gibson. Les isolats obtenus avaient une croissance rapide et l'aspect des colonies formées concorde avec celui des rhizobia déjà décrites dans la littérature.

La caractérisation des souches face aux contraintes abiotiques et biotique, réalisée au laboratoire, a montré une diversité de réponses. Face à la salinité, elles présentaient un large spectre de tolérance allant de 1,7 mM (0.1 g/l) à 640 mM (37.4 g/l). Elles se montraient affectées par les pH trop acides où elles enregistrent des taux de croissance de 32.43% et de 81.63% aux pH 4 et 5 respectivement. Aux pH peu acide, neutre et alcalins, nous avons observé 100% de croissance. En général, toutes les souches ont présenté une bonne croissance à 28 °C et 37 °C et aux températures extrêmes de 4 et 45 °C, il était observé qu'un nombre

réduit de souches était capable de croître. Les souches testées aux différents types d'antibiotiques étaient visiblement différentes et présentaient des profils de résistance différents. Les profils de résistance trouvés ont permis d'établir une taxonomie numérique. Cette dernière a placé les souches provenant de Ouargla et d'El Oued dans une classe et celles de la région de Ghardaïa dans une autre. Les deux souches de références *Sm1021* et *Sm2011* sont classées dans une classe à part, plutôt proche de celle de Ghardaïa que de l'autre.

L'évaluation de la position taxonomique des différentes souches de la collection était réalisée par l'étude de la diversité génétique et la phylogénie de deux gènes de ménage (*recA* et *glnII*) et un gène symbiotique (*nodC*). La présente étude a fourni la première analyse de la diversité phylogénétique des rhizobia autochtones nodulant la luzerne dans la région d'étude. Les informations générées à partir des séquences de gènes de ménages combinés (*recA* et *glnII*) ont clairement montré que les souches de la collection étaient toutes affiliées au genre *Sinorhizobium*. L'analyse phylogénétique a montré l'existence de deux groupes distincts où les souches du premier groupe, d'origine de Ghardaïa, appartiennent aux espèces *S. meliloti* et *S. kummerowiae* avec des taux de similarité des similarités des gènes *recA* et *glnII* allant de 98%–100% et 97%–99% avec la souche type *S. meliloti* USDA1002^T et 98%-99% et 98-100% avec la souche type *S. kummerowiae* CCBAU71714^T respectivement. Les souches composant le groupe II, originaires de Ouargla et d'El Oued, ont été séparées des souches de référence et suggèrent que celles-ci pourraient représenter une lignée différente des espèces déjà définies. Les résultats des regroupements des souches étaient généralement similaires à ceux des arbres de gènes individuels. La phylogénie des gènes chromosomiques était différente de celle du gène symbiotique *nodC*. La classification résultant de l'analyse du gène *nodC* reflète la spécificité d'hôte, tandis que la phylogénie basée sur les gènes chromosomiques est indépendante de la plante hôte.

Les résultats de la caractérisation phénotypique sont fortement similaires à ceux de la caractérisation phylogénétique. Toutes les deux classent les souches provenant de la région de Ghardaïa à côté des espèces déjà décrites telles que *S. kummerowiae* et *S. meliloti*, et qui sont complètement séparées de celles des régions de Ouargla et d'El Oued qui peuvent représenter une lignée distincte.

Il a été constaté dans cette étude que le déficit en eau réduisait de manière significative la croissance totale et le rendement de la luzerne. Le stress hydrique croissant a progressivement affecté la croissance de la plante, exprimée par la hauteur de la plante, la

longueur des racines, le poids sec des racines et des tiges et le nombre de nodules par rapport aux plantes non stressées. L'inoculation avec des souches de *Sinorhizobium* a amélioré la capacité de la plante à résister à la sécheresse. Les réponses des plantes de luzerne étaient clairement différentes selon les souches inoculantes. Nos résultats ont également montré que les souches Sm2011 et O152 augmentaient la nodulation et tous les autres paramètres de croissance étudiés et formaient les meilleurs couples symbiotiques par rapport aux autres souches et cela pour tous les niveaux de stress hydrique.

Comme pour le stress hydrique, la salinité a affecté significativement la croissance et le rendement de la luzerne. Les souches rhizobiennes inoculantes ont affecté différemment la capacité de la plante à résister à la salinité. En condition non saline, les souches Sm1021 et O152 se sont montrées très efficaces avec la plante hôte et contribuent à de meilleurs résultats symbiotiques. La souche O172, halotolérante *in vitro*, l'a confirmé aussi *in vivo* et a fourni aux plantes des avantages majeurs leur ont permis de résister au stress important de 80 mM de NaCl. L'utilisation de souches tolérantes dans les sols salés, tels que les sols des régions d'étude, ouvre ainsi une stratégie potentielle et prometteuse en agriculture durable et permet de maintenir la productivité des légumineuses dans des conditions difficiles.

Au terme de cette thèse, nous avons obtenu une masse importante d'informations sur la diversité génétique et phénotypique des souches rhizobiennes locales nodulant *M. sativa* et sur l'utilisation de celles-ci comme inoculants efficaces pour l'amélioration des rendements fourragers dans un contexte saharien marqué par des contraintes pédoclimatiques majeures.

Dans une perspective future, il serait intéressant de poursuivre ce travail par :

- L'élargissement de notre champ d'investigation sur d'autres sites potentiels pouvant héberger des souches intéressantes ;
- L'utilisation davantage de caractères phénotypiques afin de mieux montrer les caractéristiques distinctes des souches ;
- La détermination du statut taxonomique exacte des souches de la collection étudiées par d'autres techniques moléculaires, en l'occurrence le séquençage du gène *ADNr* 16S ainsi que d'autres gènes de ménage ;

- La réalisation d'essais d'inoculation *in situ* par des souches ayant prouvées leur efficacité *ex situ*, permettant d'accroître la production de la luzerne dans les régions arides du pays.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aarons, S. R., & Graham, P. H. (1991). Response of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity. *Plant and Soil*, 134(1), 145–151. <https://doi.org/10.1007/bf00010727>
- Abdel Wahab, M. A., & Zahran, H. H. (1981). Effects of salt stress on nitrogenase activity and growth of four legumes. *Biologia Plantarum*, 23(1), 16-23. <https://doi.org/10.1007/BF02909205>
- Abo Hasani, M., Lakazian, A., Tajabadipour, A., & Haghnia, G. (2010). The study salt and drought tolerance of *Sinorhizobium* bacteria to the adaptation to alkaline conditions. *Australian J. of Basic and Applied Science*, 4(5), 882-886.
- Aboubacar, K., Ousmane, Z., Amadou, H., Issaka, S., & Zouberou, A. (2014). Effet de la co-inoculation du rhizobium et de mycorhizes sur les performances agronomiques du niébé [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] au Niger. *Journal of Applied Biosciences*, 72(1), 5846. <https://doi.org/10.4314/jab.v72i1.99672>
- Adewusi, H.G., Bada,S.O., Ladipo, D.O., & Husain, T. (2008). Nodulation in *Milletia thonningii* (Schum & Thonn.) Baker; native Rhizobia and seed interaction from southwest Nigeria. *Pak. J. Bot.*, 40(5): 2237-2242.
- Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 705. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
- Antolín, M., Yoller, J., & Sánchez-Díaz, M. (1995). Effects of temporary drought on nitrate-fed and nitrogen-fixing alfalfa plants. *Plant Science*,107(2), 159–165. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04108-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04108-7)
- Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Avice, J. C., & Nogués, S. (2010). Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 111-123. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq249>
- Ashraf, M., Athar, H. R., Harris, P., & Kwon, T. R. (2008). Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 97, pp. 45-110). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(07\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(07)00002-8)
- Athar, M., & Johnson, D. A. (1996). Influence of drought on competition between selected *Rhizobium meliloti* strains and naturalized soil rhizobia in alfalfa. *Plant and Soil*, 184(2), 231–241. <https://doi.org/10.1007/bf00010452>
- Aubert, G. (1978). Méthodes d'analyses des sols. 2^{ème} Edition, Centre Régional de Documentation Pédagogique, CRDP Marseille, 191p.
- 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. *Ponte Journal*, 75(7), 35-43. <http://dx.doi.org/10.21506/j.ponte.2019.7.4>

- Baba Arbi, S., Chekireb, D., Quatrini, P., Catania, V., Cheriet, D., & Ouarts, A. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of root nodules rhizobia of *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All. growing in the Oasis of Touggourt, Oued Righ Valley, in the Algerian Sahara. *Symbiosis*, 66(2), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0336-0>
- Basigalup, D., Irwin, J., Fugui Mi, F., & Abdelguerfi-Laouar, M. (2014). Perspectives of alfalfa in Australia, China, Africa and Latin America. *Legume Perspect.* 4: 9–10.
- Bass, L. N., Gunn, C. R., Hesterman, O. B., and Roos, E. E. (1988). Seed physiology, seedling performance and seed sprouting, 961–984. in Hanson, A. A., Barnes, D. K., and Hill, R. R. Jr., eds. *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Madison, Wisconsin American Society of Agronomy.
- Bayoumi, H.E., Bíró, B., Balázsy, S., & Kecskés, M. (1995). Effect of some environmental factors on *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 42(1):61-9.
- Bazzine, M., & Hamdi Aissa, B., 2014. - Etude des croûtes biologiques de quelques sols gypseux et salins du milieu saharien: cas de la cuvette de Ouargla (Sahara septentrional est algérien). *Algerian journal of arid environment.* 4(1), Juin 2014. 45-52.
- Beck, D.P., Materon, L.A., & Afandi, F. (1993). Practical Rhizobium legume technology manual, Technical Manual No: 19. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria, pp. 1-54.
- Bekere, W., Kebede, T., & Dawud, J. (2013). Growth and nodulation response of soybean (*Glycine max* L.) to lime, *Bradyrhizobium japonicum* and nitrogen fertilizer in acid soil at Melko, South Western Ethiopia. *Int J Soil Sci* 8:25–31. <https://doi:10.3923/ijss.2013.25.31>
- Bélangier, G., Castonguay, Y., & Lajeunesse, J. (2014). Benefits of mixing timothy with alfalfa for forage yield, nutritive value, and weed suppression in northern environments. *Canadian Journal of Plant Science*, 94(1), 51-60. <https://doi.org/10.4141/cjps2013-228>
- Bena, G. (2001). Molecular phylogeny supports the morphologically based taxonomic transfer of the « medicagoid » *Trigonella* species to the genus *Medicago* L. *Plant Systematics and Evolution*, 229(3-4), 217-236. <https://doi.org/10.1007/s006060170012>
- Bena, G., LYET, A., Huguet, T., & Olivieri, I. (2005). *Medicago* - *Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(6), 1547-1558. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00952.x>
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., & Falkowski, P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology*, 154(3), 157-164. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00029-9)
- Bernard, T., Pocard, J.-A., Perroud, B., & Le Rudulier, D. (1986). Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines. *Archives of Microbiology*, 143(4), 359-364. <https://doi.org/10.1007/BF00412803>

- Bertrand, A., Dhont, C., Bipfubusa, M., Chalifour, F.-P., Drouin, P., & Beauchamp, C. J. (2015). Improving salt stress responses of the symbiosis in alfalfa using salt-tolerant cultivar and rhizobial strain. *Applied Soil Ecology*, 87, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.11.008>
- Bertrand, A., Prévost, D., Juge, C., & Chalifour, F.-P. (2011). Impact of elevated CO₂ on carbohydrate and ureide concentrations in soybean inoculated with different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Botany*, 89(7), 481-490. <https://doi.org/10.1139/b11-034>
- Bhargava, S., & Sawant, K. (2012). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, 132(1), 21–32. <https://doi.org/10.1111/pbr.12004>
- Bhargava, Y., Murthy, J. S. R., Kumar, T. V. R., & Rao, M. N. (2016). Phenotypic, Stress Tolerance and Plant Growth Promoting Characteristics of Rhizobial Isolates from Selected Wild Legumes of Semiarid Region, Tirupati, India. *Advances in Microbiology*, 06(01), 1–12. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.61001>
- Biazzi, E., Nazzicari, N., Pecetti, L., Brummer, E. C., Palmonari, A., Tava, A., & Annicchiarico, P. (2017). Genome-Wide Association Mapping and Genomic Selection for Alfalfa (*Medicago sativa*) Forage Quality Traits. *PLOS ONE*, 12(1), e0169234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169234>
- Biondi, E. G., Pilli, E., Giuntini, E., Roumiantseva, M. L., Andronov, E. E., Onichtchouk, O. P., . . . Bazzicalupo, M. (2003). Genetic relationship of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* strains isolated from Caucasian region. *FEMS Microbiology Letters*, 220(2), 207–213. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(03\)00098-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00098-3)
- Blanquet, P., Silva, L., Catrice, O., Bruand, C., Carvalho, H., & Meilhoc, E. (2015). *Sinorhizobium meliloti* Controls Nitric Oxide-Mediated Post-Translational Modification of a *Medicago truncatula* Nodule Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(12), 1353-1363. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-15-0118-R>
- Bolaños, L., El-Hamdaoui, A., & Bonilla, I. (2003). Recovery of development and functionality of nodules and plant growth in salt-stressed *Pisum sativum* - *Rhizobium leguminosarum* symbiosis by boron and calcium. *Journal of Plant Physiology*, 160(12), 1493-1497. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01003>
- Bordeleau, L. M., & Prévost, D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil*, 161(1), 115–125. <https://doi.org/10.1007/bf02183092>
- Boscari, A., Mandon, K., Dupont, L., Poggi, M., & Le Rudulier, D. (2002). BetS Is a Major Glycine Betaine/Proline Betaine Transporter Required for Early Osmotic Adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 184(10), 2654–2663. <https://doi.org/10.1128/jb.184.10.2654-2663.2002>
- Bouniols, A., Puech, J., Chalamet, A., & Mondies, M. (1985). Influence des conditions d'alimentation hydrique ou (et) azotée à différents stades du développement sur la production de grains et la nutrition azotée du soja. *Eurosoya* (3), 53-61. <https://prodinra.inra.fr/record/83817>

- Boutraa, T., & Sanders, F. E. (2001). Effects of interactions of moisture regime and nutrient addition on nodulation and carbon partitioning in two cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 186(4), 229–237. <https://doi.org/10.1046/j.1439-037x.2001.00474.x>
- Bowen, G.D., & Kennedy, M.M. (1959). Effect of high soil temperatures on *Rhizobium spp.* *Queensl J Agr Sci*, 16, 177–197.
- Boyer, J. S. (1982). Plant Productivity and Environment. *Science*, 218(4571), 443–448. <https://doi.org/10.1126/science.218.4571.443>
- Bradić, M., Sikora, S., Redzepovic, S., & Stafa, Z. (2013). Genetic Identification and Symbiotic Efficiency of an Indigenous *Sinorhizobium meliloti* Field Population. *Food Technol. Biotech.*, 41(1): 69-75.
- Brink, G. E., Sanderson, M. A., & Casler, M. D. (2015). Grass and Legume Effects on Nutritive Value of Complex Forage Mixtures. *Crop Science*, 55(3), 1329. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.09.0666>
- Brockwell, J., Pilka, A., & Holliday, R. (1991). Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 31(2), 211. <https://doi.org/10.1071/ea9910211>
- Brockwell, John, Bottomley, P. J., & Thies, J. E. (1995). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. *Plant and Soil*, 174(1-2), 143-180. <https://doi.org/10.1007/BF00032245>
- Brooks, S.J., Collins, J.J., & Brill, W.J. (1984). Repression of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* at high temperature. *J Bacteriol*, 157, 460–464.
- Bryan, N. S., & Van Grinsven, H. (2013). The Role of Nitrate in Human Health. *Advances in Agronomy*, , 153–182. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407247-3.00003-2>
- Cacciari, I., Di Mattia, E., Quatrini, P., Moscatelli, M. C., Grego, S., Lippi, D., & De Paolis, M. R. (2013). Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress. In : *Un arbre au désert*. Éd IRD, 183-200.
- Calvet, R. (2003). *Le sol propriété et fonction - Tome 2*. France: Editions France Agricole, 511p.
- Campillo R., R., Urquiaga C., S., Pino N., I., & Montenegro B., A. (2003). ESTIMACIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS FORRAJERAS MEDIANTE LA METODOLOGÍA DEL 15N. *Agricultura Técnica*, 63(2). <https://doi.org/10.4067/S0365-28072003000200006>
- Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. (2010). The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science*, 330(6001), 192–196. <https://doi.org/10.1126/science.1186120>

- Carelli, M., Gnocchi, S., Fancelli, S., Mengoni, A., Paffetti, D., Scotti, C., & Bazzicalupo, M. (2000). Genetic Diversity and Dynamics of *Sinorhizobium meliloti* Populations Nodulating Different Alfalfa Cultivars in Italian Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 4785-4789. <https://doi.org/10.1128/aem.66.11.4785-4789.2000>
- Carlsson, G., & Huss-Danell, K. (2003). Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant and Soil*, 253(2), 353-372. <https://doi.org/10.1023/A:1024847017371>
- Carter, J.M., Gardner, W.K., Gibson, A.H. (1994). Improved growth and yield of *Faba beans* (*Vicia faba* cv. Fiord) by inoculation with strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in acid soils in south-west Victoria. *Australian Journal Agricultural Research*, 45:613-623.
- Carter, P. R., & Sheaffer, C. C. (1983). Alfalfa Response to Soil Water Deficits. II. Plant Water Potential, Leaf Conductance, and Canopy Temperature Relationships. *Crop Science*, 23(4), 676. <https://doi.org/10.2135/cropsci1983.0011183x002300040017x>
- Castroluna, A., Ruiz, O.M., & Quiroga A.M. (2014). Effects of salinity and drought stress on germination, biomass and growth in three varieties of *Medicago sativa* L. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 18, 39–50
- Chaabena, A., Laouar, M., Boudebous, I., Cahouki, I., Bentebba, F., Madani, H., & Abdelguerfi, A. (2012). Behaviour of some alfalfa populations from algerian oasis. In : Acar Z. (ed.), López-Francos, A. (ed.), Porqueddu, C. (ed.). *New approaches for grassland research in a context of climate and socioeconomic changes*. Zaragoza : CIHEAM. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 102, 191-196
- Chaïch, K., Bekki, A., Bouras, N., Holtz, M. D., Soussou, S., Mauré, L., . . . Cleyet-Marel, J. (2016). Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. *Symbiosis*, 71(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0414-y>
- Chao, Y., Kang, J., Sun, Y., Yang, Q., Wang, P., Wu, M., Li, Y., Long, R., & Qin, Z. (2009). Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding zinc finger protein from *Medicago sativa* L. *Molecular Biology Reports*, 36(8), 2315–2321. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9450-5>
- Chaouch, S. (2018). Dynamique de l'espace agricole et mutations dans le Sahara algérien, cas de la région de Ouargla (le pays d'Oued M'ya). *Revue des BioRessources*, 8(1), 111 – 123.
- Cheloufi, H. (1991). Etude du devenir de fertilisants azotés minéraux dans quatre types de sols lorrains : conséquences agronomiques et écologiques. Thèse de Doctorat de l'INPL, Nancy, 150 p.
- Cheloufi, H., Longa, N., Florentin, L., & Morlot, M. (1990). Contribution à l'étude de l'influence des agrosystèmes et d'un apport de fertilisant azoté sur la qualité des eaux potables. Cas des eaux de captage de la commune de LOISY, MEURTHE et MOSELLE. *C. R. Acad. Agri.Fr.*, 76 (5), 145-154.

- Chen, H., Gartner, E., & Rolfe, B. G. (1993). Involvement of Genes on a Megaplasmid in the Acid-Tolerant Phenotype of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Trifolii*. *Field Crops Research*, 59(4), 1058–1066.
- Chen, H., Richardson, A. E., & Rolfe, B. G. (1993). Studies of the Physiological and Genetic Basis of Acid Tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl Environ Microbiol.*, 59(6), 1798–1804.
- Chen, W. F., Guan, S. H., Zhao, C. T., Yan, X. R., Man, C. X., Wang, E. T., & Chen, W. X. (2008). Different *Mesorhizobium* species associated with *Caragana* carry similar symbiotic genes and have common host ranges. *FEMS Microbiology Letters*, 283(2), 203–209. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01167.x>
- Chen, W. X., Yan, G. H. & Li, J. L. (1988). Numerical Taxonomic Study of Fast-Growing Soybean Rhizobia and a Proposal that *Rhizobium fredii* Be Assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 38, 392–397.
- Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X., & Li, Y. (1995). Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a Moderately and Slowly Growing Root Nodule Bacterium Isolated from an Arid Saline Environment in Xinjiang, People's Republic of China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 153–159. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-153>
- Cheng, Q. (2008). Perspectives in Biological Nitrogen Fixation Research. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7), 786-798. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00700.x>
- Chianu, Jonas. N., Nkonya, E. M., Mairura, F. S., Chianu, Justina. N., & Akinnifesi, F. K. (2011). Biological nitrogen fixation and socioeconomic factors for legume production in sub-Saharan Africa: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(1), 139-154. <https://doi.org/10.1051/agro/2010004>
- Cohen, P. A. (2001). Introduction: Politics, Myth, and the Real Past. *Twentieth-Century China*, 26(2), 1-15. <https://doi.org/10.1179/tcc.2001.26.2.1>
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J., & Udvardi, M.K. (2004). Global changes in transcription orchestrate , J., metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, 39(4), 487-512. , <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02150.x>
- Correa, O., & Barneix, A. (1997). Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(2), 153-157. <https://doi.org/10.1023/a:1018577411631>
- de Lajudie, P. M., & Young, J. P. W. (2017). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee for the Taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium* Minutes of the meeting, Budapest, 25 August 2016. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(7), 2485-2494. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002144>
- de Lajudie, P. M., Andrews, M., Ardley, J., Eardly, B., Jumas-Bilak, E., Kuzmanović, N., ... Young, P. (2019). Minimal standards for the description of new genera and species of

- rhizobia and agrobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(7), 1852-1863. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003426>
- de Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., ... Gillis, M. (1994). Polyphasic Taxonomy of Rhizobia: Emendation of the Genus *Sinorhizobium* and Description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 715-733. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-715>
- De Meyer, S. E., Van Hoorde, K., Vekeman, B., Braeckman, T., & Willems, A. (2011). Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 43(12), 2384-2396. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.08.005>
- Del Papa, M.F., Balague L.J., Sowinski, S.C., Wegener, C., Segundo, E., Abarca, F.M., Toro, N., Niehaus, K., Pühler, A., Aguilar, O.M., Martinez-Drets, G., & Lagares, A. (1999). Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Appl Environ Microbiol*, 65(4), 1420-1427.
- Delgado, M. J., Garrido, J. M., Ligeró, F., & Lluch, C. (1993). Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum*, 89(4), 824-829. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb05291.x>
- Delgado, M. J., Ligeró, F., & Lluch, C. (1994). Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba bean, common bean and soybean plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(3), 371-376. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90286-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90286-0)
- Dénarié, J., Debelle, F., & Promé, J.-C. (1996). Rhizobium Lipo-Chitoooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 503-535. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002443>
- Dilworth, M. J., Howieson, J. G., Reeve, W. G., Tiwari, R. P., & Glenn, A. R. (2001). Acid tolerance in legume root nodule bacteria and selecting for it. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41(3), 435. <https://doi.org/10.1071/EA99155>
- Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 621-631. <https://doi.org/10.1038/nrmicro954>
- Djerroudi, O. (2017). Caractérisation Morpho-Physiologique d'une Halophyte, *Atriplex*, aux Conditions Arides. Thèse de Doctorat Es Sciences, Université d'Oran. <https://theses.univ-oran1.dz/document/13201703t.pdf>
- Dominguez-Ferreras, A., Soto, M. J., Perez-Arnedo, R., Olivares, J., & Sanjuan, J. (2009). Importance of Trehalose Biosynthesis for *Sinorhizobium meliloti* Osmotolerance and Nodulation of Alfalfa Roots. *Journal of Bacteriology*, 191(24), 7490-7499. <https://doi.org/10.1128/JB.00725-09>
- Dommergues, Y., Duhaux, E., & Hoang, G.D., (1999). Les arbres fixateurs d'azote: Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens

- et tropicaux avec référence particulière aux zones subhumides et arides. Édition espaces 34. Paris. 523 p. ISBN 2-907293-57-5
- Dong, R., Zhang, J., Huan, H., Bai, C., Chen, Z., & Liu, G. (2017). High salt tolerance of a *Bradyrhizobium* strain and its promotion of the growth of *Stylosanthes guianensis*. *Int. J. Mol. Sci.* 18 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms18081625>
- Downie, J. A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 150-170. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x>
- El Hilali, I. (2006). La Symbiose Rhizobium – Lupin : Biodiversité des Microsymbiotes et Mise en Evidence d’une Multi-Infection Nodulaire chez *Lupinus luteus*. Faculté des Sciences Agdal, thèse de Doctorat : Rabat, Maroc, 205 p.
- Elboutahiri, N., Thami-Alami, I., & Udupa, S. M. (2010). Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiology*, 10(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-15>
- El-Mokadem, M. T., Helemish, F. A., Abdel-Wahab, S. M., Abou-El-Nour, M. M.. (1991). Salt response of clover and alfalfa inoculated with salt tolerant strains of *Rhizobium*. *Ain Shams Sci. Bull*, 28B:441–468.
- Elsheikh, E. A. E., & Wood, M. (1995). Nodulation and N₂ fixation by soybean inoculated with salt-tolerant rhizobia or salt-sensitive bradyrhizobia in saline soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4-5), 657-661. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)98645-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)98645-5)
- Elsheikh, E., & Wood, M. (1989). Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: Osmotic and specific ion effects of salts. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(7), 889–895. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90077-1)
- El-Shinnawi, M. M., El-Saify, N. A., & Waly, T. M. (1989). Influence of the ionic form of mineral salts on growth of *Faba bean* and *Rhizobium leguminosarum*. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5(2), 247-254. <https://doi.org/10.1007/BF01741849>
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdorani, F., & Xie, Y. (2015). Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response. *The Scientific World Journal*, 2015, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2015/756120>
- Embalomatis, A., Papaxosta, D. K., & Katinakis, P. (1994). Evaluation of *Rhizobium meliloti* Strains Isolated from Indigenous Populations in Northern Greece. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 172(2), 73–80. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037x.1994.tb00532.x>
- Ertl, G. (2012). The Arduous Way to the Haber-Bosch Process. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 638(3-4), 487-489. <https://doi.org/10.1002/zaac.201190458>
- Estrada-de los Santos, P., Palmer, M., Chávez-Ramírez, B., Beukes, C., Steenkamp, E., Briscoe, L., ... James, E. (2018). Whole Genome Analyses Suggests that Burkholderia sensu lato Contains Two Additional Novel Genera (Mycetohabitans gen. nov., and Trinickia gen.

- nov.): Implications for the Evolution of Diazotrophy and Nodulation in the *Burkholderiaceae*. *Genes*, 9(8), 389. <https://doi.org/10.3390/genes9080389>
- Fahraeus, G. (1957). The Infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique. *Microbiology*, 16(2), 374-381. <https://doi.org/10.1099/00221287-16-2-374>
- Fagg, C. W., & Stewart, J. L. (1994). The value of Acacia and Prosopis in arid and semi-arid environments. *Journal of Arid Environments*, 27(1), 3-25. <https://doi.org/10.1006/jare.1994.1041>
- Farissi, M., Aziz, F., Bouizgaren, A., & Ghoulam, C. (2014). La symbiose Légumineuses-rhizobia sous conditions de salinité : Aspect Agro-physiologique et biochimique de la tolérance. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 11(1), 96–104.
- Farissi, M., Bouizgaren, A., Faghire, M., Bargaz, A., & Ghoulam, C. (2011). Agro-physiological responses of Moroccan alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations to salt stress during germination and early seedling stages. *Seed Science and Technology*, 39(2), 389-401. <https://doi.org/10.15258/sst.2011.39.2.11>
- Farissi, M., Ghoulam, C., & Bouizgaren, A. (2014). Effet de la salinité sur la production et la qualité fourragère de populations de luzerne dans la région de Marrakech (Maroc). *Fourrages*, 219, 271-275
- Farissi, M., Mouradi, M., Bouizgaren, A., & Ghoulam, C. (2016). Amélioration de la germination de la luzerne (*Medicago sativa* L.) sous stress salin par traitement pré-germinatif. *Fourrages*, 228, 261-264.
- Ferrer, J.-L., Austin, M. B., Stewart, C., & Noel, J. P. (2008). Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 356-370. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.009>
- Foucher, F., & Kondorosi, E. (2000). Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology*, 43(5/6), 773-786. <https://doi.org/10.1023/a:1006405029600>
- Fougère, F., Le Rudulier, D., & Streeter, J.G. (1991). Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 96, 1228–1236.
- Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2008). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1-2), 35-59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>
- Francis, D. D., Schepers, J. S., & Vigil, M. F. (1993). Post-Anthesis Nitrogen Loss from Corn. *Agronomy Journal*, 85(3), 659. <https://doi.org/10.2134/agronj1993.00021962008500030026x>

- Frink, C. R., Waggoner, P. E., & Ausubel, J. H. (1999). Nitrogen fertilizer: Retrospect and prospect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), 1175–1180. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1175>
- Fujihara, S., & Yoneyama, T. (1993). Effects of pH and Osmotic Stress on Cellular Polyamine Contents in the Soybean Rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Appl Environ Microbiol.* 59(4), 1104– 1109.
- Gage, D. J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280-300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>
- Galibert, F. (2001). The Composite Genome of the Legume Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, 293(5530), 668-672. <https://doi.org/10.1126/science.1060966>
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., Martinelli, L.A., Seitzinger S.P., Sutton, M. A. (2008). Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science*, 320(5878), 889–892. <https://doi.org/10.1126/science.1136674>
- Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., & Cosby B.J. (2003). The Nitrogen Cascade. *BioScience*, 53(4), 341-356. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0341:TNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0341:TNC]2.0.CO;2)
- Gao, J. (2001). Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. *Journal of Biotechnology*, 91(2-3), 155–168. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00337-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00337-6)
- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A., & Young, J. (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 51(6), 2037–2048. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2037>
- Geddes, B. A., Ryu, M., Mus, F., Garcia Costas, A., Peters, J. W., Voigt, C. A., & Poole, P. (2015). Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N₂-fixation to cereals. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.01.004>
- Gehlot, H. S., Panwar, D., Tak, N., Tak, A., Sankhla, I. S., Poonar, N., ... Sprent, J. I. (2012). Nodulation of legumes from the Thar desert of India and molecular characterization of their rhizobia. *Plant and Soil*, 357(1-2), 227–243. <http://dx.doi:10.1007/s11104-012-1143-5>
- Georgiev, G. I., & Atkias C. A. (1993). Effects of salinity on N₂ fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules. *Symbiosis* 15:239–255.
- Geurts, R., & Bisseling, T. (2002). Rhizobium Nod Factor Perception and Signalling. *The Plant Cell*, 14 (suppl 1), S239-S249. <https://doi.org/10.1105/tpc.002451>

- Geurts, R., Fedorova, E., & Bisseling, T. (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 346-352. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.013>
- Gibson, A.H. (1980). Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets. In *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Ed. Bergersen F.J. 139–184. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK.
- Graham, P. H. (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 475–484. <https://doi.org/10.1139/m92-079>
- Graham, P. H., Draeger, K. J., Ferrey, M. L., Conroy, M. J., Hammer, B. E., Martinez, E., Aarons, S.R., & Quinto, C. (1994). Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(3), 198–207. <https://doi.org/10.1139/m94-033>
- Graham, P. H., Sadowsky, M. J., Keyser, H. H., Barnet, Y. M., Bradley, R. S., Cooper, J. E., ... Young, J. P. W. (1991). Proposed Minimal Standards for the Description of New Genera and Species of Root- and Stem-Nodulating Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(4), 582-587. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-4-582>
- Graham, P., Viteri, S., Mackie, F., Vargas, A., & Palacios, A. (1982). Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Research*, 5, 121–128. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(82\)90012-0](https://doi.org/10.1016/0378-4290(82)90012-0)
- Graham, P.H. (1992) Stress Tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and Nodulation under Adverse Soil Conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 475-484. <http://dx.doi.org/10.1139/m92-079>
- Graham, P.H. (1998). Biological dinitrogen fixation: symbiotic. In Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G., & Zuberer D. A. (Eds.), *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall, NJ. 322-345.
- Graham, P.H., Draeger, K., Ferrey, M.L., Conroy, M.J., Hammer, B.E., Martinez, E., Naarons, S.R., Quinto, C. (1994). Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*.;40:198-207.
- Graham, P.H., Viteri, S. E., Mackie, F., Vargas, A. T., & Palacios, A. (1982). Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Research*, 5, 121-128. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(82\)90012-0](https://doi.org/10.1016/0378-4290(82)90012-0)
- Graham, Peter H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131(3), 872-877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>
- Greenway, H., & Munns, R. (1980). Mechanisms of Salt Tolerance in Nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1), 149-190. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.31.060180.001053>

- Gubry-Rangin, C., Béna, G., Cleyet-Marel, J., & Brunel, B. (2013). Definition and evolution of a new symbiovar, sv. rigiduloides, among *Ensifer meliloti* efficiently nodulating *Medicago* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(7), 490–496. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.06.004>
- Gulash, M., Ames, P., Larosiliere, R.C., & Bergman, K. (1984). Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. *Appl Environ Microbiol*, 48(1): 149–152.
- Gupta, R.S. (1998). Protein Phylogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships among Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4), 1435–1491.
- Gutiérrez, R. A. (2012). Systems Biology for Enhanced Plant Nitrogen Nutrition. *Science*, 336(6089), 1673–1675. <https://doi.org/10.1126/science.1217620>
- Hall, M.H. (1993). Alfalfa Growth Following Release From Drought Stress. *Agron. J.*, 85: 991-994.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 81, 95–98.
- Hamady, A., Lasram, M. & Lacirignola, C. (1995). Les problèmes de salinité dans la zone méditerranéenne. *Comptes rendus de l'Académie de l'Agriculture de France*. 81, 2: 47-60
- Hameed, R. A., Hussain, N. N., & Aljibouri, A. M. (2014). Phenotypic Characterization of Indigenous Iraqi *Sinorhizobium meliloti* Isolates for Abiotic Stress Performance. *Journal of Life Sciences*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.18734.36167>
- Hare, P.D., Cress, W.A., & Van Staden, J.(1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ*. 21, 535–53.
- Hashem, F. M., Swelim, D. M., Kuykendall, L. D., Mohamed, A. I., Abdel-Wahab, S. M., & Hegazi, N. I. (1998). Identification and characterization of salt- and thermo-tolerant *Leucaena*-nodulating *Rhizobium* strains. *Biology and Fertility of Soils*, 27(4), 335-341. <https://doi.org/10.1007/s003740050440>
- Haukka, K., Lindström, K., & Young, P. W. (1998). Three Phylogenetic Groups of *nodA* and *nifH* Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 64(2), 419–426.
- Hefny, M., Doliński, R., & Małek, W. (2001). Variation in symbiotic characters of alfalfa cultivars inoculated with *Sinorhizobium meliloti* strains. *Biology and Fertility of Soils*, 33(5), 435–437. <https://doi.org/10.1007/s003740100339>
- Hirel, B., Tétu, T., Lea, P. J., & Dubois, F. (2011). Improving Nitrogen Use Efficiency in Crops for Sustainable Agriculture. *Sustainability*, 3(9), 1452–1485. <https://doi.org/10.3390/su3091452>

- Hirsch, A. M. (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(4), 320-326. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80056-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80056-9)
- Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. (2016). Working with rhizobia. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).
- Howieson, J. G., Ewing, M. A., & D'Antuono, M. F. (1988). Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil*, 105(2), 179–188. <https://doi.org/10.1007/bf02376781>
- Howieson, J., Robson, A., & Abbott, L. (1992). Acid-Tolerant Species of *Medicago* Produce Root Exudates at Low pH Which Induce the Expression of Nodulation Genes in *Rhizobium meliloti*. *Functional Plant Biology*, 19(3), 287. <https://doi.org/10.1071/PP9920287>
- Hungria, M., & Franco, A. A. (1993). Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, 149(1), 95-102. <https://doi.org/10.1007/BF00010766>
- Hungria, M., & Vargas, M. A. (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65(2-3), 151–164. [https://doi.org/10.1016/s0378-4290\(99\)00084-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4290(99)00084-2)
- Huyghe, C., Delaby, L., Rosellini, D., & Veronesi, F. (2014). Perspectives of alfalfa in Europe. *Legume Perspect.* 4: 5–6.
- Ibriz, M., Thami alami, I., Zenasni, L., Alfaiz, C., Benbella, M. (2004). Production des luzernes des régions pré-sahariennes du Maroc en conditions salines. *Fourrages*, 180, 527-540.
- Idder, T., Idder, A., Tankari Dan-Badjo, A., Benzida, A., Merabet, S., Negais, H., & Serraye, A. (2014). Les oasis du Sahara algérien, entre excédents hydriques et salinité. *Revue des sciences de l'eau*, 27(2), 155. <https://doi.org/10.7202/1025565ar>
- Ikeda, J., Kobayashi, M., & Takahashi, E. (1992). Salt stress increases the respiratory cost of nitrogen fixation. *Soil Science and Plant Nutrition*, 38(1), 51-56. <https://doi.org/10.1080/00380768.1992.10416951>
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram R., & Panneerselvam, R. (2009). Drought Stress in Plants: a Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *Int. J. Agric. Biol.*, 11: 100–105
- Jaspers, E., & Overmann, J. (2004). Ecological Significance of Microdiversity: Identical 16S rRNA Gene Sequences Can Be Found in Bacteria with Highly Divergent Genomes and Ecophysologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4831–4839. <https://doi.org/10.1128/aem.70.8.4831-4839.2004>
- Jebara, M., Aouani, M. E., Mhamdi, R., Ghrir, R., & Mars, M. (1995). Effet du sel sur des isolats de *Sinorhizobium sp.* de Tunisie *in vitro* ou en association avec *Medicago sp.*. *Cahiers Agricultures*, 9, 99–102.

- Jensen, E. S., & Hauggaard-Nielsen, H. (2003). How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil*, 252(1), 177-186. <https://doi.org/10.1023/A:1024189029226>
- Josey, D. P., Beynon, J. L., Johnston, A. W. B., & Beringer, B. E. (1979). Strain Identification in Rhizobium Using Intrinsic Antibiotic Resistance. *Journal of Applied Bacteriology*, 46, 343–350.
- Kang, Y., Han, Y., Torres-Jerez, I., Wang, M., Tang, Y., Monteros, M., & Udvardi, M. (2011). System responses to long-term drought and re-watering of two contrasting alfalfa varieties. *The Plant Journal*, 68(5), 871-889. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04738.x>
- Kape, R., Parniske, M., & Werner, D. (1991). Chemotaxis and nod gene activity of Bradyrhizobium japonicum in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 316–319.
- Kaplan, F., & Guy, C. L. (2004). β -Amylase Induction and the Protective Role of Maltose during Temperature Shock. *Plant Physiology*, 135(3), 1674-1684. <https://doi.org/10.1104/pp.104.040808>
- Karabi, M., Hamdi, A. B., & Zenkhri, S. (2016). Microbial diversity and organic matter fractions under two arid soils in Algerian Sahara. *AIP Conference Proceedings*. <https://doi.org/10.1063/1.4959402>
- Kassem, M., Capellano, A., & Gounot, A. M. (1985). Effets du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficacité de Rhizobium meliloti. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1(1), 63–75. <https://doi.org/10.1007/bf01748155>
- Kim, M., Chen, Y., Xi, J., Waters, C., Chen, R., & Wang, D. (2015). An antimicrobial peptide essential for bacterial survival in the nitrogen-fixing symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(49), 15238-15243. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500123112>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/bf01731581>
- Kishinevsky, B. D., Sen, D., & Weaver, R. W. (1992). Effect of high root temperature on Bradyrhizobium-peanut symbiosis. *Plant and Soil*, 143(2), 275-282. <https://doi.org/10.1007/BF00007883>
- Köpke, U., & Nemecek, T. (2010). Ecological services of faba bean. *Field Crops Research*, 115(3), 217-233. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.10.012>
- Kryvoruchko, I. S., Routray, P., Sinharoy, S., Torres-Jerez, I., Tejada-Jiménez, M., Finney, L. A., . . . Udvardi, M. K. (2017). An Iron-Activated Citrate Transporter, MtMATE67, Is Required for Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Physiology*, 176(3), 2315–2329. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01538>

- Kulkarni, S., Surange, S., & Shekhar Nautiyal, C. (2000). Crossing the Limits of Rhizobium Existence in Extreme Conditions. *Current Microbiology*, 41(6), 402-409. <https://doi.org/10.1007/s002840010158>
- Laguette, G., Nour, S. M., Drouin, P., Amarger, N., Sanjuan, J., & Macheret, V. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 147(4), 981–993. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981>
- Lamm, F.R., Harmony, K.R., Aboukheneira, A.A., Johnson, S.K., (2012). Alfalfa production with subsurface drip irrigation in the Central Great Plains. *Trans. ASABE* 55, 1203–1212.
- Langer, H., Nandasena, K. G., Howieson, J. G., Jorquera, M., & Borie, F. (2007). Genetic diversity of *Sinorhizobium meliloti* associated with alfalfa in Chilean volcanic soils and their symbiotic effectiveness under acidic conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 301–308. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9471-y>
- Laranjo, M., & Oliveira, S. (2006). Rhizobial Strain Improvement: Genetic Analysis and Modification, *In: Microbial Biotechnology in Agriculture and Aquaculture*. Vol II R. C. Ray (Ed). Science Publisher Inc., Enfield, New Hampshire, USA pp. 225-260.
- Latrach, L., Mouradi, M., Farissi, M., Bouizgaren, A., & Ghoulam, C. (2017). Physiological characterization of rhizobial strains nodulating alfalfa (*Medicago sativa*) isolated from soils of Southeastern Morocco. *Appl. J. Envir. Eng. Sci.*, 3(4), 353-364
- Laus, M. C., Logman, T. J., Lamers, G. E., Van Brussel, A. A. N., Carlson, R. W., & Kijne, J. W. (2006). A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Molecular Microbiology*, 59(6), 1704-1713. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05057.x>
- Le Houérou, H. N. (1975). Problèmes et potentialités des terres arides de l’Afrique du Nord. *Options Méditerranéennes. Séries A, Mediterr Semin*, 26: 17-32.
- León-Barrios, M., Lorite, M. J., Donate-Correa, J., & Sanjuán, J. (2009). *Ensifer meliloti* bv. *lancerottense* establishes nitrogen-fixing symbiosis with *Lotus* endemic to the Canary Islands and shows distinctive symbiotic genotypes and host range. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(6), 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.04.003>
- Lewis, G.A., Schrire, B.B., Mackinder, B.C., & Lock, M.D. (2005). *Legumes of the World*; Kew: Royal Botanic Gardens, London, UK.
- Li, Y. Z., Wang, D., Feng, X. Y., Jiao, J., Chen, W. X., & Tian, C. F. (2015). Genetic Analysis Reveals the Essential Role of Nitrogen Phosphotransferase System Components in *Sinorhizobium fredii* CCBAU 45436 Symbioses with Soybean and Pigeonpea Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 1305-1315. <https://doi.org/10.1128/AEM.03454-15>
- Limpens, E., & Bisseling, T. (2003). Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 343-350. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00068-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00068-2)

- Lindström, K., Murwira, M., Willems, A., & Altier, N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*, 161(6), 453-463. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.005>
- Liu, C.-W., & Murray, J. (2016). The Role of Flavonoids in Nodulation Host-Range Specificity: An Update. *Plants*, 5(3), 33. <https://doi.org/10.3390/plants5030033>
- Long, S. R. (1996). Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *The Plant Cell*, 8(10), 1885-1898. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1885>
- Lortet, G. (1996). Nod Factor Thin-Layer Chromatography Profiling as a Tool to Characterize Symbiotic Specificity of Rhizobial Strains: Application to *Sinorhizobium saheli*, *S. teranga*, and *Rhizobium* sp. Strains Isolated from *Acacia* and *Sesbania*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9(8), 736. <https://doi.org/10.1094/mpmi-9-0736>
- Loureiro, M. F., James, E. K., Sprent, J. I., & Franco, A. A. (1995). Stem and root nodules on the tropical wetland legume *Aeschynomene fluminensis*. *New Phytologist*, 130(4), 531-544. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb04330.x>
- LPWG (2013). Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* 2013, 62, 217–248.
- LPWG (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny – The Legume Phylogeny Working Group. *Taxon*, 66(1), 44-77. <https://doi.org/10.12705/661.3>
- Lunn, J. E., Delorge, I., Figueroa, C. M., Van Dijck, P., & Stitt, M. (2014). Trehalose metabolism in plants. *The Plant Journal*, 79(4), 544-567. <https://doi.org/10.1111/tpj.12509>
- Maâtallah, J., Berraho, E. B., Sanjuan, J., & Lluch, C. (2002). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie*, 22(3), 321–329. <https://doi.org/10.1051/agro:2002013>
- Mabrouk, Y., Hemissi, I., Salem, I. B., Mejri, S., Saidi, M., & Belhadj, O. (2018). Potential of Rhizobia in Improving Nitrogen Fixation and Yields of Legumes. *Symbiosis*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73495>
- Madhava Rao, K. V., Raghavendra, A. S., & Janardhan Reddy, K. (2006). Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. Eds. <https://doi.org/10.1007/1-4020-4225-6>
- Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L., Escarré, J., & Cleyet-Marel, J. C. (2011). *Anthyllis vulneraria*/*Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. *Plant and Soil*, 342(1-2), 405-417. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0705-7>
- Manchanda, G., & Garg, N. (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 595-618. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0173-3>

- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P., & Willems, A. (2008). Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 200-214. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65392-0>
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., & Willems, A. (2007). Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 57(3), 489-503. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64344-0>
- Martin, N.P. (2014). Perspectives of alfalfa in North America. *Legume Perspect.* pp. 7-8.
- McManus, M. C. (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 54(12), 1420-1433. <https://doi.org/10.1093/ajhp/54.12.1420>
- Meka, V. G., & Gold, H. S. (2004). Antimicrobial Resistance to Linezolid. *Clinical Infectious Diseases*, 39(7), 1010-1015. <https://doi.org/10.1086/423841>
- Menna, P., Barcellos, F. G., & Hungria, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 59(12), 2934-2950. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009779-0>
- Merabet, C., Bekki, A., Benrabah, N., Bey, M. B., Bouchentouf, L., Ameziane, H., . . . Lajudie, P. (2006). Distribution of *Medicago* Species and Their Microsymbionts in a Saline Region of Algeria. *Arid Land Research and Management*, 20(3), 219-231. <https://doi.org/10.1080/15324980600705685>
- Mergaert, P., Van Montagu, M., & Holsters, M. (1997). Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular Microbiology*, 25(5), 811-817. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1997.mmi526.x>
- Mezni, M., Bizid, E., & Harnza, M. (1999). Effets de la salinité des eaux d'irrigation sur la survie et la croissance de trois cultivars de luzerne pérenne. *Fourrages*, 158, 169-178.
- Michaud, R., Lehman, W. F., & Runbaugh, M. D. (1988). World distribution and historical development. In: Hanson, A.A., Barnes, D. K., & Hill, R. R., (eds) *Alfalfa and alfalfa improvement*. Madison, WI, USA, pp 25-91.
- Michiels, J., Verreth, C., & Vanderleyden, J. (1994). Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1206-1212.
- Mnasri, B., Saïdi, S., Chihaoui, S., & Mhamdi, R. (2012). *Sinorhizobium americanum* symbiovar *mediterraneense* is a predominant symbiont that nodulates and fixes nitrogen with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Northern Tunisian field. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(4), 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.04.003>

- Mohamed, S. H., Smouni, A., Neyra, M., Kharchaf, D., & Filali-Maltouf, A. (2000). Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. *Plant and Soil*, 224(2), 171–183. <https://doi.org/10.1023/a:1004838218642>
- Mohammad, R. M., Akhavan-Kharazian, M., Campbell, W. F., & Rumbaugh, M. D. (1991). Identification of salt- and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant and Soil*, 134(2), 271–276. <https://doi.org/10.1007/bf00012045>
- Mohammadi, K. (2012). Effective factors on biological nitrogen fixation. *African Journal of Agricultural Research*, 7(12). <https://doi.org/10.5897/AJARX11.034>
- Mouradi, M., Bouizgaren, A., Farissi, M., Makoudi, B., Kabbadj, A., Very, A., Sentenac, H., Qaddoury, & A., Ghoulam, C. (2016). Osmopriming improves seeds germination, growth, antioxidant responses and membrane stability during early stage of Moroccan alfalfa populations under water deficit. *Chilean journal of agricultural research*, 76(3), 265–272. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392016000300002>
- Mpepereki, S., Makonese, F., & Wollum A.G. (1997). Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis*, 22, 275-292.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987b). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, , 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25(2), 239-250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 651-681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Munns, R., James, A.J., & Lauchli, A. (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1025-1043. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj100>
- Niste, M., Vidican, R., Rotar, I., & Pop, R. (2015). The Effect of Temperature Stress on *Rhizobium trifolii* and *Sinorhizobium meliloti* Strains In Vitro. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 72(1). <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-agr:11179>
- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C., & Sanjuan, J. (2002). *Rhizobium tropici* Genes Involved in Free-Living Salt Tolerance are Required for the Establishment of Efficient Nitrogen-Fixing Symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(3), 225-232. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.3.225>
- Novikova, T.I. & Gordienko, N.Y. (1999). Specific Features of Functioning of the Symbiotic System *Rhizobium-Glycyriza uralensis* under the Conditions of Chloride Salinization. *Sibirskii Ekologicheskii Zhurnal*, 3, 295–302

- O'hara, G. W., Goss, T. J., Dilworth, M. J., & Glenn, A. R. (1989). Maintenance of Intracellular pH and Acid Tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol.*, 55(8), 1870–1826.
- Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252-263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
- Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 119–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
- 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](https://alfalfa.ucdavis.edu/IrrigatedAlfalfa). Chapter 2. Oakland, University of California Natural Resources Publication 8288. <https://alfalfa.ucdavis.edu/IrrigatedAlfalfa>
- Otmane, T., & Kouzmine, Y. (2013). Bilan spatialisé de la mise en valeur agricole au Sahara algérien. *Cybergeo*. <https://doi.org/10.4000/cybergeo.25732>
- Palma, F., Tejera, N. A., & Lluch, C. (2013). Nodule carbohydrate metabolism and polyols involvement in the response of *Medicago sativa* to salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 85, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.08.009>
- Pansu, M., & Gautheyrou, J. (2006). *Handbook of Soil Analysis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-31211-6>
- Patriarca, E. J., Tatè, R., Ferraioli, S., & Iaccarino, M. (2004). Organogenesis of Legume Root Nodules. *International Review of Cytology*, 201-262. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)34005-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)34005-2)
- Paul, D., & Lade, H. (2014). Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4), 737-752. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0233-6>
- Peck, M. C., Fisher, R. F., & Long, S. R. (2006). Diverse Flavonoids Stimulate NodD1 Binding to nod Gene Promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 188(15), 5417-5427. <https://doi.org/10.1128/JB.00376-06>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2014). Bacterial Associations with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 17–42. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899>
- Peoples, M. B., & Craswell, E. T. (1992). Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil*, 141(1-2), 13–39. <https://doi.org/10.1007/bf00011308>
- Pongslip, N. (2012). Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia. Bentham Science Publishers, <https://doi.org/10.2174/97816080546191120101>

- Pope, M.R., Saari, L.L., & Ludden, P.W. (1986). N-glycohydrolysis of adenosine diphosphoribosyl arginine linkages by dinitrogenase reductase activating glycohydrolase (activating enzyme) from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* 261:10104-10111
- Postgate, J. R. (1982). Biology Nitrogen Fixation: Fundamentals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, Vol. 296, No. 1082, The Nitrogen Cycle (Jan. 27, 1982), pp. 375-385
- Preedee, R., & Ravindran, D. (2010). Nodule formation, distribution and symbiotic efficacy of *Vigna unguiculata* L. under different soil salinity regimes. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 22(4), 275. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v22i4.4875>
- Quan, W., Liu, X., Wang, H., & Chan, Z. (2016). Comparative Physiological and Transcriptional Analyses of Two Contrasting Drought Tolerant Alfalfa Varieties. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01256>
- Quiros, C. F., Bauchan, G. R. (1988). The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In: Hanson, A.A., Barnes, D. K., & Hill, R. R., (eds) *Alfalfa and alfalfa improvement*. Madison, WI, USA, pp 25-91.
- Richardson, A. E., Djordjevic, M. A., Rolfe, B. G., & Simpson, R. J. (1988). Effects of pH, Ca and Al on the exudation from clover seedlings of compounds that induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, 109(1), 37-47. <https://doi.org/10.1007/BF02197578>
- Robson, R. L., & Postgate, J. R. (1980). Oxygen and Hydrogen in Biological Nitrogen Fixation. *Annual Review of Microbiology*, 34(1), 183-207. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.34.100180.001151>
- Rodrigues, C. S., Laranjo, M., & Oliveira, S. (2006). Effect of Heat and pH Stress in the Growth of Chickpea Mesorhizobia. *Current Microbiology*, 53(1), 1-7. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-4515-8>
- Rodrigues, D. R., Silva, A. F. da, Cavalcanti, M. I. P., Escobar, I. E. C., Fraiz, A. C. R., Ribeiro, P. R. de A., & Fernandes-Júnior, P. I. (2018). Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of *Erythrina velutina* rhizobia from Caatinga dry forest. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(3), 503-512. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.007>
- Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., & Martínez Romero, E. (2011). Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.015>
- Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P., & Cleyet-Marel, J. C. (1996). *Sinorhizobium medicae* sp. nov., Isolated from Annual *Medicago* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(4), 972-980. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-972>
- Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A., Lamari, L., Bennadji, H., & Lefebvre, G. (1998). Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse* 9, 147-153.

- Sadowsky, M. J. (1995). Soil Stress Factors Influencing Symbiotic Nitrogen Fixation. Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress, 89–112. https://doi:10.1007/1-4020-3544-6_6
- Safarnejad, A. (2008). Morphological and Biochemical Response to Osmotic Stress in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). Pak. J. Bot., 40(2): 735-746.
- Saidi, S., Zribi, K., Badri, Y., & Aouani, M. E. (2009). Genetic characterisation and symbiotic proprieties of native sinorhizobia trapped by *Medicago sativa* on Tunisian soils. *Soil Research*, 47(3), 321. <https://doi.org/10.1071/SR08014>
- Salehi-Lisar, S. Y., & Bakhshayeshan-Agdam, H. (2016). Drought Stress in Plants: Causes, Consequences, and Tolerance. *Drought Stress Tolerance in Plants*, Vol 1, 1–16. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28899-4_1
- Santos, H., & da Costa, M.S. (2002). Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ. Microbiol.*, 4, 501–509
- Sarita, S., Sharma, P. K., Priefer, U. B., & Prell, J. (2005). Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.015>
- Sarmadnia, G.H., & Koucheki, A. (1992). Physiological aspect of dry farming (third edition) (author: U.S.Gupta). Saeed Publication
- Schrire, B., Lewis, G. and Lavin, M. (2005). Biogeography of the *Leguminosae*. In: Lewis, G.P., Schrire, B.D., MacKinder, B. and Lock, M., Eds., *Legumes of the World*, Kew Publishing, 21-54.
- Schumpp, O., & Deakin, W. J. (2010). How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules. *Trends in Plant Science*, 15(4), 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.001>
- Seneviratne, G., & Jayasinghearachchi, H. S. (2003). Phenolic acids: Possible agents of modifying N₂-fixing symbiosis through rhizobial alteration? *Plant and Soil*, 252(2), 385-395. <https://doi.org/10.1023/A:1024725511783>
- Shamseldin, A., Abdelkhalek, A., & Sadowsky, M. J. (2016). Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis*, 71(2), 91-109. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0462-3>
- Shao, H., Chu, L., Shao, M., Jaleel, C. A., & Hong-mei, M. (2008). Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies*, 331(6), 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.03.011>
- Shetta, N. D., Al-Shaharani, T. S., & Abdel-Aal, M. (2011). Identification and Characterization of Rhizobium Associated with Woody Legume Trees Grown under Saudi Arabia Condition. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 10(3), 410–418.

- Silva, C., Kan, F. L., & Martínez-Romero, E. (2007). Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago* spp. in Mexico. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(3), 477–489. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00301.x>
- Sim, R. E., Brown, H. E., Teixeira, E. I., & Moot, D. J. (2016). Soil water extraction patterns of lucerne grown on stony soils. *Plant and Soil*, 414(1-2), 95-112. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3112-x>
- Singleton, P. W., El Swaify, S. A., & Bohlool, B.B. (1982). Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival: Isolated from sand growing legumes, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(4):884-890.
- Smit, G., Kijne, J.W., & Lugtenberg, B.J. (1987). Involvement of both cellulose fibrils and a Ca_2^+ -dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J Bacteriol* 169, 4294-4301.
- Smith, L., & Smith, G. M. (1989). An osmoregulated dipeptide in stressed *R. meliloti*. *J. Bacteriol.*, 171, 4714-4717
- Sofi, P.A., Saba, I., & Amin, Z. (2017). Root architecture and rhizobial inoculation in relation to drought stress response in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Appl Nat Sci* 9(1):502–507
- Somasegaran, P., & Hoben, H. (1985). *Methods in legume-Rhizobium technology*. University of Hawaii NifTAL Project, Paia, Hawaii.
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). *Handbook for Rhizobia*. Springer-Verlag New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>
- Somasegaran, P., & Hoben, H.J. (1985). *Methods in Legume-rhizobium Technology*. NifTAL project and MIRCEN. Department of Agronomy, 2nd Soil Science Hawaii Institute Tropical Agriculture Human research, Univ Hawaii Manoa
- Soussi, M., Ocana, A., & Lluch, C., (1998). Effects of salt stress on growth: photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* 49, 1329–1337.
- Sprent, J. I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist*, 174(1), 11-25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02015.x>
- Sprent, J. I., Ardley, J., and James, E. K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol.* 215, 40–56. <https://doi.10.1111/nph.14474>
- Sprent, J.I. (1995). Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4-5), 401-407. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)98610-Z](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)98610-Z)
- Sprent, Janet I., & Gehlot, H. S. (2010). Nodulated legumes in arid and semi-arid environments: are they important? *Plant Ecology & Diversity*, 3(3), 211-219. <https://doi.org/10.1080/17550874.2010.538740>

- Spriggs, A. C., & Dakora, F. D. (2009). Assessing the suitability of antibiotic resistance markers and the indirect ELISA technique for studying the competitive ability of selected *Cyclopia Vent. rhizobia* under glasshouse and field conditions in South Africa. *BMC Microbiology*, 9(1), 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-142>
- Struffi, P., Corich, V., Giacomini, A., Benguedouar, A., Squartini, Casella, S., & Nuti, MP. (1998). Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1), 81–89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00318.x>
- Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in Plant Science*, 12(7), 282-285. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.006>
- Sugiyama, A., & Yazaki, K. (2011). Root Exudates of Legume Plants and Their Involvement in Interactions with Soil Microbes. *Signaling and Communication in Plants*, 27-48. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23047-9_2
- Sugiyama, A., & Yazaki, K. (2014). Flavonoids in plant rhizospheres: secretion, fate and their effects on biological communication. *Plant Biotechnology*, 31(5), 431-443. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.0917a>
- Sullivan, J. T., Eardly, D. B., Van Berkum, P., & Roncon, C. W. (1996). Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl Environ Microbiol*, 62(8), 2818–2825.
- Swaraj, K., & Bishnoi, N.R., (1999). Effect of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Indian J. Exp. Biol.* 37, 843–848
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tang, L., Cai, H., Zhai, H., Luo, X., Wang, Z., Cui, L., & Bai, X. (2014). Overexpression of Glycine soja WRKY20 enhances both drought and salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1), 77-86. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0463-y>
- Tate, R. L. (1995). Soil microbiology (symbiotic nitrogen fixation). John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y. 307– 333
- Tester, M. & Davenport, R. (2003). Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. *Annals of Botany*, 91(5), 503-527. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg058>
- Teuber, L.R., and Brick, M.A. (1988). Morphology and anatomy, 125-162. in A.A. Hanson, D.K. Barnes and R.R. Hill, Jr. (eds.) Alfalfa and alfalfa improvement.
- Thami-Alami, N., Elboutahiri, S., & Udupa, S.M. (2010). Variability in natural populations of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. *Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens*, 92, 265-269.

- Tian, C. F., Zhou, Y. J., Zhang, Y. M., Li, Q. Q., Zhang, Y. Z., Li, D. F., . . . Chen, W. X. (2012). Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), 8629–8634. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120436109>
- Tindall, B. J., Busse, H., Ludwig, W., Rosselló-Móra, R., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249–266. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>
- Toularoud, A. S., Aserse, A. A., Alikhani, H., Salehi Jouzani, G. R., Rahmanid, H. A., Khavazi, K., . . . Lindström, K. (2016). Taxonomic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial strains obtained from nodules of *Medicago sativa* growing in Iran. *Annals of Biological Research*, 7(3), 29–38.
- Tu, J. C. (1981). Effect of salinity on Rhizobium-root hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Can. J. Plant Sci.* 61: 231–239.
- Turner, S. L., & Young, J. P. W. (2000). The Glutamine Synthetases of Rhizobia: Phylogenetics and Evolutionary Implications. *Molecular Biology and Evolution*, 17(2), 309–319. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a02631>
- USSL Staff (1954). Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. USDA Handbook No 60, Washington DC, USA, 160 pp.
- Van Damme, E. J. M., Barre, A., Rougé, P., & Peumans, W. J. (2004). Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. *Trends in Plant Science*, 9(10), 484-489. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.003>
- Vance, C. P. (2001). Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. *Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources*. *Plant Physiology*, 127(2), 390-397. <https://doi.org/10.1104/pp.010331>
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., Kersters, K. & Swing, S.J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbial Reviews*, 60, 407–438.
- Velagaleti, R.R., Marsh, S., Kramer, D., Fleischman, D., & Corbin, J. (1990). Genotypic differences in growth and nitrogen fixation among soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars grown under salt stress. *Tropical Agriculture*, 67, 169–177
- Vertes, F., Jeuffroy, M.H., Louarn, G., Voisin, A.S., & Justes E. (2015). Légumineuses et prairies temporaires : des fournitures d’azote pour les rotations. *Fourrages*, 223, 221-232.
- Villegas, M. D. C., Rome, S., Mauré, L., Domergue, O., Gardan, L., Bailly, X., . . . Brunel, B. (2006). Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (bv. *medicaginis*) of *S. meliloti*. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(7), 526–538. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.12.008>
- Vincent, J.M. (1970). A manual for practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Sci. Publ. Oxford.

- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., & Martínez-Romero, E. (2005). Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in Bradyrhizobium species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34(1), 29-54. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.08.020>
- Wagner, S. C. (2012). Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge*, 3(10):15
- Wais, R. J., Keating, D. H., & Long, S. R. (2002). Structure-Function Analysis of Nod Factor-Induced Root Hair Calcium Spiking in Rhizobium-Legume Symbiosis. *Plant Physiology*, 129(1), 211-224. <https://doi.org/10.1104/pp.010690>
- Wais, R. J., Wells, D. H., & Long, S. R. (2002). Analysis of Differences Between *Sinorhizobium meliloti* 1021 and 2011 Strains using the host calcium spiking response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(12), 1245–1252. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.12.1245>
- Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 14(3), 334-342. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x>
- Wang, S., Jiao, X., Guo, W., Lu, J., Bai, Y., & Wang, L. (2018). Adaptability of shallow subsurface drip irrigation of alfalfa in an arid desert area of Northern Xinjiang. *PLOS ONE*, 13(4), 1–2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone>
- Wdowiak-Wróbel, S., Leszcz, A., & Małek, W. (2013). Salt Tolerance in *Astragalus cicer* Microsymbionts: The Role of Glycine Betaine in Osmoprotection. *Current Microbiology*, 66(5), 428-436. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0293-2>
- Wei, G. H., Zhu, M. E., Chen, W. X., Wang, E. T., & Tan, Z. Y. (2002). *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2231–2239. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2231>
- Wei, W., Jiang, J., Li, X., Wang, L., & Yang, S. (2004). Isolation of salt-sensitive mutants from *Sinorhizobium meliloti* and characterization of genes involved in salt tolerance. *Letters in Applied Microbiology*, 39(3), 278–283. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2004.01577.x>
- Werner, G.D.A, Cornwell, W.K., Sprent, J.I., Kattje, J., & Kiers, E.T. (2014). A single evolutionary innovation drives the deep evolution of symbiotic N₂-fixation in angiosperms. *Nature communications* 5, Article number: 4087.
- White, P. J., & Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, 105(7), 1073–1080. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq085>
- Yan, H., Yan, J., Sui, X. H., Wang, E. T., Chen, W. X., Zhang, X. X., & Chen, W. F. (2016). *Ensifer glycinis* sp. nov., a rhizobial species associated with species of the genus *Glycine*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(8), 2910-2916. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001120>

- Yattara, I. I., Neyra, M., Lahbib, M. M., Yossi, H., & De Lajudie, P. (2000). Diversité des Rhizobiums associés à *Dolichos lablab* utilisé pour l'amélioration de la jachère en zone sahélienne. *John Libbey Eurotext, La jachère en Afrique tropicale*, 679–687.
- Zahran, H. (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 91(2-3), 143-153. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00342-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00342-x)
- Zahran, H. H. (1991). Conditions for successful Rhizobium-legume symbiosis in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*, 12(1), 73-80. <https://doi.org/10.1007/BF00369391>
- Zahran, H.H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(4), 968-989
- Zakhia, F., & de Lajudie, P. (2006). La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques, application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses. *Can. J. Microbiol.* 52, 169–181.
- Zhang, F., & Smith, D. L. (1996). Inoculation of soybean (*Glycine max.* (L.) Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant and Soil*, 179(2), 233-241. <https://doi.org/10.1007/BF00009333>
- Zhang, Y. M., Tian, C. F., Sui, X. H., Chen, W. F., & Chen, W. X. (2012). Robust Markers Reflecting Phylogeny and Taxonomy of Rhizobia. *PLoS ONE*, 7(9), e44936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044936>
- Zhu, L., Zhang, H., Gao, X., Qi, Y., & Xu, X. (2016). Seasonal patterns in water uptake for *Medicago sativa* grown along an elevation gradient with shallow groundwater table in Yanchi county of Ningxia, Northwest China. *Journal of Arid Land*, 8(6), 921-934. <https://doi.org/10.1007/s40333-016-0017-8>
- Zlatev, Z., & Lidon, F. C. (2012). An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(1), 57. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v24i1.10599>

Annexes

Annexe 1 : Composition du milieu YEM (Vincent, 1970).

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
Mannitol	10
Extrait de levure	0.5
Eau distillée	1000 ml
Ajustement du pH à 6.8 ±0.2	
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

Annexe 2 : Composition de la solution nutritive de Fahraeus (Fahraeus, 1957).

Macroéléments	
Composants	Quantité (g/l)
Na ₂ HPO ₄	0.15
KH ₂ PO ₄	0.1
CaCl ₂	0.1
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.12
Citrate de ferre	0.005
Solution mère de microéléments	1 ml
Eau distillée	1000 ml
Ajustement du pH à 6.8 - 7.0	
Autoclavage à 120°C pendant 20 min.	

Microéléments	
Composants	Quantité (g/l)
H ₃ BO ₃	2.86
MnSO ₄ 7H ₂ O	2.03
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.22
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.08
H ₂ MoO ₄ H ₂ O	0.14
Eau distillée	1000 ml

Annexe 3 : effectivité et ineffectivité de l'ensemble des isolats soumis au test d'authentification (+ : effective ; - : ineffective).

Les souches utilisées dans cette étude sont indiquées en gras.

Région	Station	Isolats	Nodulation	Région	Station	Isolats	Nodulation	Région	Station	Isolats	Nodulation
El Oued	E1	E111	+	Ouargla	O1	O111	+	Ghardaïa	G1	G122	+
		E113	-			O113	+			G124	+
		E114	+			O114	+			G131	+
		E121	-			O121	-			G132	+
		E123	+			O131	-			G1321	-
		E131	+			O132	+			G133	-
		E132	+			O142	+			G1341	-
		E133	+			O143	+			G141	-
		E134	-			O144	+			G1411	+
		E141	+			O152	+			G151	-
		E142	+			O153	+			G1511	+
	E2	E212	+			O154	+		G2	G211	+
		E213	+			O161	+			G241	+
		E221	+			O163	+			G242	+
		E222	+			O171	+		G3	G312	+
		E223	+			O172	+			G315	+
		E231	+			0173	+			G321	+
		E232	+			0174	-		G4	G421	+
		E233	+			O181	-			G422	+
		E234	+		O182	+	G424			+	
		E241	+		O191	+	G4241			+	
		E242	-		O192	+	G431			+	
		E243	+		O211	+	G4311			+	
		E244	+		O213	+	G434			-	
		E251	+		O2	O223	+		G441	-	
		E252	+			O224	-		G5	G514	+
		E253	-			O232	+			G5141	-
		E254	-			O234	+			G522	-
		E3	E322			-	O3			O313	+
	E332		+		O321	+				G524	+
	E333		+		O324	+			////////	////////	
	E34		E341		+	O341			+	////////	////////
						O342			+	////////	////////

	E3	E344	+		O4	O343	+		////////	////////	////////
		E352	+			O344	+		////////	////////	////////
		E353	+			O411	+		////////	////////	////////
		E354	+			O412	+		////////	////////	////////
	E4	E 411	-			O413	+		////////	////////	////////
		E 412	+			O414	-		////////	////////	////////
		E413	+			O421	+		////////	////////	////////
		E414	+			O422	+		////////	////////	////////
		E421	+			O423	+		////////	////////	////////
		E422	-			O431	+		////////	////////	////////
		E423	+			O433	+		////////	////////	////////
		E424	+			O434	+		////////	////////	////////
		E432	+			O441	+		////////	////////	////////
		E433	+			O4411	-		////////	////////	////////
		E441	+			O442	+		////////	////////	////////
		E442	+			O443	+		////////	////////	////////
		E451	+			O444	+		////////	////////	////////
		E452	+			O451	+		////////	////////	////////
	E453	+	O452			+	////////		////////	////////	
	E454	-	O453			+	////////		////////	////////	
	E5	E511	+			O461	+		////////	////////	////////
		E512	+			O462	+		////////	////////	////////
		E513	+			O463	+		////////	////////	////////
		E521	+			O464	+		////////	////////	////////
		E522	-			////////	////////		////////	////////	////////
		E523	-			////////	////////		////////	////////	////////
		E532	+			////////	////////		////////	////////	////////
	E543	+	////////			////////	////////		////////	////////	

Annexe 4 : quantification des produits de la PCR par spectrophotomètre.

Isolats	Gène <i>glnII</i>			Gène <i>recA</i>			Gène <i>nodC</i>		
	ng/µl	Abs.	A260/A280	ng/µl	Abs.	A260/A280	ng/µl	Abs.	A260/A280
G131	36.6	0.62	1.82	59.3	1.07	1.93	100.5	1.49	1.79
G132	39.7	0.78	1.80	51.3	1.16	1.74	93.8	1.73	1.74
G122	42.7	0.66	1.78	53.5		1.72	84.6	1.29	1.83
G124	57.4	1.42	1.70	59.1	1.01	1.78	77.1	1.28	1.73
G241	32.6	0.68	1.88	48.2	1.48	1.73	66.4	1.16	1.88
G242	31.3	2.05	1.91	52.1	0.80	1.81	57.1	0.78	1.83
G211	38.2	0.68	1.88	53	0.79	1.73	76.1	1.65	1.83
G312	43.2	1.28	1.88	61.1	1.23	1.77	112.7	2.18	1.76
G315	34.4	0.90	1.76	45.2	0.76	1.82	76.2	0.91	1.82
G321	37.5	0.88	1.86	68.8	1.27	1.70	57	0.72	1.83
G421	31.8	0.67	1.73	53.2	1.18	1.79	76	1.35	1.78
G422	46.5	1.17	1.85	61.1	1.15	1.74	91.1	1.43	1.73
G424	37.9	0.57	1.86	66.3	1.99	1.68	88.7	1.42	1.79
G431	44.9	0.83	1.82	82.2	1.38	1.83	121.3	2.57	1.87
G4311	40.8	0.83	1.87	71	1.24	1.69	107.2	1.55	1.82
G514	23.3	0.41	1.82	54.1	0.82	1.89	78.4	1.47	1.84
G524	43.3	0.98	1.75	40.8	0.76	1.74	72.7	1.01	1.87
E114	68.4	1.43	1.86	36.6	0.91	1.66	59.8	0.82	1.86
E131	53.5	1.35	1.85	27	0.65	1.69	64.7	1.13	1.81
E141	41.2	0.56	1.83	32.8	0.58	1.76	76.4	1.04	1.77
E213	69.2	0.94	1.84	37.4	1.25	1.75	76.4	1.06	1.88
E222	43.4	1.11	1.78	23.5	0.70	1.97	68	0.98	1.86
E251	45	0.83	1.79	35.7	1.22	1.83	71.4	1.16	1.86
E353	45.4	0.94	1.82	87.2	2.67	1.66	49.6	0.79	1.78
E414	46.8	0.75	1.83	51.8	0.75	1.71	74.2	1.70	1.84
E421	64.3	1.32	1.71	60.2	1.11	1.76	65.6	0.83	1.85
E432	40.5	0.60	1.83	58.7	1.83	1.72	76.4	1.64	1.78

E441	59.1	1.04	1.82	58.7	1.35	1.71	81.6	1.26	1.84
E452	56.3	1.03	1.75	68	1.57	1.72	73.2	1.17	1.83
E521	66.3	1.39	1.72	54.3	1.05	1.68	66.6	0.96	1.85
E532	50.9	1.26	1.84	60.4	1.86	1.72	76.2	1.59	1.79
E543	40.6	0.69	1.73	53.4	1.44	1.66	44.6	0.84	1.82
O114	45.00	0.83	1.81	52.8	1.62	1.74	82.1	1.64	1.66
O144	48.6	0.71	1.80	54.3	1.27	1.80	72.8	1.23	1.78
O152	64.2	1.09	1.73	76.2	2.17	1.64	61.2	0.88	1.81
O172	35.5	0.81	1.80	43.8	1.09	1.85	37.9	1.47	1.72
O211	40.3	0.66	1.83	65.5	1.19	1.91	40.5	1.02	1.80
O213	26.8	0.523	1.87	86.1	2.64	1.66	59.2	1.42	1.72
O223	30.4	0.70	1.82	62.1	1.61	1.69	30.1	1.04	1.76
O313	37	1.14	1.82	116.7	4.18	1.61	49.6	1.03	1.74
O321	55	1.48	1.77	55.2	1.43	1.87	41.6	0.98	1.67
O344	19	0.56	1.88	43.7	1.23	1.77	57.5	1.64	1.64
O413	36.8	0.70	1.84	38.2	0.64	1.90	49.8	0.93	1.76
O422	32	0.70	1.82	34.8	0.95	1.87	48.5	0.89	1.70
O434	35.5	0.81	1.76	34.7	0.95	1.80	40.7	1.08	1.76
O442	23.4	0.86	1.78	39.5	0.59	1.77	35.6	0.59	1.73
O452	34.8	0.63	1.82	41.2	1.25	1.84	41.2	0.76	1.69
O461	36.3	1.01	1.78	37.2	1.49	1.82	44.8	0.72	1.83

Annexe 5 : Numéros d'accèsion de GenBank des souches types utilisées dans l'étude phylogénétique.

Souches types	Numéros d'accèsion	
	<i>recA</i>	<i>glnII</i>
<i>Sinorhizobium kummerowiae</i> CCBAU 71714 ^T	DQ411945.1	GU994062.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i> USDA 1002 ^T	AJ294382.1	AF169593.1
<i>Sinorhizobium medicae</i> A321 ^T	AJ294381.1	AF169592.1
<i>Sinorhizobium kostiense</i> HAMBI 1489 ^T	AM182141.1	GU994063.1
<i>Ensifer numidicus</i> ORS 1407 ^T	AM946576.1	HM997092.1
<i>Sinorhizobium saheli</i> LMG 7837 ^T	AM182138.1	AF169589.1
<i>Sinorhizobium terangae</i> HAMBI 220 ^T	AJ294383.1	AF169590.1
<i>Ensifer garamanticus</i> ORS 1400 ^T	AM946573.1	HM997091.1
<i>Sinorhizobium americanum</i> CFNEI 156 ^T	DQ411943.1	GU994065.1
<i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 205 ^T	AJ294379.1	AF169591.1
<i>Ensifer adhaerens</i> ATCC 33212 ^T	HM997099.1	HM997095.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6 ^T	AP012206.1	AF169582.1

Annexe 6 : Echelle d'interprétation de pH dans l'extrait aqueux 1/2,5 (Aubert, 1978).

Extrait 1 /2,5	
Valeur de pH	Classe d'interprétation
<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

Annexe 7 : Echelle d'interprétation de la salinité pour l'extrait 1/5 (USSS Staff, 1954 ; Aubert, 1978).

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