

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



UNIVERSITE KASDI MERBAH 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 : Microbiologie Appliquée

Par

Mme ATTAB Sara

La symbiose Rhizobium-Arachide (*Arachis hypogaea* L.) :
Caractérisation des microsymbiotes et l'effet de divers
facteurs sur la production d'inoculum.

Soutenue publiquement le : 07/11/2023

Devant le jury composé de :

Président	OULD EL HADJ-KHELIL Aminata	Pr	UKM Ouargla
Directeur de thèse	BISSATI BOUAFIA Samia	Pr	UKM Ouargla
Examineur	SALHI Nesrine	Pr	UKM Ouargla
Examineur	LAZALI Mohamed	Pr	Université Khemis Miliana
Examineur	KRAIMAT Mohamed.	MCA	Université de Ghardaïa
Examineur	HOUICHITI Rachid	MCA	Université de Ghardaïa

Année universitaire : 2022/2023

Remerciments

Cette thèse vient clôturer un long parcours qui est loin d'être linéaire, mais de nombreuses personnes m'ont aidé et conseillé afin que je trouve mon chemin et je voudrais les en remercier.

Ma profonde reconnaissance à **Mme BISSATI BOUAFIA Samia** (Professeur à l'université KASDI Merbah Ouargla), qui fut pour moi plus qu'une directrice de thèse. Malgré ses nombreuses charges, elle a toujours été attentive et disponible. J'aimerais la remercier pour tout le temps qu'elle m'a consacré tout au long de ces années, tant sur le plan personnel que scientifique. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur.

Mon appréciation et ma gratitude vont aussi à **Mme OULD EL HADJ KHELIL Aminata** (Professeur à l'université KASDI Merbah Ouargla), pour l'honneur qu'elle m'a fait de présider mon jury de thèse. Mes gratitudes vont aussi à **Melle SALHI Nesrine** (Professeur à l'université KASDI Merbah Ouargla), à **M. LAZALI Mohamed** (Professeur à l'université de Khemis Meliana), à **M. KRAIMAT Mohamed** (Maitre de conférences à l'université de Ghardaïa) et à **M. HOUICHITI Rachid** (Maitre de conférences à Ghardaïa) pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet. En effet, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes, en particuliers : **AZIB Salim**, **LAMRANI Cherifa**, **SALHI Nesrine**, dont la générosité, la bonne humeur, l'intérêt manifesté et leurs idées constructives à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser sereinement.

J'adresse aussi mes remerciements 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, je ne peux terminer sans remercier les membres de ma famille qui ont eu foi en mes capacités. Je salue mes très chers parents, source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. C'est avec une immense gratitude et une grande affection que je reconnais votre soutien qui m'a aidé à transformer mes rêves en réalité. J'aimerais aussi remercier mes frères pour leur soutien sans faille en toute circonstance. Un grand merci à mes beaux parents pour leur soutien et encouragement.

ATTAB Sara

A mes petits anges

ADAM, MERIEM et INES ALAA

La symbiose Rhizobium-Arachide (*Arachis hypogaea* L.) : Caractérisation des microsymbiotes et l'effet de divers facteurs sur la production d'inoculum.

Les rhizobiums sont des bactéries ayant un rôle vital pour l'apport d'azote, la fertilité du sol et la croissance des Fabacées. Connaître leur diversité dans les zones arides est un critère important pour la bonne gestion de ses écosystèmes fragiles.

L'évaluation de la biodiversité symbiotique de 48 bactéries, isolées à partir des nodosités de l'*Arachis hypogaea* L., cultivée à Ghardaïa et Ouargla, a permis d'une part, de déterminer le niveau de variabilité phénotypique des souches isolées, et d'autre part d'évaluer le comportement des bactéries face aux différentes conditions environnementales prédominantes dans les sols sahariens.

L'analyse de la vitesse de croissance des souches a révélé l'existence de souches à croissance rapide, moyenne et lente. Ce résultat explique qu'il s'agit probablement d'espèces rhizobiennes différentes.

La caractérisation phénotypique a mis en évidence une limite de tolérance de ces souches variant respectivement de 0 à 640 mM pour le NaCl et de 6 à 9 pour le pH avec des températures optimales de croissance entre 28 et 37°C. L'antibiogramme a révélé une importante résistance des souches aux 12 antibiotiques qui dépasse les 85% pour le groupe de bêta-lactamines et allant jusqu'à 100% pour la netilmicine. Cette antibiorésistance intrinsèque est un signe de compétitivité des souches avec d'autres populations microbiennes dans le sol. Les essais biologiques des extraits de phage ont révélé un taux de résistance des isolats supérieur à 91%.

Une sélection de quatre souches, de cette collection a été réalisée, pour la production d'inoculum (liquide et solide). Des tests d'inoculation ont été réalisés sous différentes contraintes (biotique et abiotique). Les résultats obtenus ont montré que les stress salin et hydrique, ainsi que l'attaque fongique par le *Fusarium oxysporum*, ont affecté la croissance et le rendement de la plante. En revanche, l'inoculation a permis une tolérance significative des plantes vis-à-vis des différentes contraintes.

Ces résultats soulignent l'importance de l'inoculation par les Rhizobia et le rôle qu'elle peut jouer dans l'agriculture biologique reposant sur des procédés respectueux de l'environnement, avec double fonctionnalité comme biofertilisant, pour améliorer la croissance et le rendement de l'arachide, et agent de lutte biologique contre les maladies transmises par le sol dans les zones sahariennes d'Algérie.

Mots clés : Rhizobia, *Arachis hypogaea* L, diversité, inoculation, stress salin, stress hydrique, *Fusarium oxysporum*

The Rhizobium-Peanut (*Arachis hypogaea* L.) symbiosis: Characterization of microsymbionts and the effect of various factors on inoculum production

Rhizobiums are bacteria that play a vital role in nitrogen supply, soil fertility and the growth of Fabaceae. Knowing their diversity in arid zones is an important criterion for the good management of fragile ecosystems.

The evaluation of the symbiotic biodiversity of 48 bacteria, isolated from the nodules of *Arachis hypogaea* L., cultivated in Ghardaïa and Ouargla, made it possible, on the one hand, to determine the level of phenotypic variability of the isolated strains, and to on the other hand to evaluate the behavior of the bacteria in the face of the different predominant environmental conditions in the Saharan soils.

Analysis of strain growth rate revealed the existence of fast, medium and slow growing strains. This result explains that they are probably different rhizobial species.

The phenotypic characterization revealed a tolerance limit of these strains varying respectively from 0 to 640 mM for NaCl and from 6 to 9 for pH with optimal growth temperatures between 28 and 37°C. The antibiogram revealed a significant resistance of the strains to the 12 antibiotics which exceeds 85% for the group of beta-lactams and up to 100% for netilmicin. This intrinsic antibiotic resistance is a sign of strain competitiveness with other microbial populations in the soil. Bioassays of phage extracts revealed a resistance rate of isolates greater than 91%.

A selection of four strains from this collection was made for the production of inoculum (liquid and solid). Inoculation tests were carried out under different constraints (biotic and abiotic). The results obtained showed that salt and water stress, as well as fungal attack by *Fusarium oxysporum*, affected the growth and yield of the plant. On the other hand, the inoculation allowed a significant tolerance of the plants vis-à-vis the different constraints.

These results underline the importance of inoculation by Rhizobia and the role it can play in organic agriculture based on environmentally friendly processes, with dual functionality as a biofertilizer, to improve the growth and yield of groundnut, and biological control agent against soil-borne diseases in the Saharan zones of Algeria.

Key words: Rhizobia, *Arachis hypogaea* L, diversity, inoculation, salt stress, water stress, *Fusarium oxysporum*.

التكافل بين الريزوبيوم والجذور الفول السوداني (*Arachis hypogaea* L.): توصيف الكائنات الدقيقة المتعايشة وتأثير العوامل المختلفة على إنتاج اللقاح.

الريزوبيا هي بكتيريا ذات دور حيوي في إمداد النيتروجين وخصوبة التربة ونمو البقوليات. إن معرفة تنوعها في المناطق القاحلة معيار مهم من أجل تسيير أحسن لهذه الأنظمة البيئية الهشة.

أتاح تقييم التنوع البيولوجي لـ 48 سلالة بكتيرية، معزولة من عقد الفول السوداني *Arachis hypogaea* L، المزروعة في غرداية وورقلة، تحديد مستوى الاختلاف للسلاسل المعزولة، من ناحية. ومن ناحية أخرى لتقييم سلوك البكتيريا في مواجهة الظروف البيئية المختلفة السائدة في التربة الصحراوية.

كشف تحليل معدل نمو السلالة عن وجود سلاسل سريعة ومتوسطة وبطيئة النمو. توضح هذه النتيجة أنها ربما تكون أنواعًا مختلفة.

كشف توصيف النمط الظاهري عن حد تحمل هذه السلالات للملوحة يتراوح على التوالي من 0 إلى 640 ملي مولار لكلوريد الصوديوم ودرجة حموضة من 6 إلى 9، مع درجات حرارة نمو مثالية بين 28 و37 درجة مئوية. أظهرت مقاومة المضادات الحيوية مقاومة معنوية للسلاسل للمضادات الحيوية الـ 12 المستعملة والتي تزيد عن 85% لمجموعة البيتا لاكتام وتصل إلى 100% للنتيليميسين. هذه المقاومة الجوهرية للمضادات الحيوية هي علامة على القدرة التنافسية للسلالة مع المجموعات الميكروبية الأخرى في التربة. أظهرت الاختبارات الحيوية كذلك لمستخلصات الفيروسات أن معدل مقاومة العزلات البكتيرية يزيد عن 91%.

تم اختيار أربعة سلالات من هذه المجموعة لإنتاج اللقاح (السائل والصلب). أجريت اختبارات التلقيح تحت عوامل مختلفة (حيوية وغير حيوية). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الإجهاد الملحي والمائي، وكذلك الهجوم الفطري بواسطة *Fusarium oxysporum*، أثر على نمو وتطور النبات. من ناحية أخرى، سمح التلقيح بتحسين كبير لمقاومة النباتات مقابل العوامل المختلفة.

تؤكد هذه النتائج على أهمية التلقيح بواسطة الريزوبيا والدور الذي يمكن أن تلعبه في الزراعة العضوية على أساس عمليات صديقة للبيئة، مع وظيفة مزدوجة كسماد حيوي، لتحسين نمو وإنتاجية الفول السوداني، وعامل المكافحة البيولوجية ضد الأمراض التي تنقلها التربة في المناطق الصحراوية في الجزائر.

الكلمات المفتاحية: الريزوبيا، الفول السوداني ، التنوع ، التلقيح ، الإجهاد الملحي ، الإجهاد المائي ، *Fusarium oxysporum*.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma descriptif de la plante d'arachide	6
Figure 2: Mode d'infection et types de nodules chez les légumineuses dont l'arachide ...	12
Figure 3: Invasion rhizobienne	13
Figure 4 : Chronologie de quelques étapes importantes dans le développement des inocula microbiens	17
Figure 5 : Conservation des nodules par dessiccation.....	25
Figure 7 : Assemblage de Jarres de Léonard	27
Figure 8 : Effet de la température sur la croissance des isolats rhizobiens	41
Figure 9 : Effet du pH sur la croissance des souches isolées	44
Figure 10: Effet du NaCl sur la croissance des souches isolées.....	46
Figure 11: Halotolérance des isolats en fonction du type de croissance.	47
Figure 12: Croissance des isolats sur milieu de culture enrichi en glucides.	49
Figure 13: Croissance d'isolats s sur milieu de culture enrichi en acides aminés	52
Figure 14 : Pourcentage d'antibiorésistance des isolats nodulant l'arachide.	55
Figure 15: Pourcentage de résistance et de sensibilisé des isolats aux extraits de phage .	57
Figure 16: Dendrogramme construit selon la méthode UPGMA	59
Figure 17: Effets de l'inoculation de l'arachide avec diverses souches de Rhizobiums sur le nombre total de nodules (NN).	71
Figure 18: Effets de l'inoculation sur les paramètres de croissance de l'arachide	72
Figure 19 : Effets de l'inoculation sur le poids sec de l'arachide.	73
Figure 20: Effets de l'inoculation de l'arachide sur la fixation d'azote	75
Figure 21 : Effets du stress salin sur l'arachide	82
Figure 22: Effets du stress hydrique sur l'arachide.....	92
Figure 23: Représentation schématique de la méthode de confrontation directe sur boîte de Pétri.....	105
Figure 24 : Représentation schématique de la méthode de strie utilisée pour les tests d'antagonisme.	105
Figure 25 : Méthode de confrontation indirecte sur milieu de culture par action des substances volatiles entre les souches bactériennes et l'agent phytopathogène.....	106
Figure 26 : Méthode de confrontation à partir des zones d'inhibition.	107

Figure 27: Pourcentage d'inhibition (PI) du <i>Fusarium oxysporum</i> par confrontation directe avec les rhizobia..	111
Figure 28 : Pourcentage d'inhibition (PI) du <i>F. oxysporum</i> par confrontation indirecte avec les Rhizobia.....	112
Figure 29 : Pourcentage d'inhibition (PI) du <i>F. oxysporum</i> par confrontation avec les disques des zones d'inhibition.....	113
Figure 30: Double inoculation rhizobienne et fongique :	116
Figure 31 : Effet de la double inoculation rhizobiale et fongique.....	118

Liste des photos

Photo 1 : piégeage et collecte des nodules <i>in situ</i>	25
Photo 2 : Test d'authentification des isolats nodulant l'arachide.....	39
Photo 3 : Induction de nodosités sur les racines de jeunes plantes de l'arachide après inoculation.....	40
Photo 4: Antibiotogramme de quelques souches.	54
Photo 5 : Repiquages des souches sur boîtes de Pétri.	64
Photo 6 : Production des inoculums ;.....	66
Photo 7: Semis des graines et mise en place de l'expérimentation.	67
Photo 8: Croissance et développement des plantes inoculées.....	70
Photo 9 : Effet du stress salin sur l'arachide.....	81
Photo 10: Aspect macroscopique de <i>Fusarium oxysporum</i> sur milieu PDA	101
Photo 11: Aspect microscopique du <i>Fusarium</i> sur milieux PDA (Grx400)	102
Photo 12 : Identification de l'espèce <i>Fusarium oxysorum</i> par la méthode de Single Spore	103
Photo 13 : Aspect microscopique des hyphes du <i>Fusarium oxysorum</i> dans la zone de confrontation avec les rhizobia (Grx100).....	115
Photo 14 : Effet de la double inoculation Rhizobia et <i>Fusarium</i>	117

Liste des tableaux

Tableau 1: La répartition de la culture de l'arachide dans la wilaya de Ghardaïa .	8
Tableau 2 : Données géographiques et années d'échantillonnage.	24
Tableau 3 : Différentes caractéristiques phénotypiques des isolats étudiés.	34
Tableau 4 : Effet de la température sur les Rhizobia en fonction du type de croissance.	42
Tableau 5 : Effet du pH sur les Rhizobia en fonction du type de croissance.	44
Tableau 6: Effet de l'utilisation des différents sucres sur les rhizobia en fonction du type de croissance.	50
Tableau 7 : Codes des souches, site d'échantillonnage, type de croissance et localisation géographique.	63
Tableau 8: Résultats des analyses physico-chimiques du sol.	69
Tableau 9: Synthèse des moyennes de l'effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance, de rendement et de la fixation d'azote de l'arachide.	76
Tableau 10: Codes des souches, site d'échantillonnage, type de croissance et localisation géographique	79
Tableau 11 : Effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance et de rendement de l'arachide sous stress salin	84
Tableau 12 : Synthèse des moyennes de l'effet de l'inoculation sous contrainte saline sur les paramètres de croissance, de rendement de l'arachide.	87
Tableau 13 : Codes des souches, site d'échantillonnage, type de croissance et localisation géographique.	90
Tableau 14: Effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance et de rendement de l'arachide sous stress hydrique.	94
Tableau 15 : Synthèse des moyennes de l'effet de l'inoculation sous contrainte hydrique sur les paramètres de croissance, de rendement de l'arachide.	97

Table des matières

Introduction générale.....	16
CHAPITRE I.....	4
I-1 Importance de l'azote.....	4
I-1-1 Fixation biologique de l'azote.....	4
I-2 Symbiose rhizobiums- arachide	5
I-2-1 Origine et systématique de l'arachide (Arachis hypogaea L.)	5
I-2-2 Importance de l'arachide.....	6
I-2-2-4 Production mondiale de l'arachide	7
I-2-2-5 Production de l'arachide en Algérie	7
I-2-2-5-1 Cas de la wilaya de Ghardaïa	8
I-2-5 Les rhizobia nodulant l'arachide.....	9
I-3 Stratégies permettant d'établir des symbioses rhizobium-légumineuse	9
I-3-1 Préinfection	9
I-3-2 Voies d'invasion bactérienne.....	11
I-3-3 Processus impliqués lors de la symbiose racine-nodule de l'arachide	12
I-3-4 Développement et différenciation nodulaire.....	13
I-3-5 La symbiose fixatrice d'azote en fonction des paramètres environnementaux	14
I-4 Importance de l'inoculation	15
I-4-1 Développement de l'inoculation	16
I-4-2 Production industrielle d'inoculum	17
I-4-2-1 Le choix du support	17
I-4-2-2 Le choix de la souche.....	18
I-4-2-3 Le choix du milieu de.....	18
I-4-3 Formulation d'un inoculant et les méthodes d'inoculation	19
I-4-3-1 Inocula solides	19
I-4-3-2 Inocula liquides	20
I-4-3-3 Inocula granulaires.....	20
I-4-3-4 Inocula lyophilisés	21
I-4-3-5 Inocula mixtes.....	22
CHAPITRE II :.....	24
II. Isolement des rhizobiums à partir des nodules	23

II- 1 Méthodes d'échantillonnage et de conservation des nodules	24
II-2-Isolement et conservation des Rhizobia	25
II-3- Authentification des isolats	26
II-3-1-Préparation des jarres de Léonard	26
II-3- 2 Désinfection des graines et semis	27
II-3- 3 Inoculation des jarres.....	27
II-4 Etude de la diversité des souches	28
II-4 -1 Test du bleu de bromothymol (BTB).....	28
II-4 -2 Test du rouge Congo.....	28
II-4-4 Tests nutritionnels.....	29
II-4-5 Critères physiologiques des colonies.....	30
II-4-5-1 Effet de la température	30
II-4-5-2-Effet du pH	30
II-4-5-3-Effet de la salinité.....	30
II-4-5-4-Evaluation de la croissance	31
II-4-5-5 Calcul du temps de génération des bactéries	31
II-4-6 Caractérisation des Rhizobia par la résistance aux antibiotiques	31
II-4-7 Caractérisation des Rhizobia par la sensibilité aux phages	32
II-4-7-1 La technique de spot test	33
II-4-8 Analyse des données.....	33
II-5 Résultats et discussion	33
II-5-1 Caractérisation et identification morphologique des isolats.....	33
II-5-1-1 Pouvoir acidifiant ou alcalinisant des isolats (sur milieu YMA + BTB)..	36
II-5-1-2 Observation microscopique	37
II-5-1-3 Croissance sur le milieu YMA –Rouge Congo (RC)	37
II-5-1-4 Temps de génération.....	37
II-5-2 Authentification symbiotique des isolats.....	39
II-5-3 Caractérisation écophysiologique des isolats	40
II-5-3-1 Effet de la température	40
II-5-3-2 Effet du pH	43
II-5-3-3 Effet de la salinité	46
II-5-3-5 Utilisation des acides aminés.....	52
II-5-4 Antibiorésistance des isolats.....	54

II-5-5 Lyse des phages	56
II-5-5 Taxonomie numérique des traits phénotypiques	58
CHAPITRE III :	62
III-1 Matériel et Méthodes.....	63
III-1-1 Matériel biologique	63
III-1-2 Matériel végétal	64
III-1-3 Production d'inoculum.....	64
III-1-4 Préparation du support solide	65
III-1-4-1 Détermination de l'humidité du support	65
III-1-4-2 Détermination du volume d'inoculum absorbé par le support	66
III-1-5 Conduite de la culture.....	66
III-1-5-1 L'inoculation des graines d'arachide	67
III-1-6 Les paramètres étudiés	68
III-1-7 Analyse des données	68
III-2 Résultats et discussion.....	69
III-2-1 Caractéristiques physico-chimiques du substrat de culture.....	69
III-2-2 Effet des souches sur la croissance de la plante	70
III-2-2-1 Morphologie des plantes inoculées	70
III-2-2-2 Effet de l'inoculation sur la nodulation.....	70
III-2-2-3 Effet de l'inoculation sur la croissance	72
III-2-2-4 Effet de l'inoculation sur le poids sec des plantes.....	73
III-2-2-5 Effet de l'inoculation sur la fixation d'azote.....	74
III-2-2-6 Réponse de l'arachide à l'inoculation par les Rhizobia	76
Chapitre IV :	78
IV-1 Matériel et méthodes	79
IV-1-1 Matériel biologique	79
IV-1-2 Matériel végétal.....	80
IV-2 Conduite de la culture	80
IV-2-1 Les paramètres étudiés	80
IV-3 Analyse des données	80
IV-4 Résultats et Discussion.....	81
IV 4-1 Caractéristiques physico-chimiques du substrat de culture.....	81
IV 4-2 Effet de l'irrigation avec de l'eau salée sur le développement de l'arachide ..	81

IV 4-3 Effet de l'inoculation avec des souches de rhizobium sélectionnées et du stress salin sur la croissance de l'arachide	83
IV 4-3-1 Effet de l'inoculation sur le poids sec	85
IV 4-3-2 Effet de l'inoculation sur la hauteur des tiges et la longueur racinaire	85
IV 4-3-3 Effet de l'inoculation sur la nodulation.....	86
Chapitre V :	89
V-1 Matériel et méthodes	90
V-1-1 Matériel biologiques.....	90
V-1-2 Matériel végétal	90
V-1-3 Dispositif expérimental et mise en place de l'essai	90
V-1-4 Paramètres étudiés	91
V-2 Analyses statistiques.....	91
V-3 Résultats et discussion.....	92
V-3-1 Caractéristique physico-chimique du substrat de culture	92
V-3-2 Effet de la dose d'irrigation sur le développement de l'arachide.....	92
IV -3-4 Réponse de l'arachide à l'inoculation sous stress hydrique.....	97
Chapitre VI :	100
Activité antagoniste, <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> , des Rhizobia nodulant l'arachide vis à vis de <i>Fusarium oxysporum</i>	100
VI-1 Matériel et méthodes	100
VI-1-2 Matériel biologique	100
VI-1-2-1 Préparation de la souche fongique	100
VI-1-2-2 Préparation des souches rhizobiennes.....	103
VI-1-3 Potentialités antagonistes <i>in vitro</i> des isolats rhizobiens vis-à-vis du <i>Fusarium oxysporum</i>	104
VI-1-3-1 Méthode de confrontation directe bactéries/champignon	104
VI-1-3-2 Méthode de confrontation indirecte bactéries/champignon	106
VI-1-3-3 Mise en évidence de la sécrétion de substance inhibitrice.....	107
VI-1-3-4 Lecture de la croissance des champignons.....	107
VI-1-3-4 Coloration et observation microscopique du champignon.....	108
VI-1-4 Potentialités antagonistes <i>in vivo</i> des isolats rhizobiens vis-à-vis du <i>Fusarium oxysporum</i>	108
VI-1-4-1 Préparation des inoculums bactériens et l'inoculum du pathogène	108

VI-1-4-2 Inoculation du pathogène et de l'antagoniste dans le même compartiment	109
VI-1-5 Analyses statistiques	110
VI-1-6 Résultats et discussions	110
VI-1-6-1 Antagonisme par confrontation directe sur boîte de Pétri.....	110
VI-1-6-2 Antagonisme par confrontation indirecte sur boîte de pétri.....	112
VI-1-6-3 Antagonisme à partir des zones d'inhibition.....	113
VI-1-6-4 Observations microscopiques des hyphes	114
VI-1-7 Antagonisme <i>in vivo</i> des rhizobiums vis-à-vis de <i>Fusarium oxysporum</i>	116
VI-1-7-1 Effet de la double inoculation rhizobienne et fongique sur l'incidence de la maladie et de la nodulation.....	116
VI-1-7-2 Effet de la double inoculation rhizobienne et fongique sur la croissance et le rendement	118
Conclusion et perspectives	121
Références bibliographiques	125

Introduction générale

Les Fabacées jouent un rôle crucial dans les régimes alimentaires traditionnels de nombreuses régions du monde et offrent une multitude d'avantages à la fois au sol et aux autres cultures qui les suivent dans les systèmes de rotation. Elles contribuent largement à la réduction de la pauvreté en améliorant la sécurité alimentaire, la nutrition et la santé, et en préservant la base de ressources naturelles (**Kebede, 2020**).

Leur succès dépend de leur capacité à former des symbioses fixatrices d'azote (SFN) efficaces avec les rhizobiums (**Tariq et al., 2020**). La fixation symbiotique de l'azote fait partie des processus microbiologiques les plus importants sur terre, essentiels au développement d'une agriculture durable par lesquels l'azote atmosphérique se transforme en ammoniac à l'aide d'une enzyme clé appelée nitrogénase (**Oldroyd et al., 2011 ; Udvardi et Poole, 2013**). L'azote fixé est directement utilisable par la plante et, avantageusement, il est moins sensible à la dénitrification, volatilisation et lessivage (**Herridge, 2008**). En effet, cette symbiose leur permet une production en abondance des protéines même en absence de fertilisation azotée (**Pérez-Montaña et al., 2014, Kumar et al., 2020**).

L'efficacité de la fixation biologique de N₂ diffère selon la plante hôte et les rhizobiums déclenchant une nodulation régulée par une communication biochimique et génétique spécifique entre eux (**Sijilmassi et al., 2020**). Selon **Wang et al (2019a)**, 21 genres bactériens ont été identifiés comme des microsymbiontes formant des nodules, appelés collectivement « rhizobia ».

Cependant, de nombreux sols agricoles n'ont pas une quantité adéquate de rhizobiums en termes de nombre, de qualité et d'efficacité pour former une fixation efficace de l'azote (**Zahran, 1999 ; Abbasi et al., 2010**). Ces circonstances nécessitent l'introduction d'inoculants et la manipulation de la rhizosphère des légumineuses par inoculation avec des rhizobiums pour permettre une nodulation et une fixation de l'azote efficaces ainsi qu'une augmentation ultérieure de la productivité agricole (**Wolde-Meskel et al., 2018 ; Matse et al., 2020**). Cette approche a fait l'objet de plusieurs études dans plusieurs pays dans le monde. Cependant, une contribution efficace de la FBN nécessite des souches élites et spécifiques à la plante cultivée, adaptées aux conditions biotiques et abiotiques locales, ainsi qu'un génotype de la plante adéquat (**Yadav et al., 2021**).

Parmi les oléagineux économiques, l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) est la deuxième légumineuse cultivée dans le monde (**Kavi Kishor et al., 2018**). C'est une importante source de protéines pour la nutrition humaine et de revenus pour les agriculteurs (**Mandou et al., 2017**). L'arachide est considérée comme une espèce très promiscuité du fait qu'elle est nodulée par un groupe très diversifié rhizobiums, à croissance lente et rapide, capables de noduler d'autres légumineuses (**Taurian et al., 2006 ; Bogino et al., 2010 ; Agraw, 2017**).

Cette plante est efficacement développée dans un sol sablonneux (**El-Sherbeny et al., 2023**). Récemment sa culture prend de l'ampleur au sud algérien, principalement au sud de la Wilaya de Ghardaïa, sur une superficie cumulée de près de 450 hectares (**DSA, 2016**). Toutefois, le développement de sa culture, traditionnellement dans les régions arides, reste limité, voire en régression, en raison d'une forte instabilité de leur rendement (**Kraïmat, 2018**). Par conséquent, une stratégie respectueuse de l'environnement, rapide et rentable pour optimiser le rendement de sa culture doit être développée. Une approche microbiologique impliquant l'utilisation de rhizobactéries bénéfiques favorisant la croissance des plantes (PGPR) semble être une approche clé qui s'est avérée sans danger pour l'environnement et peu coûteuse (**Naveed et al., 2014**). Parmi de nombreuses rhizobactéries utiles, les rhizobiums ont une fonction importante dans la promotion de la croissance et le développement des plantes dans des situations de stress (**Yadav et al., 2021**). Les rhizobia peuvent augmenter la disponibilité des nutriments dans la zone racinaire, en particulier N et P, sécréter plusieurs hormones végétales, produire des molécules qui inhibent les agents pathogènes, ainsi que modifier la chimie de la rhizosphère impliquant la régulation des niveaux d'éthylène (**Jaiswal et al., 2020**).

Cependant, il existe des facteurs limitants qui restreignent l'utilisation d'inoculants dans certaines régions. Les stress biotiques et abiotiques peuvent affecter l'efficacité du produit, le rendant inefficace dans des cas tels que les sols pauvres en nutriments ou déséquilibrés, la salinité, le stress hydrique, l'augmentation des températures, les ravageurs et les maladies fongiques, entre autres (**Das et al., 2017 ; Khan et al., 2017 ; Samago et al., 2018**). Pour contourner ces facteurs, plusieurs études dans le monde ont été adressées pour mieux connaître les propriétés intrinsèques du PGPR, en cherchant à comprendre leurs conditions optimales de croissance et leur interaction avec les plantes hôtes (**Jiménez-Gómez et al., 2018 ; Singh et al., 2023**). Des efforts ont également été

déployées pour améliorer l'efficacité des micro-organismes déjà disponibles (**Benidire et al., 2017 ; Manasa et al., 2017**). De plus en plus, les études visent à isoler, identifier et évaluer la capacité des rhizobia à promouvoir la croissance des plantes avec un potentiel de transformation en nouveaux inoculants microbiens, à utiliser dans des conditions environnementales défavorables et stressantes, telles que les zones fréquemment touchées par la sécheresse, les sols à faible disponibilité en éléments nutritifs ou à salinité élevée (**Koskey et al., 2017 ; Youseif et al., 2017**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre thèse qui vise en premier lieu à réaliser un isolement, une caractérisation et un screening des Rhizobia autochtones nodulant l'arachide cultivée au Sahara Septentrionale Est Algérien. En deuxième lieux, une sélection des meilleures souches fera l'objet d'un essai de production d'inoculum. Ce dernier sera testé sous diverses contraintes biotiques et abiotiques.

Le manuscrit de la thèse est organisé de la manière suivante :

- **Un premier chapitre** est consacré à une synthèse bibliographique ayant trait à l'association rhizobium-légumineuses, son établissement de la symbiose, son importance et les techniques de production d'inoculum et d'inoculation ;
- **Un deuxième chapitre** concerne l'étude de la diversité phénotypique, physiologique et symbiotique des rhizobia associées à l'arachide ;
- **Un troisième chapitre** est consacré à la production d'inoculum rhizobien et à l'essais d'inoculation de l'arachide ;
- **Un quatrième chapitre** est dédié à l'étude de la réponse de l'arachide, à l'inoculation sous l'effet du stress salin ;
- **Un cinquième chapitre** concerne l'étude de la réponse de l'arachide à l'inoculation sous stress hydrique.
- **Un sixième chapitre**, quant à lui, traite l'étude de la réponse de l'arachide à l'inoculation sous l'influence d'une attaque fongique, cas du *Fusarium oxysporum*.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique

I-1 Importance de l'azote

L'azote est un élément chimique indispensable au développement des organismes vivants et occupe la quatrième place en termes d'abondance dans le corps humain. Il joue un rôle fondamental en tant que constituant de nombreuses molécules biologiques telles que les protéines et les acides nucléiques (**Howarth., 2002 ; Wang et al., 2012**). À l'état moléculaire (N₂), qui représente 79 % de l'atmosphère, l'azote est très inerte et ne peut pas être directement assimilé par les plantes et les animaux. Cependant, il constitue l'un des principaux facteurs limitant le développement de la vie, car tous les organismes eucaryotes sont incapables de l'utiliser sous cette forme moléculaire (**Kaye et Hart, 1997 ; Galloway et al., 2003 ; Vitousek et al., 2010**).

I-1-1 Fixation biologique de l'azote

En l'absence d'influences humaines, les principaux processus naturels responsables de la formation d'azote biodisponible sont la production de NO_x par la foudre, qui représente environ 5 Tg de N/an, et la fixation biologique qui se produit dans les écosystèmes terrestres et aquatiques, contribuant à hauteur de 198 Tg de N/an. Ces deux processus sont considérés comme les seules sources de nouveaux composés azotés dans l'environnement (**Erisman et al., 2013 ; Fowler et al., 2013 ; Stocker et al., 2016**).

La principale source d'azote dans le système "sol-plante-animal" provient de la fixation biologique du diazote atmosphérique (N₂), c'est-à-dire sa conversion en molécules organiques assimilables. Seuls certains organismes procaryotes, tels que les bactéries et les archées appelés diazotrophes, sont capables de réduire le diazote atmosphérique en ammoniac grâce à une enzyme appelée nitrogénase. Cet azote organique se retrouve ensuite dans les micro-organismes et les tissus végétaux, et peut être utilisé pour la formation des tissus animaux. Finalement, il retourne dans le sol, soit par la mort des organismes, soit par l'excrétion (**Müller et Clough, 2014**). Les diazotrophes se trouvent dans différents habitats, soit de manière libre (sols, eau, air, etc.), soit en interaction avec des organismes eucaryotes, notamment dans la rhizosphère des plantes, ou encore en symbiose avec d'autres organismes capables de fixer l'azote (**Dixon et Kahn, 2004 ; Genermont et Cellie, 2016**).

Les études phylogénétiques basées sur l'ADN ribosomique 16S des eubactéries ont révélé que les capacités de fixation de l'azote sont présentes dans de nombreux groupes bactériens. Cette capacité de fixation de l'azote semble donc être très ancienne et

a probablement joué un rôle crucial dans l'établissement et le maintien de la vie sur Terre (**Raven et Edwards, 2001**). Dès les premiers stades de l'histoire de notre planète, les micro-organismes ont développé la capacité d'utiliser des enzymes pour convertir le N₂ en NH₄⁺ (**McRose et al., 2017**).

I-2 Symbiose rhizobiums- arachide

I-2-1 Origine et systématique de l'arachide (*Arachis hypogaea* L.)

Communément appelée arachide ou cacahuète (Peanut ou Groundnut en anglais), noix de singe ou noix de terre en raison du développement de sa graine sous le sol (**Sanders, 2003**), l'arachide est une plante herbacée annuelle largement appréciée pour sa valeur alimentaire et industrielle. Elle est cultivée dans les zones agro-climatiques tropicales et subtropicales d'Asie, d'Afrique et des Amériques (**FAO, 2010 ; USDA, 2012**).

L'arachide est originaire d'Amérique du Sud (Gregory et al., 1980). Le centre d'origine du genre *Arachis* est très probablement situé dans la région centre-sud du Brésil, à l'est des Andes, dans une zone qui s'étend du sud-est de la Bolivie au nord-ouest de l'Argentine, au nord du Paraguay et à l'ouest du Mato Grosso au Brésil. C'est dans cette région que l'espèce sauvage *Arachis monticola*, considérée comme son ancêtre probable, est largement présente (**Jarvis et al., 2003 ; Ferguson et al., 2005**). On a suggéré que *Arachis hypogaea* était le résultat d'un croisement entre *Arachis cardenasii* et *Arachis batizocoi*, les deux parents étant présents en Bolivie (**Sanders, 2003**). Elle aurait été domestiquée il y a plus de 3 500 ans. Au XVI^e siècle, les Portugais l'ont introduite en Afrique, en Inde et en Extrême-Orient à partir du Brésil.

La classification de l'arachide selon Linné (1973) est décrite comme suit :

Règne	Plantae
Super Embranchement	Spermaphytes
Sous-Embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida (dicotylédones)
Sous-classe	Rosidae
Ordres	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous-famille	Papilionoidaea
Genre	<i>Arachis</i>
Espèce	<i>hypogaea</i> L. 1753



Figure 1 : Schéma descriptif de la plante d'arachide (Demol, 2005)

Les caractéristiques morphologiques les plus distinctives du genre *Arachis* sont ses structures souterraines, y compris les fruits, les structures rhizomateuses, les systèmes racinaires et les hypocotyles (voir figure 1). Cette plante, mesurant de 20 à 90 cm de hauteur, peut avoir une tige dressée ou rampante, et présente des caractéristiques spécifiques rapportées par **Hekimian (2009)** :

- Un système racinaire pivotant avec des ramifications latérales ;
- Plusieurs tiges, dont une principale et des ramifications ;
- Des feuilles composées de couleur verte plus ou moins foncée, avec une structure pennée et portant deux ou trois paires de folioles membraneuses ;
- Des épis de 3 à 5 fleurs complètes et sessiles de forme papilionacée et de couleur jaune ;
- Un fruit qui se développe dans le sol à une profondeur de 3 à 5 cm.

I-2-2 Importance de l'arachide

L'arachide, une espèce oléagineuse, est l'une des rares légumineuses à produire des fruits souterrains largement utilisés dans le monde (**Mayeux, 1999**). Elle est riche en lipides (44 % à 56 %), en protéines (22 % à 30 %), en glucides (5 % à 12 %), en fibres (3 %), en potassium, en phosphate et en magnésium (**Conkerton et al., 1989**). Des études menées aux États-Unis ont démontré qu'une consommation bihebdomadaire d'arachides aux États-Unis ont démontré qu'une consommation bihebdomadaire d'arachides et/ou de produits dérivés améliorerait la qualité des régimes alimentaires (**Griel et al., 2004**). Cette

amélioration se traduisait par une augmentation de l'apport en protéines, en matières grasses totales, en acides gras polyinsaturés et monoinsaturés, en fibres, en vitamine E, en acide folique, en sels minéraux (calcium, magnésium, zinc et fer), ainsi qu'une augmentation globale de l'apport énergétique. De plus, des études médicales ont montré que la consommation de noix en général, et d'arachides en particulier, réduisait les risques de maladies cardiovasculaires (**Fraser, 2000 ; Albert et al., 2002**).

Grâce à sa teneur en huile, à son adaptabilité, à sa capacité à restaurer la fertilité des sols et à son utilisation dans l'alimentation animale, l'arachide est une excellente plante oléagineuse. Elle est utilisée sous différentes formes pour l'alimentation humaine et animale (**Adrian et Jacquot, 1968**). Dans l'alimentation humaine, elle est consommée de diverses manières : arachides bouillies ou grillées en coque, arachides décortiquées grillées et consommées nature ou enrobées de sucre, beurre d'arachide, huile d'arachide, farine d'arachide. Dans l'alimentation animale, les fanes (tiges et feuilles) de l'arachide ainsi que les tourteaux (sous-produits de l'extraction de l'huile) sont utilisés comme sources protéiques de haute qualité. Les pellicules d'arachide sont souvent utilisées en remplacement du son de blé dans les rations animales. De plus, l'huile d'arachide de seconde extraction est utilisée dans l'industrie du savon, et les coques peuvent être brûlées pour produire de l'énergie (Foncéka, 2010).

I-2-2-4 Production mondiale de l'arachide

L'arachide, qui est la douzième culture végétale la plus cultivée au monde, est présente sur tous les continents, dans environ 120 pays, avec une superficie totale de 31,17 millions d'hectares et une production de 45,84 millions de tonnes. Sa valeur de production est estimée à environ 23,9 milliards de dollars américains (**FAOSTAT, 2013**).

Les principaux pays producteurs sont, par ordre d'importance, la Chine, l'Inde, le Nigeria et les États-Unis d'Amérique. Ces quatre pays représentent à eux seuls plus de 65 % de la production mondiale.

I-2-2-5 Production de l'arachide en Algérie

Selon **Kraïmat (2018)**, malgré son importance économique, la culture d'arachide reste pratiquée à petite échelle ce qui a imposé sa grande importation. Cinq wilayas du pays sont productrices, et les surfaces dédiées à cette culture sont principalement

localisées au Nord-est (El-Taref, Skikda), au Sud (Ghardaïa, Adrar et El-Oued). La culture est menée durant la période estivale, avec un choix de géotypes destinés à la consommation.

En Algérie, la productivité reste faible et en fluctuation permanente d'une année à une autre. Le rendement moyen de l'arachide ne dépasse pas 20 qx/ha sur une surface de 3391 ha **(FAO, 2018)**. Sa culture n'a pas connu d'évolution significative depuis 1995 à 2015 tant sur le plan des superficies cultivées que des productions **(MADR, 2015)**.

Les faibles rendements de l'arachide peuvent, en partie, être attribués à la mauvaises qualité des sols Algériens, à la non disponibilité des semences de qualité, ainsi qu'aux pratiques culturales peu adaptées. Selon **Touil, (2017)**, plusieurs facteurs peuvent promouvoir le développement de cette culture, qui seront à l'origine de l'augmentation des rendements comme ; le respect de la rotation, les travaux de préparation du sol, l'utilisation de semences saines, la fertilisation, la conduite de l'irrigation et les traitements phytosanitaires.

I-2-2-5-1 Cas de la wilaya de Ghardaïa

Dans la wilaya de Ghardaïa, la culture de l'arachide se déroule encore selon des méthodes traditionnelles, principalement sur de petites exploitations familiales. Les agriculteurs utilisent des semences à faible rendement et disposent d'une faible expertise technique. L'introduction de cette culture dans la région remonte aux années 1930.

Lors de la campagne arachidière de 2021, une production de 7450 quintaux d'arachide a été enregistrée. La campagne s'est concentrée sur 400 hectares de terres sablonneuses irriguées, réparties dans plusieurs localités. Les détails de la répartition de la culture de l'arachide dans la région sont présentés dans le tableau 1 **(DSA, 2021)**.

Tableau 1: La répartition de la culture de l'arachide dans la wilaya de Ghardaïa (DSA, 2021).

Commune	Superficie (ha)
Sebseb	324
Mansoura	55 ha
Hassi-Lefhal	14 ha
Daya Ben-Dahoua	5 ha
El-Menea	2 ha

I-2-5 Les rhizobia nodulant l'arachide

L'arachide (*Arachis hypogaea* L.) est considérée comme une espèce très promiscue du fait qu'elle est nodulée par un grand groupe de rhizobia non apparentés capables de noduler un groupe diversifié de légumineuses (Sharma et al., 2016). 18% des rhizobiums à croissance rapide et lente isolés du niébé sont capables de former des nodules efficaces avec l'arachide (Thies et al., 1991 ; Mpeperekiki et al., 1996).

Malgré son importance agronomique et économique, les études sur les rhizobia nodulant l'arachide sont rares ; les exemples incluent ceux exécutés en Argentine (Taurien et al., 2006 ; Bogino et al., 2006), en Afrique (El-Akhal et al., 2008 ; Law et al., 2007) et en Chine (Zhang et al., 1999). L'arachide forme principalement des nodules racinaires efficaces avec les Bradyrhizobia. Plusieurs études ont montré une diversité phénotypique et génétique des isolats des bradyrhizobia nodulant des arachides (Li et al., 1999 ; Zhang et al., 1999), qui peuvent être nodulés par plusieurs espèces comme *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium lablabi*, *Bradyrhizobium yuanmingense*, *Bradyrhizobium iriomotense*, *Bradyrhizobium arachidis* et *Bradyrhizobium zhengyangense* (Taurien et al., 2006 ; El-Akhal et al., 2008 ; Munoz et al., 2011 ; Chang et al., 2011 ; Wang et al., 2013 ; Zhang et al., 2023). L'arachide est également nodulée par des rhizobiums à croissance rapide tels que *Rhizobium giardini*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium pakistanensis* et *Rhizobium pongamiae* (Khalid et al., 2014 ; de Lyra et al., 2013 ; Pandey et Chakraborty, 2019).

I-3 Stratégies permettant d'établir des symbioses rhizobium-légumineuse

La mise en place de la symbiose rhizobienne peut se diviser en trois grandes étapes:

I-3-1 Préinfection

L'organogénèse des nodules comporte plusieurs étapes qui débutent par un dialogue moléculaire, nécessaire à la reconnaissance mutuelle entre la plante et ses symbiontes (Oldroyd, 2013 ; Lindström et al., 2015). Ce dialogue est initié par la plante qui, en condition de carence azotée, diffuse dans la rhizosphère des composés phénoliques chimioattractifs (flavonoïdes), reconnus par les bactéries présentes dans l'environnement racinaire proche (Weston et Mathesius, 2013 ; Tohge et al., 2017). Ces molécules sont excrétées par le système racinaire des plantes et représentent les premiers signaux perceptibles par la microflore de la rhizosphère (Mönchgesang et al., 2016). Ces

flavonoïdes remplissent plusieurs fonctions déterminantes. Tout d'abord, ils attirent les rhizobia vers les racines des plantes, puis induisent chez les rhizobia l'activation de l'expression des gènes de nodulation (gène *nod*), ce qui se traduit par la synthèse des lipochitooligosaccharides (LCO), molécules clefs également connues sous le nom de facteurs Nod (Van Damme et al., 2004). Plusieurs molécules telles que des lectines sont produites par la légumineuse afin d'attacher les bactéries au niveau des racines (Van Damme et al., 2004). Les rhizobia possèdent également des exopolysaccharides (EPS) et des lipopolysaccharides (LPS) de surface qui sont essentiels au bon déroulement de l'interaction (Gibson et al., 2008). Avant de pénétrer les tissus racinaires des légumineuses, les rhizobia colonisent la surface racinaire sous forme d'un biofilm microbien (Wisniewski-Dyé et Downie, 2002). Les adhésines bactériennes et les lectines végétales de la paroi cellulaire favorisent l'adhésion des bactéries à la surface de la racine (Van Rhijn et al., 2001). La perception du facteur Nod bactérien entraîne généralement des réponses morphologiques, physiologiques et moléculaires distinctes et spatiotemporelles dans les racines, aboutissant à la formation des nodules.

I-3-1-1 Bases moléculaires de la préinfection chez l'arachide

La plupart des espèces de rhizobia au sein des α - et β -protéobactéries forment des symbioses nodulaires racinaires (SNR) par NF-dépendant en utilisant les facteurs Nod pour établir une symbiose avec les plantes (Ibáñez et al., 2011).

À quelques exceptions chez les légumineuses tempérées comme *Aeschynomene* sp., *Sesbania* sp. et *Arachis* sp, les facteurs Nod ne sont pas nécessaires, et les rhizobiums utilisent d'autres stratégies, (Masson-Boivin et Sachs, 2018, Sharma et al., 2020). Chez l'arachide, deux modes différents de symbioses nodulaires racinaires (SNR) ont été signalés : (i) NF-dépendant et (ii) NF-indépendant (Guha et al., 2016 Chaintreuil et al., 2016). Ce dernier mode, implique l'utilisation d'effecteurs (une molécule de type cytokinine) capables d'activer la voie de signalisation symbiotique commune et d'établir une symbiose fixatrice d'azote (Okazaki et al., 2016, Masson-Boivin et Sachs, 2018).

Cependant, bien qu'il soit principalement décrit comme une légumineuse NF-dépendante, l'arachide conserve une forme résiduelle et moins efficace de symbiose NF-indépendante (Guha et al., 2022).

I-3-2 Voies d'invasion bactérienne

Chez les légumineuses, lors de la symbiose nodulaire, l'invasion rhizobienne peut suivre trois voies d'entrée qui sont déterminé par l'hôte : (1) à travers les poils absorbants, (2) à travers les plaies, en particulier là où les racines adventives apparaissent, et (3) entre des cellules épidermiques intactes.

Le mode d'infection et les différents types de nodules formés chez les légumineuses sont illustrés dans la figure 2. Invasion des poils absorbants, qui conduit à la formation d'un cordon d'infection entraînant l'enroulement des poils absorbants qui emprisonne les bactéries dans une boucle, permettant leur entrée dans les poils absorbants par l'hydrolyse des parois cellulaires et l'invagination de la membrane (Figure 3). C'est le mécanisme le mieux étudié impliqué dans la nodulation racinaire (**Brewin, 2004**). Le cordon pénètre dans le cortex racinaire et se ramifie, il traverse les cellules corticales pour atteindre les ébauches nodulaires ou primordium, où les bactéries sont libérées à l'intérieur des cellules (**Gage, 2004**). Le primordium se transforme ensuite en nodule, alors que les rhizobia se différencient en bactéroïdes, séparés du cytoplasme des cellules végétales par une membrane péribactérienne d'origine végétale. L'unité fixatrice d'azote formée par le bactéroïde, l'espace et la membrane péribactéroïdiens est appelé symbiosome (Jones et *al.*, 2007). Cette invasion se produit chez les membres des sous-familles de légumineuses *Mimosoideae* et *Papilionoideae*, comme le pois, le soja, la vesce, la luzerne... Cependant, chez *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes sp.* et *Aeschynomene sp.*, les structures similaires aux cordons d'infection n'ont jamais été observées (**Chandler, 1978**).

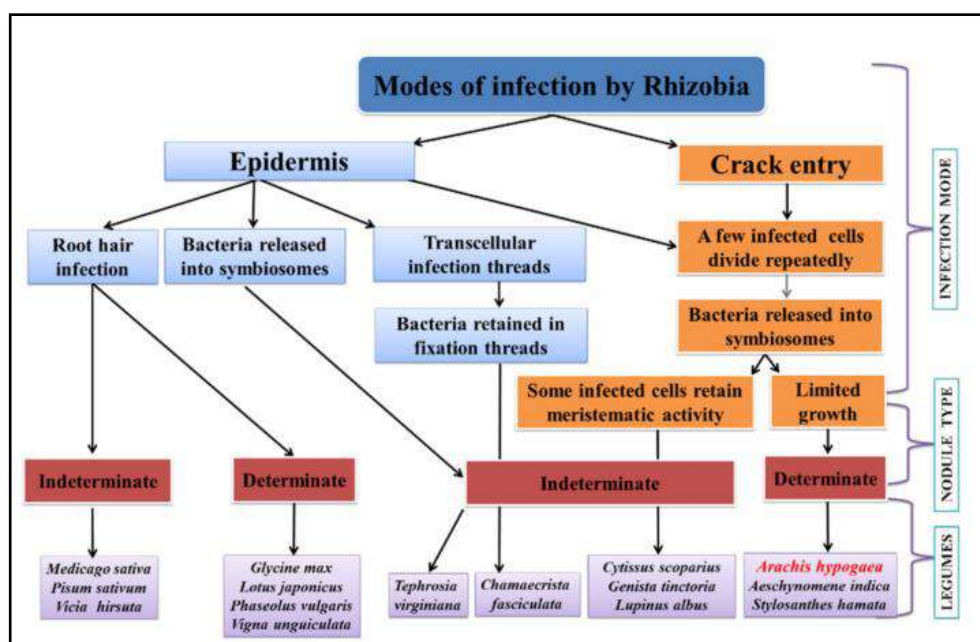


Figure 2: Mode d'infection et types de nodules chez les légumineuses dont l'arachide (Sharma, 2020)

I-3-3 Processus impliqués lors de la symbiose racine-nodule de l'arachide

Chez l'arachide, le mécanisme d'invasion des rhizobia diffère des autres légumineuses (figure 3). La pénétration et la propagation des Bradyrhizobia dans le cortex racinaire se produit, sans formation de cordon d'infection et implique une invasion intercellulaire ou crack entry (Sprent, 2007). Dans certains cas une courbure des poils latéraux a été observée lors d'une infection par des rhizobiums apparentés à l'arachide, et bien que les ces Rhizobia se soient avérées piégées dans cet endroit, mais cela n'a jamais conduit à une progression du cordon d'infection comme chez d'autres légumineuses (Vega-Hernández et al., 2001, Paudel et al., 2020).

Dans les cellules corticales, les rhizobia se multiplient rapidement et les cellules envahies se divisent à plusieurs reprises, donnant naissance au nodule. Cette infection intercellulaire est considérée comme un ancien mécanisme d'invasion révolutionnaire, ce qui pourrait être la clé pour faciliter la transformation des non-légumineuses pour la fixation biologique de l'azote (Oldroyd et al., 2011, Okubo et al., 2012a).

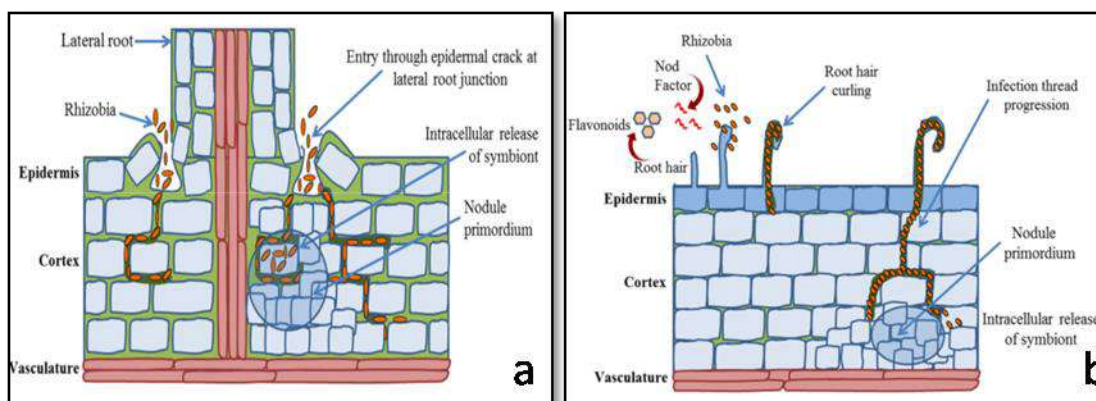


Figure 3: Invasion rhizobienne ; a) par les fissures de l'épiderme, b) par les poils absorbants (Sharma, 2020).

I-3-4 Développement et différenciation nodulaire

La réussite de l'organogenèse nodulaire après internalisation bactérienne conduit à la formation d'un nodule actif, un organe racinaire unique dédié à la fixation de l'azote (**Den Herder et Parniske, 2009**). Le type de nodule formé dépend de la plante hôte et non pas de son symbionte. Généralement, les légumineuses tempérées (pois, luzerne, trèfle, etc.) forment des nodules indéterminés, tandis que les légumineuses tropicales (arachide, soja, haricot, etc.) forment habituellement des nodules déterminés (**Hirsch, 1992**). Cependant, certaines plantes comme *Sesbania rostrata* peuvent former des nodules des deux types en fonction des conditions environnementales. La distinction entre les deux types de nodules se fait notamment selon le site d'initiation des divisions cellulaires dans le cortex. Les nodules indéterminés se développent à partir des cellules du cortex interne, tandis que les nodules déterminés se développent à partir des cellules du cortex externe (**Fernandez-Lopez et al., 1998**).

Les nodules de l'arachide peuvent être attribués morpho-anatomiquement sous le type aeshynoménoïdes qui se développent à l'aisselle de l'émergence des racines latérales et sont de nature déterminée, avec une forme oblatsphéroïdes, de 1 à 5 mm de diamètre, la zone infectée n'est pas entrecoupée de cellules non infectée (**Corby et al., 1988**). Après que les cellules corticales envahies cessent de se diviser, la forme antérieure en forme de bâtonnet des cellules rhizobiennes se différencie en bactéroïdes sphériques gonflés encapsulé individuellement dans des sacs membranaires pér bacté riens. Étroitement emballés dans le cytoplasme des cellules corticales. Après l'établissement de

nodules symbiotiquement fonctionnels, les bactéries différenciées convertissent le diazote moléculaire en ions ammonium. Les bactéroïdes sont le siège du processus de la fixation biologique de l'azote pour la plante (**Jones et al., 2007**)

La leghémoglobine joue un rôle essentiel dans la régulation de la concentration en oxygène à l'intérieur du nodule, maintenant une valeur très faible d'environ 10 nM, ce qui est compatible avec l'activité de la nitrogénase nécessaire à la fixation de l'azote (**Ott et al., 2005**). Une fois que les nodules sont matures et que le processus de fixation d'azote est fonctionnel, ils prennent généralement une couleur rosée en raison de la présence de leghémoglobine. En revanche, la présence de nodules blancs indique que la symbiose n'est pas fonctionnelle (**Valverde et al., 2005**). La couleur rosée des nodules est donc un indicateur visuel de leur activité de fixation d'azote.

I-3-5 La symbiose fixatrice d'azote en fonction des paramètres environnementaux

Les rhizobia sont capables de survivre pendant de longues périodes dans le sol et peuvent se développer rapidement s'ils infectent une légumineuse compatible. Même la présence d'une seule bactérie peut conduire à la formation d'une nodosité fixatrice d'azote contenant plus de 10^8 cellules bactériennes sur les racines des légumineuses (**Chen et al., 2008**).

Cependant, l'état physiologique de la légumineuse hôte joue un rôle crucial dans le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote (**Zahran, 1999 ; Emamverdian et al., 2015**). Le potentiel de fixation d'azote d'une souche compétente de rhizobia, capable d'établir une symbiose avec une légumineuse, ne peut 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, d'un pH du sol défavorable, d'un excès ou d'un manque d'humidité, d'un dysfonctionnement de la photosynthèse, d'une infection par des phytopathogènes ou encore d'une exposition à des toxicités métalliques (**Brockwell et al., 1995**). Ces observations sont en accord avec la théorie selon laquelle "le niveau de production d'une culture ne peut pas dépasser le maximum déterminé par le facteur limitant" (**Brockwell et al., 1995**). En d'autres termes, les conditions environnementales défavorables peuvent limiter la capacité de la plante à tirer pleinement parti de la symbiose fixatrice d'azote avec les rhizobia.

I-4 Importance de l'inoculation

La fixation biologique de l'azote inorganique joue un rôle crucial dans la production alimentaire durable et respectueuse de l'environnement. Les rhizobia sont largement étudiés et considérés comme une priorité dans la recherche en biotechnologie en raison de leur importance fondamentale pour la croissance des légumineuses et la production alimentaire (**Catroux et al., 2001**). Grâce à leur relation symbiotique avec les rhizobia, les légumineuses sont capables de convertir l'azote atmosphérique en une forme utilisable par les plantes. Cette capacité réduit la dépendance aux engrais azotés chimiques, contribuant ainsi à la durabilité de l'agriculture et à la préservation de l'environnement.

La recherche en biotechnologie se concentre sur l'exploration et l'exploitation des interactions entre les légumineuses et les rhizobia. Cela comprend l'identification et la sélection de souches de rhizobia efficaces, adaptées à différentes espèces de légumineuses, ainsi que l'amélioration des connaissances sur les mécanismes moléculaires qui régissent cette symbiose.

En comprenant et en optimisant ces interactions, la recherche en biotechnologie vise à améliorer les rendements des cultures légumineuses, à renforcer la sécurité alimentaire et à promouvoir une agriculture durable. Les travaux dans ce domaine contribuent à la recherche de solutions innovantes pour une production alimentaire soutenue, tout en préservant les ressources naturelles et en réduisant l'impact environnemental. La fertilité du sol peut être améliorée en incorporant légumineuses dans le système de culture et/ou utilisation d'inoculants rhizobiens qui non seulement augmentent la fixation d'azote mais améliorent également la fertilité du sol et la production agricole à travers plusieurs autres attributs (**Zahir et al., 2018**). L'incorporation des légumineuses à graines dans le système de culture peut également être utile pour améliorer la productivité des cultures céréalières.

De plus, les rhizobiums des nodosités racinaires non seulement fixent l'azote atmosphérique en présence de légumineuse hôte (**Bhattacharyya et Jha 2012**), mais aussi favorisent et stimulent la croissance des cultures des légumineuses et céréalières, augmentent le rendement et réduisent l'infection par des agents pathogènes, tout en améliorant la tolérance aux stress biotiques et abiotiques (**Sahara et Nehra, 2011**,

Tavares et al., 2018, Gauthier-Coles et al., 2019). Cela est dû à d'autres caractéristiques telles que la solubilisation et mobilisation des minéraux comme le phosphore (**Khan et al., 2010**), production de sidérophores (**Lebrazi et Fikri-Benbrahim, 2018**), production de phytohormones telles que l'auxine, la cytokinine, acide gibbérellique et l'éthylène dans le sol (**Kour et al., 2020c**), acide cyanhydrique (HCN), antibiotiques, enzymes hydrolytiques et exopolysaccharides (**Duan et al., 2009 ; Monteiro et al., 2012**).

I-4-1 Développement de l'inoculation

L'inoculation de légumineuses est une vieille pratique agricole appliquée depuis des siècles (**Ahemad et Kibret, 2014**). Traditionnellement, cette méthode impliquait un transfert du sol entourant les racines et les nodosités de légumineuses et le mélanger directement avec des semences (**OCDE, 1995**).

L'inoculation des rhizobia présente plusieurs avantages, tels que l'augmentation de la nodulation, de l'absorption d'azote, de la physiologie de la plante, de la croissance des tiges et des racines, ainsi que du rendement des cultures (**Ahmad et al., 2013; Abou-El-Hassan et al., 2020**). Cependant, l'efficacité des inoculants peut varier considérablement d'une souche à l'autre. Plusieurs facteurs influencent la quantité d'azote fixé, notamment l'efficacité de la relation symbiotique entre la plante hôte et le rhizobium, la capacité de la plante hôte à accumuler l'azote, la disponibilité d'azote dans le sol, ainsi que les contraintes environnementales liées à la fixation de l'azote (**Van Kessel et Hartley, 2000 ; Ogutcu et al., 2008 ; Allito et al., 2014**).

L'inoculation des graines de légumineuses par les rhizobia est considérée comme l'une des réussites majeures de la microbiologie appliquée du sol, avec des millions d'hectares ayant été inoculés depuis le début de cette pratique (**Naseer et al., 2019**). En 2017, le premier inoculant a été produit pour l'arachide au Ghana, grâce à un partenariat avec le Brésil (figure 4). Un an après l'établissement de la première usine industrielle de production d'inoculant en Afrique, les producteurs d'arachides ont bénéficié de ce produit, et les résultats se sont révélés très prometteurs (**Santos et al., 2019**). Cette avancée représente une étape importante pour l'amélioration de la production alimentaire et la promotion de l'agriculture durable, en favorisant une meilleure utilisation de l'azote atmosphérique par les légumineuses.

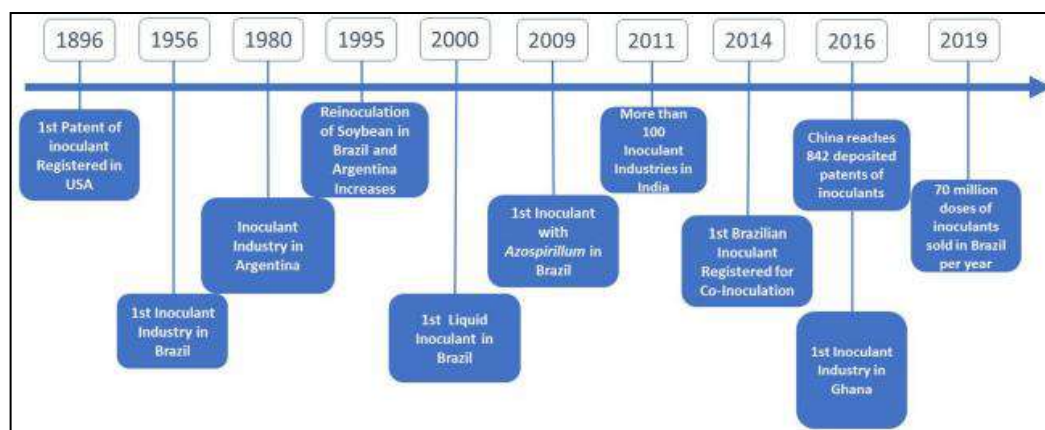


Figure 4 : Chronologie de quelques étapes importantes dans le développement des inocula microbiens (Santos et *al.*, 2019)

I-4-2 Production industrielle d'inoculum

Depuis plus d'un siècle, les inoculants de rhizobium et de bradyrhizobium sont utilisés, et leur production commerciale a commencé en 1895 aux États-Unis et au Royaume-Uni (**Brockwell et Bottomley, 1995**). De nos jours, ils sont fabriqués dans de nombreux pays à travers le monde, sur tous les continents. Lors de la production d'inoculants, trois principaux aspects nécessitent une attention particulière : (i) la qualité et le traitement du support utilisé, (ii) la pureté de la souche bactérienne, et (iii) l'obtention d'un nombre suffisamment élevé de cellules dans le bouillon et le produit final (Stephens et Rask, 1999).

I-4-2-1 Le choix du support

Un aspect important est le choix du support pour les micro-organismes, qui devrait, entre autres, assurer une longue viabilité cellulaire et être d'application facile (**Santos et *al.*, 2019**). Lors du choix d'un matériau brut pour servir de support à l'inoculant, plusieurs critères sont pris en compte, tels que la disponibilité, la qualité régulière et le coût. Il est essentiel que le matériau choisi favorise la croissance de la bactérie souhaitée et maintienne une population bactérienne dans l'inoculant pendant une durée adéquate. Afin d'atteindre ces objectifs, le support doit présenter une capacité élevée de rétention d'eau, une homogénéité chimique et physique, et surtout, il doit être non toxique pour la souche d'inoculant ainsi que pour l'environnement (Smith, 1992).

I-4-2-2 Le choix de la souche

Le choix de la souche est primordial afin d'obtenir un inoculant de qualité. La souche bactérienne sélectionnée a besoin d'être compétitive avec les populations indigènes du sol afin d'être en mesure d'effectuer adéquatement la nodulation de leur plante hôte. Bien sûr, elle doit être exempte de toutes contaminations (**Smith, 1992 ; Stephens et Rask, 2000**). Plusieurs travaux ont également constaté une variabilité entre les sols en raison de conditions physiques et chimiques. **Shishido et Pepper (1990) et Sattar et al., (1995)** rapportent que les souches les plus efficaces pour une culture donnée, dans une région géographique donnée, sont souvent des souches isolées de cette région. La base d'une telle réponse écosystémique a fait l'objet des études considérables par des écologistes microbiens.

Utiliser simplement une souche présentant une fixation de N_2 *in vitro* n'est pas acceptable. L'inoculant doit présenter à la fois une fixation acceptable de N_2 et une compétitivité, pour que l'inoculant soit efficace. Pour tenter de surmonter les difficultés souche/sol/cultivar, des produits multi-souches ont été étudiés (**Stephens et Rask, 2000**).

I-4-2-3 Le choix du milieu de culture

Comme mentionné précédemment, la production d'inoculants nécessite divers éléments nutritifs. Différents milieux de culture sont disponibles pour répondre à ces besoins (Burton, 1979). Dans le domaine de la biotechnologie, des recherches sont constamment menées pour trouver des milieux alternatifs plus économiques. Des études ont ainsi été réalisées sur l'utilisation de sous-produits de l'industrie laitière (Bissonnette et al., 1986), de l'industrie papetière (Butt, 1992), des distilleries (Briardi et Ertola, 1985) et des brasseries (Gondwe et al., 1999). Les boues générées par les stations de traitement des eaux usées sont également explorées en tant que milieu de culture alternatif offrant des conditions favorables à la croissance de *Rhizobium*. Ces sous-produits ou déchets municipaux présentent l'avantage d'être peu coûteux, facilement accessibles et riches en éléments nutritifs (**Rebah, 2001 ; Reddy et al., 1983**).

I-4-3 Formulation d'un inoculant et les méthodes d'inoculation

Les inoculants sont normalement commercialisés sous trois formes différentes : en liquide, en poudre ou sous une forme granulaire dans un support organique comme la tourbe (**Stephens et Rask, 1999**).

I-4-3-1 Inocula solides

Tout d'abord il a été utilisé comme support inerte de la gélose et du sable, puis il a eu recours à la tourbe, qui est devenue un standard dans ce secteur. De même, d'autres types de support (vermiculite, lignite, cellulose et certains déchets industriels) ont été testés (**Walter, 1992 ; Muniruzzaman, 1992 ; Ajay et al., 1996**). Le choix de la tourbe comme support pour inoculants est dû à sa richesse en matière organique, qui constitue une source importante de nutriments pour les micro-organismes. Elle offre également une protection physique aux micro-organismes contre les adversités du sol et permet une meilleure survie des cellules dans des conditions de restriction hydrique et de températures élevées (**Hungria et al., 2000a**). Selon **Bashan et al., (2014)**, les résidus industriels et sous-produits agricoles tels que la canne à sucre, la bagasse, la sciure ou les déchets de brasserie peuvent être utilisés comme supports pour l'inoculation de micro-organismes. Cependant, la principale limite à l'utilisation de ces matières premières est leur composition peu cohérente, ainsi que des difficultés de stérilisation (**Santos et al., 2019**).

Dans le processus d'inoculation des graines avec de la tourbe, il est essentiel utiliser des adhésifs pour aider à coller ce support aux graines ; comme la gomme arabique ou bien une solution de saccharose à 10 % (**Hungria et al., 2000a**). L'inoculum à base de tourbe doit être emballé dans des sacs en polyéthylène stérilisé ou en polypropylène, ce qui préserve l'humidité mais garantit l'échange de gaz avec le milieu extérieur (**Hungria et al., 2005**). Cependant, la sur l'exploitation des tourbières, peut entraîner de graves impacts environnementaux, y compris les émissions de CO₂. De plus, dans des pays où il y a peu de tourbières, l'importation de ce matériau est nécessaire, ce qui augmente les coûts de production (**Ribeiro et al., 2013**).

I-4-3-2 Inocula liquides

Les formulations liquides ont commencé à gagner de la place, surtout à partir de la fin des années 1990. Au Brésil, le premier l'inoculum liquide a été approuvé par le Ministère de l'Agriculture à usage commercial en 2000, et une décennie plus tard près de 80 % des inocula vendus dans le pays étaient en formulations liquides ; une proportion similaire est trouvée en Argentine (**ANPII, 2018**). Les inoculants liquides sont constitués de cultures microbiennes en suspension dans un milieu liquide riche en nutriments et en protecteurs cellulaires. Ils sont faciles à manipuler et compatibles avec le semis mécanisé. Un autre avantage est la facilité de stérilisation, favorisant/facilitant l'absence de contaminants et, par conséquent, permettant une concentration cellulaire plus élevée (**Bashan et al., 2014 ; Cassân et al., 2015**)

En plus de l'inoculation des graines, les inoculants liquides permettent des méthodes d'application alternatives, telles que dans le sillon, et par pulvérisation sur le sol ou par application « foliaire » (**Campo et al., 2010 ; Fukami et al., 2016 ; Moretti et al., 2018**). L'inoculation dans le sillon peut être avantageuse pour atténuer l'impact des pesticides utilisés pour le traitement des semences au contact de la bactérie (**Campo et al., 2010**).

I-4-3-3 Inocula granulaires

Commercialisés depuis 1975, les granulés peuvent être fabriqués par : l'imprégnation des bouillons de culture sur des granulés préformés (l'alginate et le polyacrylamide, minéraux ou polymères hydrophiles) qui absorbent l'inoculant dans la matrice granulaire. Les produits granulaires sont classés dans une gamme de tailles de particules allant de 0,5 mm à 5 mm de diamètre. Les particules les plus petites sont meilleures pour la distribution des rhizobiums sur une zone de culture (**Howieson et Dilworth, 2016**). Utilisation de granule d'argile sèche permet le maintien de la survie des cellules rhizobiales et leur protection de la dessiccation dans une matrice argileuse et organique, analogue à la façon dont les rhizobiums existent naturellement dans de nombreux sols. La survie dans le support d'argile a été liée à la formation d'une couche protectrice autour des cellules par des minéraux argileux en raison de la charge de surface interactions (**Santos et al., 2019**).

Les bradryrhizobiums survivent en général en plus grand nombre dans les argiles acides, tandis que les espèces de rhizobium à croissance plus rapide préfèrent les argiles alcalines. Le nombre de rhizobia par gramme est généralement plus faible dans les granules d'argile sèche que dans les granules humides, diminuant d'environ 10^9 par g au mélange à 10^7 par gramme lorsqu'il est sec (**Howieson et al., 2013**). Les granulés ont généralement une teneur en humidité inférieure à celle des inoculants de tourbe et ont donc l'avantage de ne pas nécessiter de réfrigération. Certains granulés secs se sont révélés efficaces pour introduire des inoculants dans les sols secs en protégeant les cellules rhizobiales jusqu'à l'arrivée des pluies (**Loi et al., 2012**).

La méthode d'encapsulation la plus utilisée, consiste à mélanger goutte à goutte avec un polymère adjuvant, capable de provoquer la solidification, ce qui donne des billes solides à haute concentration cellulaire. Les inoculants granulaires sont pratiques à utiliser car ils peuvent être appliqués directement sur le sol et il n'est pas nécessaire de préparer des bouillies adhésives pour inoculer. Les granules sont mis en contact avec les graines au moment du semis et les bactéries sont lentement libérées (**Howieson et Dilworth, 2016**). Ils sont biodégradables et n'ont pas d'impact sur l'environnement. L'encapsulation protège les cellules des hautes températures et des contraintes environnementales. Encore une fois, les facteurs économiques ont toujours représenté le principal obstacle à l'évolution de la production industrielle (**Bashan et al., 2002 ; Date 2001**).

I-4-3-4 Inocula lyophilisés

Comme l'un des défis de la production des inoculants est de maintenir la viabilité des cellules pendant une longue période, la lyophilisation et la congélation des cellules microbiennes sont apparues comme des possibilités pour surmonter ce problème. Le processus de lyophilisation consiste à éliminer l'eau intracellulaire, à réduire l'activité métabolique et à augmenter la durée de vie microbienne. La culture de cellules sèches doit être mélangée avec une formulation liquide ou en gel au semis. Le grand obstacle à la production commerciale d'inoculants avec des micro-organismes lyophilisés est le coût de production élevé car il nécessite un équipement spécialisé et une main-d'œuvre qualifiée (**Williams 1984**). De plus, le temps et les conditions nécessaires à la récupération des cellules dans des formulations liquides ou en gel représentent des

obstacles à l'adoption d'inoculants par les agriculteurs, notamment les grands arcs cultivés, comme pour la culture du soja en Amérique du Sud (**Hungria et al., 2005**).

I-4-3-5 Inocula mixtes

La grande majorité des premiers inoculants fabriqués ne contenait qu'une seule espèce de micro-organisme, et en général une souche, celle avec les meilleurs résultats d'inoculation pour une culture particulière. Les exceptions comprenaient un maximum de deux micro-organismes « du même type ». L'utilisation de deux souches dans le même inoculant augmenterait les chances de former des nodules efficaces avec la légumineuse (**Hungria et al., 1994 ; Hungria et Mendes, 2015**).

Particulièrement au cours de la dernière décennie, l'utilisation d'inoculants contenant des micro-organismes de "type différent" s'est développée. L'idée est de combiner des souches ou des espèces agissant dans différents processus microbiens, de sorte que les avantages combinés de chacune se traduisent par des rendements plus élevés (**Hungria et al., 2015**). Des exemples d'inoculants mixtes sont ceux qui associent des micro-organismes dont les principaux objectifs sont la production de bactéries fixatrices d'azote (BFN) (*Bradyrhizobium spp.*, *Rhizobium spp.*) et production de phytohormones (*Azospirillum spp.*, *Pseudomonas spp.*), la solubilisation du phosphate (*Bacillus spp.*) ou lutte biologique (*Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*). Si les micro-organismes ne peuvent être réunis en un seul produit, ils sont fabriqués séparément et les sachets contenant chacun sont vendus dans le même emballage (**Souza et Ferreira 2017 ; Nogueira et al., 2018**).

L'application d'inoculants mixtes est généralement appelée co-inoculation ou inoculation mixte et il est actuellement possible de trouver des co-inoculants pour plusieurs cultures sur le marché. L'efficacité de la co-inoculation est étroitement liée à la bonne sélection des souches, à la concentration cellulaire de chacune, à la méthode d'inoculation (appliquée à la semence, foliaire, en sillon), et au génotype de la plante. Par conséquent, des recherches sont nécessaires pour générer des connaissances visant à la production de nouvelles formulations d'inoculants commerciaux avec des bactéries mixtes (**Cassân et al., 2015**), et sur des méthodes alternatives d'application d'inoculants et de molécules microbiennes (**Campo et al., 2010 ; Fukami et al., 2016**).

De grands efforts ont été déployés par plusieurs industries pour développer de nouveaux produits capables de répondre aux nouvelles exigences du marché et compatibles avec les nouvelles technologies (**Hungria et al., 2013**). La tendance pour cette prochaine décennie est d'appliquer des investissements considérables dans l'innovation, à la recherche de nouvelles formulations d'inoculants pour atteindre le marché en croissance constante avec les meilleurs (**Santos et al., 2019**).

CHAPITRE II :

*Caractérisation phénotypique et
symbiotique des rhizobia nodulant
l'Arachide*

Introduction

Les plantes de la famille des Fabaceae, telles que l'arachide, jouent un rôle crucial dans le maintien de la productivité des systèmes agricoles grâce à leurs symbioses avec les bactéries fixatrices d'azote (BNF). Ces symbioses permettent de convertir l'azote atmosphérique en ammonium directement assimilable par les plantes, contribuant ainsi à la disponibilité d'azote dans le sol (**Okito et al., 2004**). En particulier, l'association entre l'arachide et les Rhizobia a un impact très bénéfique sur la fertilité des sols, apportant environ 40,9 kg d'azote par hectare (**André, 2016**). Cette capacité à fixer l'azote atmosphérique constitue un avantage majeur pour l'agriculture durable et la gestion des ressources en azote. Bien que l'arachide présente une large adaptation à plusieurs conditions du sol, cependant le rendement en gousses dépend largement de la disponibilité du phosphore et de l'azote. La fixation biologique de l'azote représente ainsi une alternative économique et écologique (**Melo et al., 2016**) qui peut être maximisée par l'utilisation d'inoculants contenant des souches rhizobiennes efficaces (**Sizenando et al., 2016 ; Valetti et al., 2016**).

De plus, malgré l'importance de l'arachide pour les systèmes agricoles des régions arides du Sud-est algérien, il existe peu d'informations concernant à la fois la biodiversité et l'efficacité symbiotique des rhizobia indigènes qui lui sont associées dans ces régions.

Pour cette raison, cette étude vise pour la première fois, à évaluer la biodiversité phénotypique, physiologique et symbiotique des rhizobiums associés à l'arachide cultivée dans les sols des régions de Ghardaïa et de Ouargla. L'identification et la sélection des souches indigènes les mieux adaptées aux conditions environnementales des régions d'étude serviront dans la formulation d'inoculants appropriés pour améliorer le rendement de cette culture.

II. Isolement des rhizobiums à partir des nodules

Compte tenu de l'importance des informations sur les populations de Rhizobiums indigènes par rapport à l'amélioration des pratiques de gestion agricole, nous avons effectué une caractérisation phénotypique et physiologique des rhizobiums isolés à partir de nodules racinaires de plantes.

II- 1 Méthodes d'échantillonnage et de conservation des nodules

Pour obtenir une collection de rhizobiums, des plantes d'arachide ont été récoltées à partir de plusieurs sites situés dans les régions de Ghardaïa et de Ouargla, entre les années 2013-2015 (tableau 2), en période automnale où les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines. Les nodules sont également obtenus indirectement, par piégeage, sur des échantillons de sols collectés d'exploitations ayant été cultivées en arachide.

Tableau 2 : Données géographiques et années d'échantillonnage.

Régions d'étude	Sites d'échantillonnage	Code des stations	Positions géographique	Type d'échantillonnage	Années D'échantillonnage
Ouargla	ITDAS (Hassi Ben Abdallah)	HBA	Lat.32°00'76''N Long. 5°46'27''E	Piégeage à partir du sol	Novembre 2014
Ghardaïa	Mansoura	EMA	Lat.31°95'50''N Long. 3°61'13''E	Piégeage à partir du sol	Novembre 2013
Ghardaïa	Mansoura	E1	Lat.31°95'97''N Long. 3°64'23''E	Collecte des nodules in situ	Novembre 2015
Ghardaïa	Mansoura	E2	Lat.31°95'50''N Long. 3°64'28''E	Collecte des nodules in situ	Novembre 2015
Ghardaïa	Sebseb	S1	Lat.32°14'04''N Long. 3°67'48''E	Collecte des nodules in situ	Novembre 2015
Ghardaïa	Sebseb	S2	Lat.32°15'70''N Long. 3°58'03''E	Collecte des nodules in situ	Novembre 2015
Ghardaïa	Sebseb	S3	Lat.32°4'45''N Long. 3°33'1.1''E	Collecte des nodules in situ	Novembre 2015
Ghardaïa	Sebseb (exp Boudjlel)	BDJ	Lat.32°12'15.4''N Long. 3°30'16.6''E	Collecte des nodules in situ	Novembre 2014
Ghardaïa	Sebseb (exp Hadj kara)	HK	Lat.32°11'9.8''N Long. 3°33'6.5''E	Collecte des nodules in situ	Novembre 2014
Ghardaïa	Sebseb	SR	Lat. 32°17'01''N Long. 3°57'52''E	Piégeage à partir du sol	Novembre 2013

La collecte des plantes sur le terrain se fait en suivant la méthode décrite par **Vincent (1970)**, qui consiste à creuser autour de la tige sur environ 15 cm de diamètre et 20 cm de profondeur afin d'extraire l'ensemble du système racinaire. Les racines sont ensuite placées dans des sachets et transportées au laboratoire pour procéder à la dissociation des nodules.

Pour ce qui est des cultures en pot, des échantillons de sol ont été prélevés dans la zone des 20 premiers centimètres de profondeur, avec des sols ayant déjà été cultivés avec de l'arachide. Une partie du sol prélevé a été répartie dans des pots en plastique de 3 litres de volume (voir photo 1). Dans chaque pot, trois graines ont été semées.



Photo 1 : Piégeage et collecte des nodules *in situ*.

Selon la méthode décrite par **Gourret et Rubulier (1985)**, les racines des plantes sont d'abord rincées à l'eau du robinet afin d'éliminer les impuretés. Ensuite, les nodules sont détachés des racines à une distance d'environ 1 à 2 cm de leur point d'attache. Une deuxième phase de rinçage est effectuée, suivie d'un séchage des nodules à l'aide de papier filtre. Pour assurer leur conservation, les nodules sont ensuite placés dans des tubes contenant du CaCl_2 et desséchés. Les tubes sont étiquetés et portent des informations telles que le lieu et la date de prélèvement (figure 5).

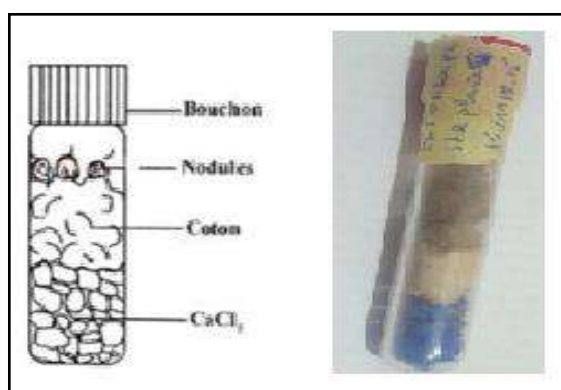


Figure 5 : Conservation des nodules par dessiccation.

II-2-Isolement et conservation des Rhizobia

Pour procéder à l'isolement des bactéries, trois à quatre nodules sont prélevés à partir de chaque plante, conformément à la méthode décrite par **Chen et al. (2014)**. Les nodules sélectionnés sont réhydratés en les plaçant dans des tubes à essais contenant de l'eau distillée pendant plusieurs heures. Ensuite, ils sont soumis à une désinfection superficielle en les plongeant dans de l'éthanol à 95° pendant 30 secondes. Par la suite, les nodules sont immergés dans une solution d'hypochlorite de sodium NaClO (2,5 % v/v) pendant 5 minutes, suivis d'une série de dix rinçages avec de l'eau distillée stérile,

conformément à la méthode décrite par Beattie et **Handelsman (1989)**. Toutes les opérations sont effectuées dans des conditions microbiologiquement contrôlées pour prévenir toute contamination.

Après avoir écrasé individuellement séparément les nodules dans quelques gouttes d'eau distillée stérile à l'aide d'une spatule stérile, le jus de chaque nodule a été délicatement étalé sur une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) selon la technique des quatre quadrants décrite par **Vincent (1970)**. Les boîtes ont ensuite été incubées à 28°C dans un incubateur.

Les colonies qui ont bien poussé et qui étaient bien individualisées ont été repiquées successivement sur de nouvelles boîtes jusqu'à l'obtention d'une culture pure et homogène. Les colonies ainsi purifiées ont été conservées à long terme en utilisant deux méthodes : au congélateur dans du glycérol (80%) et au réfrigérateur dans des tubes inclinés contenant le milieu YEMA supplémenté de CaCO₃ (3 g/l) selon les protocoles décrits par **Vincent (1970)** et **Beck et al. (1993)**

II-3- Authentification des isolats

Le test d'authentification, autrement appelé test de nodulation, permet d'une part de confirmer que les isolats sont bien des rhizobiums, et d'autre part d'évaluer la capacité de ces derniers à produire des nodules efficaces sur les racines de la plante hôte. Ce test permet d'évaluer le pouvoir nodulant des isolats obtenus par inoculation des plantules d'arachide dans des conditions d'asepsie totale (**Vincent, 1970 ; Beck et al., 1993**). Cette capacité est un critère de base pour l'authentification des isolats.

II-3-1-Préparation des jarres de Léonard

Pour ce test, des bouteilles en plastique ont été utilisées. Elles ont été coupées en deux compartiments. La partie supérieure de chaque bouteille a été remplie de sable déminéralisé stérile, tandis que la partie inférieure a été remplie d'une solution nutritive dépourvue d'azote selon le protocole de **Fahraeus (1957)** (Annexe 1). Les deux parties de la bouteille ont été reliées par un cordon stérile qui permet un apport continu de la solution nutritive dans la partie supérieure (Figure 6).

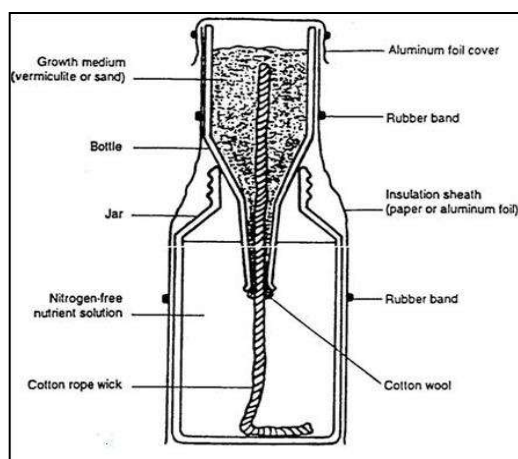


Figure 6 : Assemblage de Jarres de Léonard (Vincent, 1970).

II-3- 2 Désinfection des graines et semis

Les graines ont été désinfectées en surface par immersion dans l'hypochlorite de sodium à 6% pendant 5 mn, puis dans l'alcool à 95° pendant 15 secondes. Au final, une série de 7 rinçages à l'eau distillée stérile est effectuée pour enlever les traces de l'eau javel et de l'alcool.

Après désinfection, les graines ont été placées dans des boîtes de Petri contenant du papier filtre imbibé d'eau distillée stérile et mises à germer dans un incubateur, à l'obscurité, à une température de 25°C jusqu'à la germination. Les graines germées (Figure 6) ont ensuite été transférées dans des pots remplis de sable stérile, à raison d'une graine par pot. Les pots ont été ensuite placés dans une chambre de culture en conditions de température et de photopériode contrôlées (25°C, 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité).

II-3- 3 Inoculation des jarres

De chaque isolat, une colonie a été cultivée dans du milieu YEM liquide et placée dans un incubateur-agitateur à 150 tr/min et à 28°C. Après 72 heures, les graines germées ont été inoculées avec 1 ml de la suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance. Trois pots ont été utilisés pour chaque souche, tandis que ceux non inoculés ont été utilisés comme témoin (T0). Les plantes ont été irriguées trois fois par semaine en alternant entre une solution nutritive de Fahraeus (Vadez et al., 1996) et de l'eau distillée stérile.

Huit semaines après l'inoculation, les plantes ont été déterrées. Les nodosités formées sur les racines de chaque plante ont été dénombrées, et le poids sec de la partie végétative a été mesuré après un séchage à 70°C pendant 48 heures. Le nombre moyen de nodosités formées par plante pour chaque souche a été utilisé pour évaluer l'infectivité. La quantité totale d'azote (N) dans la plante entière a été mesurée en utilisant la méthode de Kjeldahl, qui consiste en la minéralisation de l'azote organique et la réduction des nitrates éventuellement présents.

II-4 Etude de la diversité des souches

Dans le but d'étudier la diversité des microsymbiotes de l'arachide, une caractérisation phénotypique a été réalisée sur tous les isolats de la collection. Cette caractérisation a permis de sélectionner les souches qui présentent une efficacité, une compétence et une tolérance aux différents stress environnementaux.

II-4 -1 Test du bleu de bromothymol (BTB)

La capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YEM a été évaluée en utilisant l'indicateur coloré bleu de bromophénol à une concentration de 0,0025% (p/v). Les boîtes inoculées ont été incubées à 28°C pendant 24 heures. Les réactions ont été identifiées en observant le changement de couleur du milieu. Une coloration jaune indique une réaction acide, tandis qu'une coloration bleu foncé indique une réaction basique, conformément à la méthode de **Vincent (1970)**.

II-4 -2 Test du rouge Congo

La plupart des rhizobiums, y compris le *Bradyrhizobium*, ne présentent pas la capacité d'absorber le rouge Congo lorsqu'il est ajouté à une concentration finale de 0,0025% (p/v) dans le milieu YEMA (**Kneen et La Rue, 1983 ; Ondieki et al., 2017**). En revanche, *Agrobacterium* est capable d'absorber facilement, ce qui entraîne une coloration initialement rose, puis noire (**Fentahun et al., 2013**). Les colonies de rhizobia qui se forment sur le milieu YEMA avec le rouge Congo présentent des caractéristiques telles qu'une couleur blanche, une texture translucide, une surface brillante, une élévation et une petite taille. Il est important de noter que les colonies d'*Agrobacterium* peuvent être des contaminants fréquents dans ce contexte.

II-4-3 Observations macroscopique et microscopique des isolats

Les colonies sont observées comme décrit par **Jordan (1984)** à l'œil nu, afin de voir leur aspect morphologique (taille, forme, aspects et couleurs, sur la boîte de Pétri).

Une observation microscopique a été réalisée par la technique de coloration de Gram. C'est la coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer le Gram, la forme et le mode d'association des bactéries.

II-4-4 Tests nutritionnels

Ces tests ont pour objectif d'évaluer la capacité d'un isolat à utiliser différents sucres en tant que seule source de carbone, ainsi que différents acides aminés en tant que seule source d'azote. Cela permet de déterminer les capacités métaboliques et les exigences nutritionnelles de chaque isolat.

a) Utilisation de la source de carbone

Les isolats ont également été examinés pour leurs capacités à utiliser diverses sources de carbone : Les souches ont été cultivées sur milieu YEMB sans mannitol. Ce dernier a été remplacé par l'un des sucres suivants : D-Saccharose, D-fructose, D-glucose, D-xylose, D-lactose, D-arabinose, D-maltose, D-raffinose, D-galactose. Un milieu de YEMB standard avec mannitol a été utilisé comme témoin.

Dans des tubes, contenant 5ml de milieu de culture, ont été inoculés avec 100µl d'inoculum en phase exponentielle de croissance. Le bouillon inoculé a été incubé à 28°C sous agitation constante (150 tr/min). La croissance des souches a été estimée par la mesure de la densité optique à 600 nm avec un spectrophotomètre après 3 à 7 jours d'incubation (**Jordan, 1984 ; Kumar et al., 2014**).

b) Utilisation des acides aminés comme source d'azote

Divers acides aminés tels que la valine, la tyrosine, la leucine, la proline, la lysine, la sérine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la cystéine, la méthionine et l'asparagine sont ajoutés au milieu YEMB qui ne contient pas de glutamate de sodium. Les tubes contenant les souches sont ensemencés et incubés à 28°C sous agitation à 150 tours par minute. La croissance des souches est évaluée après 3 à 7 jours d'incubation en mesurant la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm (**Jordan, 1984**).

II-4-5 Critères physiologiques des colonies

Les critères physiologiques testés se limitent aux plus importants facteurs de stress abiotiques prédominants, tels que la tolérance au salin, pH et température. Les tolérances aux facteurs de stress ont été effectuées sur milieu YEM solide et liquide à raison de trois répétitions pour chaque type de stress.

II-4-5-1 Effet de la température

Afin d'évaluer la croissance des isolats aux différentes températures, les souches sont mises en culture aux températures : 4°C, 28°C, 30°C, 37°C, 45°C et 50°C, pendant 3 à 7 jours, selon le type de croissance des souches (rapide ou lente). Les souches ont été mises en culture sur le milieu YMA et YMB. Sur milieu liquide, les tubes contenant 5 ml d'une solution de YMB ont été ensemencés par 100 µl d'une préculture fraîche et incubés dans un incubateur-agitateur à 150 tpm. Sur milieu YMA solide, l'ensemencement des différents isolats sur boîte de Pétri est effectué selon la technique des quatre cadrans ou par épuisement. Les protocoles suivis sont ceux décrits par **Vincent (1970)** et **Somageraran et Hoben (1985)**.

II-4-5-2-Effet du pH

Les souches ont été évaluées pour leur tolérance aux pH sur YEM liquide et solide dont le pH a été ajusté aux valeurs suivantes : 4, 5, 6, 7, 8 et 9 et incubées à 28°C pendant 3 à 7 jours, selon les protocoles décrits par **Vincent (1970)** et **Somageraran et Hoben (1985)**.

II-4-5-3-Effet de la salinité

La capacité des souches à tolérer le stress salin a été évaluée sur milieu gélosé YEM solide et liquide, renfermant des teneurs croissantes en NaCl : 0 mM, 40 mM, 80 mM, 160 mM, 230 mM, 640 mM et 1286mM, selon les protocoles décrits par **Vincent (1970)** et **Somageraran et Hoben (1985)**.

II-4-5-4-Evaluation de la croissance

Sur milieu liquide, la croissance est estimée par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre. La lecture des résultats sur le milieu solide est basée sur la présence ou absence des colonies.

II-4-5-5 Calcul du temps de génération des bactéries

Une culture bactérienne est préparée dans des tubes à essai contenant 5 ml de milieu YMB, à partir d'un repiquage récent sur YMA, 100 µl de cette suspension sont utilisés pour inoculer 50 ml du même milieu dans des erlenmeyers de 100 ml puis mis en agitation à 28°C.

Une lecture au spectrophotomètre, à 600 nm, de 1 ml de la précédente culture est faite toutes les 24 heures à partir du moment de l'inoculation (**Monza et al., 1992**).

La pente de la courbe de croissance en logarithme népérien est égale à $\text{Ln}2 / T_g$ et qui représente le taux de croissance μ .

Pendant la phase exponentielle, une courbe de croissance a l'équation suivante :

$$DO_t = DO_0 * e^{\mu t}.$$

Le taux de croissance des souches, en linéarisant l'équation par passage à la forme logarithmique devient : $\text{Ln } DO_t = \text{Ln } DO_0 + \mu t$

Le temps de génération de chaque isolât est calculé selon la formule :

$$T_g = t \cdot \text{Ln}2 / (\text{Ln } DO_t - \text{Ln } DO_0)$$

Ln : logarithme népérien.

T_g : Temps de génération

t : Temps de croissance en heures.

DO_t : Densité optique au temps t .

DO_0 : Densité optique au temps 0 (**Vincent, 1970**).

II-4-6 Caractérisation des Rhizobia par la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques permet de caractériser et comparer les souches entre elles et peut être utilisée pour marquer des souches en vue d'une production d'inoculum. Le principe est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en

présence des antibiotiques par diffusion à partir des disques dans un milieu gélosé. La croissance bactérienne s'arrête lorsque les bactéries sont en contact avec une concentration inhibitrice. Le diamètre de la zone d'inhibition varie selon la sensibilité des souches.

Pour déterminer la résistance aux antibiotiques, 1000 µl d'une suspension bactérienne (sur YMB) sont prélevées et étalées sur une boîte de Pétri contenant du YMA, le surplus est éliminé. Des disques d'antibiotiques sont déposés sur les boîtes ensemencées après dessèchement de celles-ci. Pour permettre la pré diffusion des antibiotiques, les boîtes sont laissées sous la température de la hotte pendant 10 minutes à température ambiante (20-25°C), puis incubées à 28°C à l'obscurité, pendant 03 à 07 jours.

L'appréciation de la sensibilité et résistance de chaque isolât est estimée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de l'antibiotique utilisé, et ce, après la croissance de l'isolât.

Les différents diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés puis comparés avec les valeurs critiques d'inhibition données par le comité français de l'antibiogramme.

Les bactéries sont classées dans les catégories ~~suivantes~~ : résistantes, intermédiaires et sensibles. Les antibiotiques utilisés sont : Acide naludixique (NA 30µg), Acide pipemidique (PI 20µg), Amoxicilline (AMX 25µg), Gentamycine (CN10µg), Péniciline (P 6µg), Tétracycline (TE 30µg), Cefazolin (CZ 30µg), Ofloxacin (OFX5µg), Spiramycin (SP100µg), Trimethoprim /sulphamethoxazole (SXT 25 µg), Netilmicin (NET 30 µg), Chloramphenicol (C 30 µg).

II-4-7 Caractérisation des Rhizobia par la sensibilité aux phages

Un échantillon de sol (lieu de culture de l'arachide) homogénéisé et conservé à 4°C a été utilisé pour isoler les phages, selon la méthode décrite par **Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994)**. Dans des flacons de 150ml, 50ml de bouillon Mannitol Nitrate ont été inoculés avec une souche bactérienne, puis incubés à 28°C sous agitation. Quand la première série de cultures est en phase exponentielle de croissance (24 à 48h après inoculation), 1 gr de sol a été ajouté dans chaque flacon et incubés 18-20h à 28°C. La suspension a été centrifugée à 10000 tr /mn pendant 15mn suivie d'une filtration du surnageant sur une membrane de 0.45µm et 0,22µm. Le filtrat contient les rhizobiophages qui, par leur taille, passent à travers la membrane filtrante. 10ml d'une culture fraîche de

la souche utilisée ont été ajoutés au filtrat et incubés avec agitation à 28°C pendant 18-20h puis centrifugés et filtrés. Cette opération a été effectuée deux fois. Le trouble des cultures bactériennes diminue sensiblement 8-10h après addition du filtrat phagique. Le dernier filtrat représente la suspension phagique utilisée pour ce test. Le filtrat a été réparti dans des tubes de 20ml conservé à 4°C.

II-4-7-1 La technique de spot test

Afin d'étudier la sensibilité des souches vis-à-vis des phages nous avons utilisé la technique de spot test. Celle-ci consiste à étaler 100 µl d'une culture bactérienne pure sur un milieu YEM, et laissée 10-15mn. Une quantité de 100 µl de la suspension phagique a été filtrée par des filtres stériles (0,22µm) avant d'être déposée sur la culture bactérienne dans des puits creusés par l'utilisation de cloches de Durham stériles, puis incubées à 28°C pendant 24-72h. La présence d'un spot clair indique la présence d'une activité lytique. Deux répétitions ont été réalisées pour chaque souche afin de confirmer les résultats obtenus **Vincent (1970)** et **Somasegaran et Hoben (1994)**.

II-4-8 Analyse des données

Les analyses statistiques des résultats expérimentaux obtenus ont été effectuées à l'aide du test ANOVA en utilisant le logiciel d'analyse statistique XLSTAT version 2014.

II-5 Résultats et discussion

II-5-1 Caractérisation et identification morphologique des isolats

L'isolement des bactéries à partir des nodules de l'arachide collectés des différents sites prospectés, a permis de constituer une collection de 53 isolats. L'étude de leur diversité symbiotique, phénotypique et éco-physiologique pourra constituer une base d'étude de la diversité phénotypique qui existe entre elles, mais aussi pour l'établissement de stratégies d'inoculations.

Après plusieurs repiquages, la pureté des isolats a été vérifiée par l'observation de leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques. Les isolats obtenus ne présentent pas tous les mêmes caractéristiques macroscopiques, mais montrent les caractéristiques morphologiques propres aux Rhizobia (tableau 3);, ce qui a été confirmé par **Dommergues et Mangenot (1970)**.

Selon **Somasegaran et Hobben (1985)**, les souches de *Rhizobium* à croissance lente peuvent former des colonies d'environ 1 mm de diamètre, tandis que les souches à croissance rapide peuvent former des colonies de 4 à 5 mm de diamètre. Pour les souches de *Mesorhizobium*, **Nour et al. (1994b, 1995)** ont observé des colonies peuvent avoir un diamètre compris entre 2 et 4 mm après 3 à 5 jours d'incubation à 28°C sur milieu YEMA. Ces colonies présentent une morphologie caractéristique, avec une apparence homogène le long des stries, une forme circulaire, un contour régulier, une surface lisse et une couleur allant du blanc à la crème. Elles peuvent également présenter une viscosité variable qui augmente avec le temps d'incubation, en raison de la production d'exopolysaccharides. Cette production de polysaccharides extracellulaires peut jouer un rôle dans la tolérance des souches aux conditions de salinité (**Bekki, 1992 ; Zahran et al., 1999**).

Tableau 3 : Différentes caractéristiques phénotypiques des isolats étudiés.

Isolats	Type de Gram	Couleur des colonies	Opacité	Sécrétion EPS	Texture des EPS	Yem+BTB (24H)	Yem+BTB (72H)	RC	G (heures)	Croissance
HBA1	-	Blanchâtre	Translucide	++	Visqueuse	+	+	-	2,82	R
HBA2	-	Blanchâtre	Opaque	-	Peu visqueuse	-	-	-	7,3	L
SP2	-	Crème	Translucide	++	Visqueuse	-	-	-	8,28	L
SP4	-	Crème	Translucide	+++	Visqueuse	-	-	-	30,93	L
SP5	-	Blanchâtre	Translucide	++++	Visqueuse	+	+	-	2,59	R
SP6	-	Crème	Translucide	++++	Visqueuse	-	-	-	13,66	L
SP8	-	Blanchâtre	Translucide	++++	Visqueuse	+	+	-	2,28	R
SP9	-	Crème	Opaque	++++	Mielleuse	-	-	-	44,15	L
SP12	-	Blanche	Opaque	++++	Gluante	-	-	-	15,07	L
SP22	-	Blanchâtre	Translucide	++	Visqueuse	-	-	-	7,33	L
SP32	-	Crème	Opaque	+++	Visqueuse	-	+	-	5,17	M
SP42	-	Blanchâtre	Translucide	++++	Visqueuse	-	-	-	7,33	L
SP62	-	Blanchâtre	Translucide	+++	Visqueuse	+	+	-	3,03	M
SP72	-	Blanchâtre	Translucide	++++	Visqueuse	+	+	-	2,31	R
SP82	-	Blanchâtre	Translucide	+++	Mielleuse	-	-	-	7,41	L
SP92	-	Blanchâtre	Translucide	+++	Visqueuse	-	+	-	5,02	M
SP13	-	Crème	Translucide	++++	Visqueuse	-	-	-	42,97	L
SP23	-	Crème	Translucide	+++	Mielleuse	-	-	-	20,95	L
SP53	-	Crème	Translucide	+++	Visqueuse	+	+	-	2,62	R
SP63	-	Crème	Translucide	++++	Visqueuse	+	+	-	2,36	R
SP73	-	Crème	Translucide	++	Gluante	-	-	-	12,36	L
SP83	-	Crème	Translucide	++	Visqueuse	+	+	-	3,07	M
SP93	-	Crème	Translucide	++++	Mielleuse	-	-	-	10,66	L

EP1	-	Blanchâtre	Translucide	+++	Visqueuse	-	-	-	19,87	L
EP2	-	Crème	Opaque	++++	Mielleuse	-	-	-	48,84	L
EP4	-	Crème	Opaque	+++	Mielleuse	-	-	-	18,33	L
EP5	-	Crème	Opaque	+++	Mielleuse	-	+	-	3,11	M
EP6	-	Blanche	Translucide	++	Gluante	-	-	-	23,39	L
EP7	-	Crème	Opaque	+++	Mielleuse	-	-	-	70,33	L
EP8	-	Crème	Opaque	++	Mielleuse	-	+	-	3,87	M
EP9	-	Crème	Opaque	+++	Mielleuse	-	-	-	74,8	L
EP12	-	Crème	Translucide	++++	Visqueuse	+	+	-	2,55	R
EP22	-	Crème	Opaque	++++	Mielleuse	-	+	-	3,85	M
EP32	-	Blanche	Opaque	++++	Gluante	-	-	-	9,82	L
EP42	-	Crème	Opaque	+++	Visqueuse	-	+	-	3,22	M
EP52	-	Crème	Translucide	++	Gluante	-	-	-	8,24	L
EP62	-	Crème	Translucide	+++	Visqueuse	-	-	-	9,74	L
EP72	-	Crème	Opaque	++++	Mielleuse	-	-	-	16,42	L
EP82	-	Jaune	Translucide	+++	Mielleuse	-	+	-	4,96	M
EP92	-	Jaune	Translucide	+++	Mielleuse	-	-	-	9,67	L
EMA1	-	Blanchâtre	Translucide	++++	Visqueuse	-	-	-	32,02	L
EMA2	-	Blanchâtre	Translucide	+++	Visqueuse	-	+	-	3,23	M
SR1	-	Crème	Opaque	+++	Gluante	-	-	-	38,75	L
SR2	-	Crème	Opaque	+++	Mielleuse	-	-	-	23,21	L
HK1	-	Crème	Opaque	+++	Mielleuse	-	-	-	166,18	L
HK2	-	Blanchâtre	Translucide	++++	Visqueuse	-	-	-	83,09	L
BDJ1	-	Blanchâtre	Translucide	++	Visqueuse	-	-	-	3,63	M
BDJ2	-	Blanche	Opaque	++	Gluante	+	+	-	2,29	R

L : lente ; **R** : rapide ; **EPS** : exopolysaccharides.

Tous les isolats donnent des colonies avec un aspect de surface lisse et brillant. En soulevant les colonies avec une anse de platine, nous observons la formation d'un petit filament visqueux ; ce qui indique que toutes les souches sont productrices d'exopolysaccharides (EPS) à l'exception des isolats HBA2 et SR1, qui produisent très peu d'EPS. Ainsi, nous avons remarqué pour les souches EP82 et EP92 ~~ont~~ une production d'EPS de couleur jaune. Sur milieu YEM, les Rhizobiums possèdent la propriété de former une grande quantité de polysaccharides exo-cellulaires, solubles dans l'eau (**Salducci, 1992**). Leur production joue un rôle important dans la symbiose fixatrice d'azote, en particulier dans la reconnaissance spécifique de l'hôte, l'organisation du cytosquelette des poils racinaires, l'influence sur la prolongation du cordon d'infection et la redirection de la croissance apicale des poils racinaires (**Donot et al., 2012 ; Hussain et al., 2014**). Différentes couleurs et textures sont citées dans la littérature pour décrire les

EPS des Rhizobiums (**Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hobben, 1985**). **Scheidle et al. (2005)**, ont trouvé que la coloration des colonies en jaune, est caractéristique de ces composés en partie lipidiques appelés lipopolysaccharides (LPS). Plusieurs travaux de recherche ont été menés dont l'objectif était de déterminer le rôle des LPS produits par différentes espèces bactériennes dans l'établissement d'une relation symbiotique avec leur plante hôte. Ces derniers sont surtout impliqués dans l'adhésion des bactéries aux poils racinaires, et dans leur pénétration dans les cellules végétales ainsi que dans la stimulation de la formation du cordon d'infection et dans la différenciation en bactéroïdes. Les LPS joueraient aussi un rôle dans l'inhibition des réactions de défense de la plante dans les étapes les plus tardives de l'infection, lorsque les EPS ne sont plus synthétisées, en empêchant la mise en place du choc oxydant (**Vijayabaskar et al., 2011 ; Rao et al., 2013**). Ils protègent les bactéries contre les effets toxiques du stress osmotique, de la dessiccation, de la salinité des attaques bactériophages et des composés toxiques (**Qurashi et Sabri, 2012 ; Sutherland, 2001**).

II-5-1-1 Pouvoir acidifiant ou alcalinisant des isolats (sur milieu YMA + BTB)

Nous avons remarqué qu'il existe deux grandes catégories de bactéries au sein de notre collection (tableau 3). Chez la première catégorie, nous avons observé un virage de couleur vers le jaune. Ce virage de couleur signifie une acidification du milieu observée soit après 24h d'incubation pour 20,83% des souches, soit après 72h pour 18% des souches. L'acidification du milieu signifie que ces isolats ont une croissance moyenne à rapide (**Beck et al., 1993**). Par contre, pour la deuxième catégorie, nous avons constaté une réaction neutre ou alcalinisante de 60,41% des isolats. Ces derniers sont considérés comme des bactéries à croissance lente. Plusieurs travaux (**Jordan, 1984 ; Beck et al., 1993 ; Pagano, 2008 ; Diouf et al 2000 ; Frémont et al, 1999 ; Xu et al., 2005**) ont rapporté que 80% des souches de *Rhizobium* et *Agrobacterium* ont pu donner des réactions positives avec le YEM + BTB, alors que les souches de *Bradyrhizobium* ont toutes donné des réactions négatives. L'acidification des milieux de culture est due à l'excrétion de protons et d'acides organiques par les bactéries. Chez les rhizobiums, les polysaccharides peuvent contribuer à cette acidification. En effet, les Rhizobia caractérisés par une forte production de gomme extracellulaire très souvent, acidifient le milieu de culture, contrairement aux Rhizobia qui produisent peu de gomme. Ces derniers

ont tendance à alcaliniser le milieu de culture (**Graham, 1992 ; Zakhia et de Lajudie, 2001**).

II-5-1-2 Observation microscopique

L'observation microscopique des isolats après coloration de Gram révèle des bâtonnets courts en forme de bacilles à cocco bacilles Gram négatif caractérisés par le virement de la couleur des cellules bactériennes vers le rose, ce qui confirme leur pureté. Cette caractérisation reste l'un des tests fondamentaux dans la classification de *Rhizobiums* et présente un premier pas classique pour mieux étudier cette bactérie (**Zhang et al, 1991**). Cependant, elle reste insuffisante, car la coloration de Gram n'est jamais définitive, du fait que dans la nature un grand nombre d'organismes sont Gram négatif (**Cleet-Marel, 1992**).

II-5-1-3 Croissance sur le milieu YMA –Rouge Congo (RC)

Les souches isolées à partir des nodules d'*Arachis hypogaea* L. n'absorbent pas ou très peu le rouge Congo sur milieu YMA, restant ainsi blanchâtres à roses très pales (tableau 3). Ceci est observé chez la majorité des *Rhizobia* (**Jordan, 1984 ; Vincent, 1970**). Cette propriété est commune avec le genre *Bradyrhizobium* qui n'absorbe pas le rouge Congo; par contre le genre *Agrobacterium* et les formes contaminantes, absorbent fortement ce colorant (**Jordan, 1984**).

II-5-1-4 Temps de génération

Selon l'aspect et le temps d'apparition des colonies sur milieu YEM et la détermination du temps de génération, des isolats ont pu être subdivisés en trois groupes (tableau 3) :

- Le premier groupe représente des *Rhizobia* à croissance lente : renferme 29 souches (59.18%) se distinguant des autres par leurs croissances lentes (temps d'apparition des colonies de 7 à 9 jours), avec des colonies circulaires, compactes, convexes, de couleur crème, opaques. ces colonies sont marquées par une très forte viscosité (tableau 3) et un temps de génération supérieur à 6h. Elles correspondent à des *Bradyrhizobium*, qui demeurent très abondantes après 6 à 7 jours selon **Berguey's et al. (1994)**.

- Le deuxième groupe est celui des Rhizobia à croissance rapide : renferme 8 souches (18.36%) se différenciant par leur croissance rapide (temps d'apparition des colonies de 2 à 3 jours). Les colonies sont circulaires, peu convexes, de couleur blanchâtre, translucides et visqueuse, avec un temps de génération inférieur ou égal à 3h.
- Le troisième groupe de Rhizobia a une croissance intermédiaire : comporte 11 souches (22.44%), d'un temps d'apparition des colonies de 3 à 5 jours, colonies circulaires, compactes, de couleur blanche et peu visqueuses. Ce groupe se caractérise par un temps de génération compris entre 3 et 6h.

Il convient de mentionner que le genre *Bradyrhizobium* possède une position basale parmi tous les Rhizobiums fixateurs d'azote (**Delamuta et al., 2012**) et serait impliqué dans des associations endophytes ou symbiotiques avec les racines de plusieurs plantes y compris l'arachide (**VanInsberghe et al., (2015)** ; **Nkot et al., (2008)** ; **Chen et al., (2014)** ; **Chen et al., (2016)** ; **Grönemeyer et al., (2016)**.. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études réalisées sur la symbiose rhizobienne de l'arachide. En Algérie, **Amri-Tiliouine (2008)** a signalé la présence de deux grands groupes à 38% de similarité ; un groupe qui réunit les isolats à croissance rapide et intermédiaire et un autre groupe qui réunit les isolats à croissance lente qui appartiendraient probablement au genre *Bradyrhizobium*. **Zazou et al., (2018)** ont identifié de nombreuses souches isolées à partir de nodules d'arachide au Sénégal qui se sont avérées proches de bactéries isolées à partir des racines du haricot pourpre *Macroptilium atropurpureum*, *Machaerium milleflorum*, *Vachellia seyal*, *Faidherbia albida* et niébé (*Vigna unguiculata*), cinq espèces de légumineuses couramment cultivées dans les champs des agriculteurs. Ces résultats sont en accord avec ceux d'études précédentes montrant que l'arachide peut être nodulée par des isolats de *Bradyrhizobium* de *Glycine max* (**Yang et Zhou, 2008**), ou *Vigna unguiculata* (**Krasova-Wade et al., 2003**) confirmant ainsi que l'arachide peut être nodulée par une large gamme d'espèces de *Bradyrhizobium*. De nouvelles géno-espèces de *Bradyrhizobium* qui nodulent l'arachide ont été décrites dans de nombreux pays, dont l'Angola, la Namibie, le Botswana et la Chine (**Chen et al., 2016** ; **Grönemeyer et al., 2016**). Cependant, en Argentine et Maroc, des espèces telles que *Rhizobium huautlense*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium tropicii* et *Rhizobium pongamiae* se sont révélées associées à la formation de nodules dans l'arachide (**Taurian et al., 2006** ; **El-Akhal et al., 2008** ; **Pandey and Chakraborty, 2019**). Par conséquent, la nodulation dans l'arachide implique une large gamme d'espèces de *Bradyrhizobium* et de *Rhizobium*.

II-5-2 Authentification symbiotique des isolats

Le contrôle de la capacité infective de la collection rhizobiale exige le passage par un test de nodulation. Chaque isolat a été testé pour sa capacité de former des nodules sur les racines de la Fabacée hôte (*Arachis hypogaea* L.). Après 5 semaines de croissance des plantes dans des jarres (**photo 2**), elles ont été déterrées au même stade végétatif de préfloraison.



Photo 2 : Test d'authentification des isolats nodulant l'arachide.

Sur un total de 53 isolats obtenus, 48 ont été capables d'induire des nodules, représentant un taux d'infectivité de 90%. Ils sont répartis comme suit, en fonction de leur provenance : 2 isolats ont été obtenus de la région de Hassi Ben Abdellah, 27 de la région de Sebseb et 19 de la région d'El-Mansoura. Ces derniers sont appelés « souches natives ». Aucune nodulation n'a été observée sur les témoins négatif et positif non inoculés.

Il est possible de suggérer que les isolats qui n'ont pas réussi à noduler à nouveau leur hôte sont soit, des Rhizobia qui ont perdu leur capacité de nodulation en raison d'une perte de plasmides ou il s'agirait d'autres bactéries intrusives du sol qui ont pénétré le nodule (**Segovia et al., 1991 ; Zhang et al., 2001**). Il s'agit probablement de bactéries endophytes ou opportuniste, piégées avec les Rhizobia mais incapables d'induire la formation de nodules par elles-mêmes (**Ibáñez et al., 2009**). Les bactéries endophytes habitent les nodules conjointement avec les Rhizobiums mais leur rôle dans la nodulation est encore mal connu (**Velázquez et al., 2017 ; Zazou et al., 2018**).

L'examen du système racinaire des plantes de l'arachide nous a permis de vérifier le pouvoir de nodulation. En effet, les plantes ont montré des nodosités caractéristiques de la symbiose Rhizobia-légumineuse. Les nodules se sont tous révélés de type déterminé selon la classification établie par **Corby (1981)**. Ils se présentent sous forme arrondie, beaucoup plus larges qu'allongés, de couleur rose indiquant le début de synthèse de la leghémoglobine (présentant ainsi une activité fixatrice d'azote) (**Legesse et Assefa, 2014**). La localisation des nodosités a montré également une grande variabilité ; celles de grande taille sont localisées en grande majorité au-dessous du collet alors que celles de moindre taille, ~~ont été~~ plus denses se trouvent sur les racines latérales (**photo 3**).



Photo 3 : Induction de nodosités sur les racines de jeunes plantes de l'arachide après inoculation.

II-5-3 Caractérisation écophysiological des isolats

II-5-3-1 Effet de la température

Les Rhizobia sont généralement des bactéries mésophiles capables de se développer dans une plage de températures allant de 10°C à 37°C (**Graham, 1992**). Leur température optimale de croissance se situe généralement entre 25°C et 30°C (**Somasegaran et Hoben, 1994**). Cependant, il existe des souches de Rhizobium qui tolèrent des températures extrêmes, comme celles qui nodulent des légumineuses dans les régions arctiques (**Lipsanen et Lindström, 1989**) ou celles isolées dans des environnements chauds et secs de la savane du Sahel en Afrique, où elles peuvent supporter des températures dépassant 40°C (**Eaglesham et Ayanaba, 1984 ; Karanja et Wood, 1988**). La figure 8 illustre l'effet de la température sur la croissance des Rhizobia.

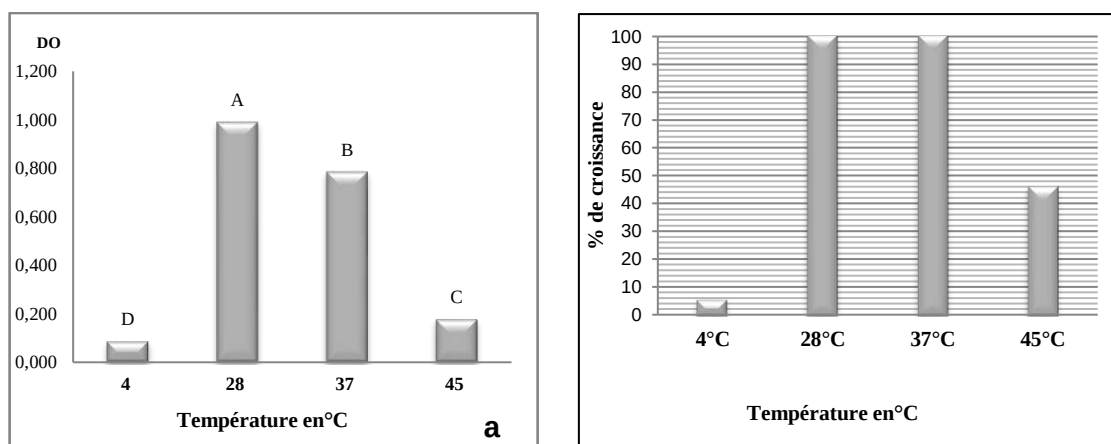


Figure 7 : Effet de la température sur la croissance des isolats rhizobiens, a : densité optique (DO) ; b : pourcentage de croissance (%) (Pour chaque paramètre, les moyennes dans la même colonne portant la même lettre ne présentent pas de différences significatives, comme déterminé par le test de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher à un niveau de signification de $P = 0,05$).

Le test de tolérance à la température a révélé que les isolats présentent une meilleure croissance avec développement de colonies, aux températures comprises entre 28°C et 37°C avec une croissance optimale à 28°C (Figure 7). Cependant, la croissance des isolats a diminué progressivement lorsque la température a augmenté. A 45°C, seulement 45,83% des isolats ont pu développer une colonie. Par ailleurs, aucune croissance n'a été observée à 4°C. **Usha et Archana (2015)** ont indiqué que les isolats de *Rhizobium* de niébé présentaient une croissance à des températures de 10°C, 15°C et 30°C alors qu'une seule souche était capable de résister à des températures allant jusqu'à 40°C. Il a été rapporté qu'une température élevée diminue la survie et la croissance de la colonie de *Rhizobiums* (**Hungria and Vargas, 2000 ; Florentin et al. 2010**). **Abdelnaby et al., (2015)** et **Degefu et al. (2018)** ont signalé la croissance des *Rhizobiums* à croissances lente et rapide à une température supérieure à 40°C. Ces températures ne sont pas rares sur les sols des régions arides du Sud algérien. Ainsi, certains des isolats testés étaient similaires à leurs homologues d'autres légumineuses poussant dans les mêmes régions, bien adaptés à leur site d'origine (**Azib et al., 2022**). L'évaluation de la tolérance *in vitro* aux températures élevées, peut aider à la sélection de souches plus stables aux conditions de chaleur (**Xavier et al., 2007**).

L'analyse statistique (tableau 4) n'a montrée aucune différence significative sur l'influence des températures testées en fonction du type de croissance des souches. De

même aucune relation n'a été trouvée entre la tolérance aux températures extrêmes et le temps de génération des isolats.

Tableau 4 : Effet de la température sur les Rhizobia en fonction du type de croissance.

Croissance	T° 4°C	T° 28°C	T° 37°C	T° 45°C
CR	0,095 a	0,944 a	0,819 a	0,183 a
CM	0,092 a	1,013 a	0,811 a	0,181 a
CL	0,082 a	0,995 a	0,768 a	0,174 a
Pr > F	0,073	0,653	0,185	0,544
Significatif	Non	Non	Non	Non

CR : croissance rapide. CM : croissance moyenne. CL : croissance lente.

Ces résultats corroborent la grande variabilité de la thermo-tolérance rapportée chez les diverses espèces de Rhizobia. Ainsi, les plantes d'arachide poussent mieux sur des sols sablonneux bien drainés et ensoleillées avec des températures chaudes en surface du sol, supérieures à 35°C et des précipitations modérées (**Argaw, 2017**). Pour la plupart des rhizobiums, la plage de températures optimales de croissance est de 28 à 31°C et beaucoup sont incapables de pousser à 37°C, y compris certains symbiotes de l'arachide (**Zahran, 1999, Sharma et al., 2020**). Par ailleurs, **Grönemeyer et al., (2014)** ont signalé que la plupart des souches de *Bradyrhizobiums* originaires d'Angola n'ont pas pu se développer en milieu liquide à 35°C. En revanche, la plupart des isolats namubiens ont proliféré à 38°C, certains tolérants même des températures de croissance très élevées que (40°C). De même, une tolérance à 48.7°C a été prouvée pour quelques souches de *Bradyrhizobium japonicum* (**Munevar et Wollum, 1981**). Cependant, la température idéale permettant la croissance de la plupart des Rhizobiums se situe entre 25°C et 30°C (**Zhang et al., 1995**), et pourtant, il n'existe pas de température universelle qui puisse convenir à toutes les espèces de Rhizobiums (**Alexandre et Oliveira, 2013**).

Dans plusieurs organismes, l'apparition de thermo-tolérance a été corrélée avec la production des protéines de choc thermique HSP (Heat Shock Proteins) (**Michiels et al., 1994**). Ces protéines ont été détectées chez la souche *Bradyrhizobium* exposée à 40°C (**Kishinevsky et al., 1992**). **Dardanelli et al (1997)** ont rapporté que la production de biomasse de Rhizobiums (*Bradyrhizobium* sp. ATCC10317, SEMIA 6144 et souches TAL1371) nodulant l'arachide, était légèrement réduite, la teneur cellulaire en

oligosaccharides de faible poids moléculaire a augmenté de manière significative et la synthèse de glucane a été complètement arrêtée.

Dardanelli et al., (2009), ont remarqué que l'augmentation de la température de la racine d'arachide de plus de 37°C, a réduit la fixation de N₂ par *Bradyrhizobium* sans affecter la nodulation. Cependant, lorsque la température de la racine a été portée à 40°C, la nodulation a été complètement inhibée. Cette étude confirme que la symbiose chez l'arachide est sensible à la température des racines par rapport aux autres légumineuses.

D'autre part, les basses températures sont parmi les principaux facteurs limitant la fixation d'azote par les Rhizobia dans les régions froides, car le froid retarde ou même inhibe complètement l'initiation de la nodulation et semble influencer l'occupation des nodules (**Graham, 1992 ; Zhang et Smith, 1996**). Il a été rapporté que les réductions de température affectent l'état physiologique des cellules (**Junior et al., 2005**). **Vicario et al., (2015)** ont signalé que la mobilité des Rhizobia nodulant l'arachide a été affectée négativement par une basse température.

Paulucci et al. (2011) ont signalé que les rhizobia nodulant l'arachide sont capables de s'adapter aux conditions environnementales grâce à la modification de leurs acides gras membranaires.

II-5-3-2 Effet du pH

Dans le sol, le pH affecte non seulement le développement des bactéries mais aussi la solubilité des différents cations métalliques qui influencent indirectement le développement bactérien (**Sharma, 2020**). Les résultats de la tolérance aux pH acide et alcalin de l'ensemble des souches de la collection (figure 9) montrent une différence significative vis-à-vis de leur tolérance aux différents degrés de pH testés du 4 jusqu'au 9. Malgré la tolérance de l'ensemble des souches aux pH, nous avons remarqué une grande diversité de leurs réponses. La tolérance à l'acidité s'est révélée faible avec les marges de pH comprises entre 4 et 5 par rapport à l'alcalinité (pH8, pH9). Toutefois, un développement optimal des souches s'est traduit par une croissance maximale enregistrée pour tous les isolats au pH 7 (figure 8).

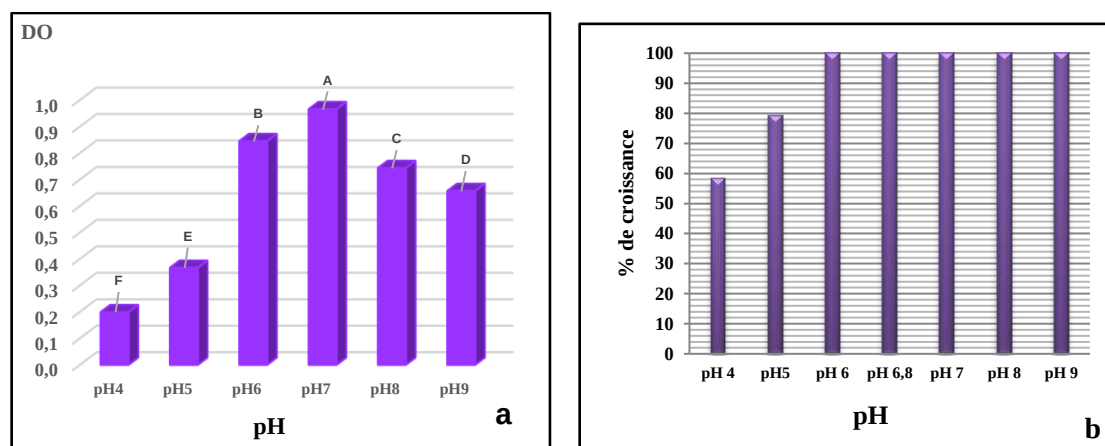


Figure 8 : Effet du pH sur la croissance des souches isolées, a : densité optique (DO) ; b : pourcentage de croissance (%)

L'analyse de la tolérance des souches aux pH (tableau 5) a révélé une différence significative en fonction du type de croissance aux pH allant de 6 à 9. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été remarquée pour les pH acides.

Tableau 5 : Effet du pH sur les Rhizobia en fonction du type de croissance.

Croissance	pH 4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
CL	0,203 a	0,375 a	0,834 ab	0,996 a	0,750 a	0,646 b
CM	0,187 a	0,350 a	0,957 a	1,019 a	0,756 a	0,659 ab
CR	0,201 a	0,359 a	0,730 b	0,779 b	0,700 b	0,694 a
Pr > F	0,130	0,170	0,009	0,001	0,030	0,035
Significatif	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui

CR : croissance rapide. CM : croissance moyenne. CL : croissance lente.

En ce qui concerne les profils de pH, tous les isolats ont poussé à des valeurs de pH comprises entre 6 et 9. Seulement 58,33% des souches ont poussé à des valeurs de pH de 4. D'autre part, 79,16% ont poussé au pH 5. Ces constatations sont similaires à celles observées par **Degefu et al. (2018)**, pour les Rhizobiums et Bradyrhizobiums nodulant l'arachide et le niébé. Ils ont signalé que tous les isolats ont proliféré à des valeurs de pH comprises entre 5,5 et 10,5, dont 77 % des souches de niébé et 69 % des souches d'arachide ont poussé à des valeurs de pH aussi basses que 4,0. Selon **Graham (1964)** et **Jordan (1984)**, les rhizobia peuvent tolérer des pH allant de 4,5 à 9. **Appunu et al. (2009)** ont rapporté que les souches de *Bradyrhizobium*, isolées à partir de nodules du

niébé ont été capable de croître à pH 3,5. **Rai et al. (2012)** ont également signalé la tolérance des isolats à croissance rapide nodulant le poids chiche, capables de se développer à pH 4. De même, **Ngo Nkot et al (2015)** ont noté une bonne tolérance (66.67%) au pH acide pour les Rhizobia à croissance rapide nodulant l'arachide de Bambara (*Vigna Subterranea*).

L'augmentation significative des valeurs de la densité optique (DO) avec l'augmentation du pH vers la neutralité est cohérente avec les résultats de plusieurs études antérieures. Par exemple, **Rodrigues et al. (2006)** ont également constaté que des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 7,0 sont optimales pour la croissance des bactéries nodulant les légumineuses, tandis qu'une légère diminution de la croissance est observée en dehors de cette plage de pH. La capacité des souches tolérantes à l'acidité à maintenir un pH intracellulaire proche de la neutralité, même en présence d'un pH externe acide, est un facteur clé de leur tolérance à l'acidité. Des études antérieures ont également suggéré que la composition en lipopolysaccharides, l'accumulation de polyamines cellulaires et la composition et la structure de la membrane externe peuvent jouer un rôle dans la tolérance des Rhizobia au pH acide (**Graham, 1992 ; Fujihara, 1993**).

En général, tous les isolats testés se sont avérés tolérants aux pH élevés. Dans des études antérieures sur les Rhizobiums du niébé et du haricot mungo (**Zhang et al., 2006**), d'arachide (**Degefu et al, 2018**) et du pois chiche (**Nour et al., 1994**), il a été rapporté que les souches de Rhizobium pouvaient se développer à des valeurs de pH comprises entre 5,0 et 11,0 pour les isolats de niébé et de haricot mungo, entre 4 et 10.5 pour les isolats de l'arachide et jusqu'à 10,0 pour les isolats de pois chiche.

L'augmentation significative des valeurs de la densité optique (DO) avec l'augmentation du pH vers la neutralité est cohérente avec les résultats de plusieurs études antérieures. Par exemple, **Rodrigues et al. (2006)** ont également constaté que des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 7,0 sont optimales pour la croissance des bactéries nodulant les légumineuses, tandis qu'une légère diminution de la croissance est observée en dehors de cette plage de pH. La capacité des souches tolérantes à l'acidité à maintenir un pH intracellulaire proche de la neutralité, même en présence d'un pH externe acide, est un facteur clé de leur tolérance à l'acidité. Des études antérieures ont également suggéré que la composition en lipopolysaccharides, l'accumulation de polyamines cellulaires et la composition et la structure de la membrane externe peuvent jouer un rôle dans la tolérance des Rhizobia au pH acide (**Graham, 1992 ; Fujihara, 1993**).

Les isolats EP72, EP8, EP1, EP22, EP6, EP9, SP32, SP62, SP42, HBA1, SP92 se sont développés dans des gammes de pH plus larges. Ces derniers peuvent avoir une application pratique en ce qui concerne la sélection d'une large gamme de souches tolérantes aux pH qui peuvent bien fonctionner dans des conditions acides, neutres et sols alcalins.

II-5-3-3 Effet de la salinité

Le stress salin peut affecter la croissance des rhizobiums du sol en limitant la colonisation racinaire, l'inhibition de l'infection, le développement et le fonctionnement des nodules. Les souches testées ont montré une large variabilité de leur halotolérance aux diverses concentrations de NaCl (figure 10).

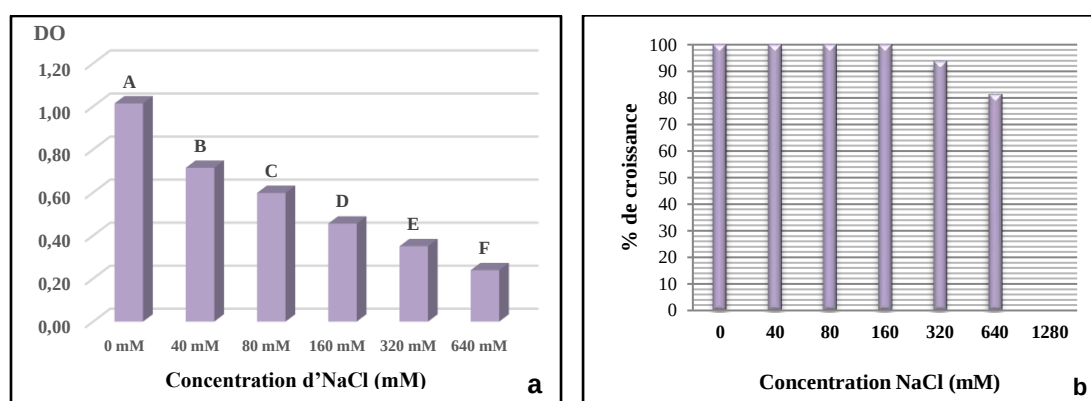


Figure 9: Effet du NaCl sur la croissance des souches isolées ; a : densité optique (DO) ; b : pourcentage de croissance (%)

Les isolats de Rhizobia nodulant l'arachide ont montré de grandes variations dans le développement des colonies lorsqu'ils étaient cultivés sur YEMA, ajustés aux différentes concentrations de NaCl. Tous les isolats étaient tolérants à des niveaux de concentration de NaCl allant de 0, 40, 80 et 160 mM (figure 9). Toutes les souches ont présenté un bon développement, de 100% sur milieu solide aux concentrations de NaCl de 0 à 160mM, avec une croissance optimale entre 0 et 80 mM. Une croissance significativement plus élevée est enregistrée pour la concentration 0mM avec des DO les plus élevées par rapport aux autres concentrations. Cependant, cette proportion a diminué progressivement au fur et à mesure que la concentration de NaCl a augmenté. Le nombre de colonies et leur DO ont été inversement proportionnels à l'augmentation de la

concentration du sel. Lorsque la concentration en sel a augmenté au-dessus de 160 mM, la densité de développement des colonies a progressivement diminué (figure 10). En effet, plus de 93 % des isolats testés ont pu développer des colonies sur YEMA avec 230 mM % de NaCl, tandis que 81.25% ont pu se développer à une concentration en sel de 640 mM. Cependant aucune croissance n'a été observée à 1280 mM. **Zahran (1999)** a rapporté que l'augmentation des concentrations de sel a un effet négatif sur la croissance des rhizobiums en raison de sa toxicité directe et indirectement par le stress osmotique causé par la salinité. **Serraj et Abu-Gyamfi (2004)** ont montré que la sensibilité des souches de rhizobium à la salinité peut varier considérablement d'une espèce à une autre et même entre les souches de la même espèce.

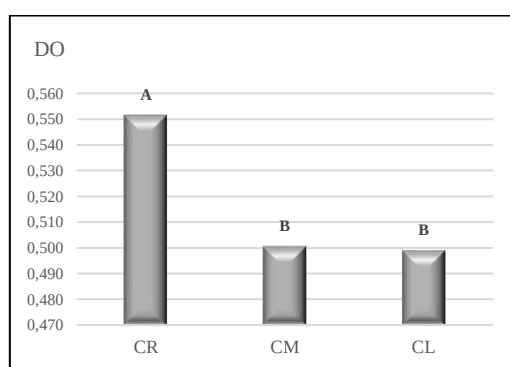


Figure 10: Halotolérance des isolats en fonction du type de croissance.

Les résultats obtenus (figure 10) ont montré une bonne halotolérance des isolats à croissance rapide, suivis des souches à croissance intermédiaires puis les souches à croissance lente. Ces résultats sont similaires à ceux de; **Hungria et al., (2001)**, **El-Akhal et al., (2009)** et **Khalid et al., (2020)**, ce qui renforce le fait que les rhizobiums à croissance rapide sont plus tolérants à la salinité que ceux à croissance lente. **Khaled et al., (2020)** ont signalé que tous les isolats nodulant l'arachide peuvent tolérer une concentration jusqu'à 3% de NaCl. Les travaux de **Degefu et al. (2018)** ont également indiqué que les isolats de rhizobium nodulant l'arachide, collectés dans le Sud de l'Éthiopie étaient capables de tolérer une concentration de sel la plus élevée de 5,5%. Cette capacité peut les rendre très compétitifs pour coloniser la rhizosphère et fixer l'azote dans les sols affectés par la salinité. **Mpeperekhi et al. (1997)** ont rapporté que l'existence des isolats dans des conditions affectées par le sel peut être une indication de leur adaptation au stress osmotique en réponse à l'augmentation de la concentration en ions et à la différence d'humidité du sol pendant les saisons sèches.

Ainsi, la tolérance au sel qui caractérise les souches étudiées, 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 **Maatallah et al. (2002)** pour des souches de *Mesorhizobium* nodulant le pois chiche au Maroc, par **Mohammed et al. (2000)** pour des souches nodulant l'acacia en Libye et par **Azib et al. (2020)** pour des souches de *Sinorhizobium* nodulant la luzerne en Algérie.

Meriem et al. (2015) ont également montré que la croissance des isolats diminuait lorsque la concentration de NaCl augmentait et que l'effet néfaste d'une concentration en sel plus élevée apparaissait au-delà de 1% de NaCl ; dans leur étude sur des isolats de souches de rhizobium indigènes de niébé cultivés au Bangladesh. De même, **Nushair et al. (2017)** ont rapporté que les rhizobiums étaient capables de se développer à 1% de NaCl mais incapables de tolérer une concentration plus élevée de NaCl, montrant en outre leur sensibilité à la concentration plus élevée de NaCl. Une association légumineuse-rhizobium réussie dans des conditions de stress de salinité, nécessite des isolats qui pourraient tolérer et/ou résister à une concentration plus élevée de NaCl.

Les meilleures croissances ont été notées pour les isolats SP8, SP32, SP9, EP72, EP6, SP42, SP62, EP1, EP22, EP82, HBA1 et EMA2. Par conséquent, la présence d'isolats tolérants à une concentration élevée de NaCl dans cette étude, pourrait potentiellement offrir une possibilité d'améliorer la croissance et le rendement des légumineuses dans les zones où la salinité est problématique. Ainsi, **Keneni et al. (2010)** ont suggéré que les isolats tolérants à des concentrations élevées de NaCl sont très compétitifs pour coloniser la rhizosphère et noduler les plantes hôtes dans des conditions environnementales sévères telles que des sols affectés par le sel. La sélection de couples symbiotiques tolérants à la salinité reste l'élément essentiel pour l'amélioration de la symbiose.

II-5-3-4 Utilisation des glucides

L'utilisation de la source de carbone peut déterminer la capacité d'un organisme à vivre de manière symbiotique ou saprophytique dans le sol. Elle exerce une forte influence sur la classification des isolats et peut constituer une mesure fonctionnelle utile au niveau de la communauté dans la caractérisation et la classification des communautés hétérotrophes (**Garland et al., 1991**).

La croissance des isolats a été étudiée dans différentes sources de carbone du milieu en remplaçant le mannitol. Ce test a été réalisé dans le but de voir la source de carbone

préférée par les différentes souches étudiées, c'est l'une des bases de l'identification biochimique. Les résultats de la figure 11 indiquent que les densités optiques de toutes les souches ont augmenté sous les différentes sources de carbone. Tous les isolats ont dégradé les sucres testés : monosaccharides, disaccharides, trisaccharides et polyol.

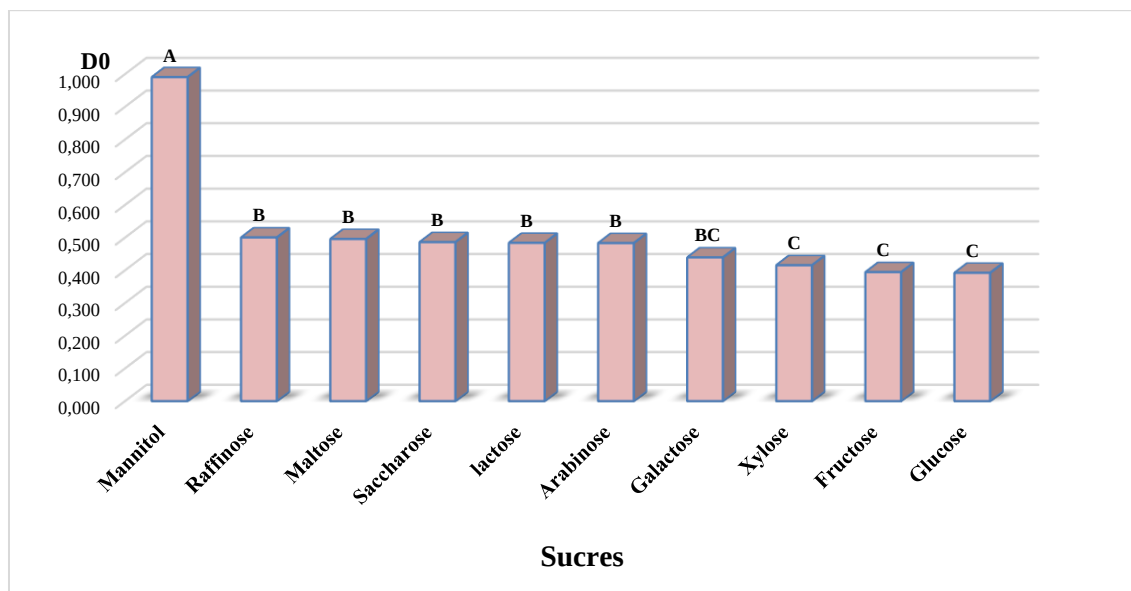


Figure 11: Croissance des isolats sur milieu de culture enrichi en glucides.

Les résultats biochimiques ont montré que les souches utilisent différemment les sucres. Toutes les souches ont dégradé préférentiellement et rapidement le mannitol (polyol), suivi par le D-raffinose (trisaccharide), le D xylose, le saccharose, le D-fructose, le D-arabinose, le D-fructose, , le D-galactose, le -D-glucose, le D lactose (disaccharide), le D-maltose (disaccharide) et le D saccharose (disaccharide). Cela indique que la majorité des isolats ont pu utiliser un large éventail de sources de carbone. Ces constatations sont conformes à ce qui a été rapporté par d'autres auteurs pour les rhizobia nodulant le niébé et l'arachide (**Laurette et al., 2015 ; Degefu et al., 2018 ; Hossain et al., 2019**). Il ressort de ce test que les monosaccharides (D-glucose, D-fructose, D xylose et galactose) à l'exception de l'arabinose ont été les moins préférés par la plupart des isolats testés, alors que les disaccharides (lactose, saccharose et maltose) ont été mieux assimilés par la plupart d'entre eux. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés par **Abdelnaby et al., (2015)** pour les rhizobia nodulant le niébé, ainsi que pour le rhizobium du pois chiche (**Maâtallah et al., 2002**). Cette variation observée dans l'utilisation des sucres peut être en relation avec les rhizobiums nodulant l'*Arachis hypogaea* qui inclut à la fois des souches à croissances rapide et lente (**Sharma et al., 2020**).

Les résultats de l'analyse statistique (**tableau 6**) ont révélé une différence non significative pour l'utilisation du D-galactose, D-arabinose, D-lactose, D-fructose, D-raffinose et le mannitol entre les différentes souches par rapport à leur type de croissance. Cependant, une différence significative a été notée pour l'utilisation du D-xylose, D-maltose, D-saccharose et D-glucose entre les souches à croissance rapide, croissance intermédiaire et croissance lente. Une réponse similaire des isolats à l'utilisation du sucre peut être due à l'absence de variation des gènes opérant dans les voies métaboliques d'utilisation des sucres (**Bhargava et al., 2016**).

Tableau 6: Effet de l'utilisation des différents sucres sur les rhizobia en fonction du type de croissance.

Croissance	Maltose	Galactose	Arabinose	Lactose	Glucose	Fructose	Saccharose	Xylose	Raffinose	Mannitol
CR	0,538 a	0,497 a	0,497 a	0,491 a	0,542 a	0,421 a	0,556 a	0,477 a	0,551 a	0,944 a
CM	0,430 b	0,446 a	0,485 a	0,495 a	0,339 b	0,377 a	0,443 b	0,446 ab	0,533 a	1,013 a
CL	0,509 a	0,421 a	0,479 a	0,478 a	0,372 b	0,394 a	0,483 ab	0,387 b	0,474 a	0,995 a
Pr > F	0,017	0,083	0,878	0,738	0,004	0,413	0,050	0,011	0,055	0,653
Significatif	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Non

CR : croissance rapide. CM : croissance moyenne. CL : croissance lente

Il apparait que pour la plupart des sucres testés les densités optiques les plus élevées ont été enregistrées pour les souches à croissance rapide. Ces observations sont similaires à celles de **van Rossum et al. (1995)**, les rhizobia nodulant l'arachide à croissance rapide ont pu croître sur une grande variété de substrats de carbone alors que celles à croissance lente ont été plus limitées dans leur capacité à utiliser diverses sources de carbone. Il a été rapporté qu'une mauvaise assimilation des monosaccharides et des disaccharides est une caractéristique de certains rhizobiums et *Azorhizobium* à croissance lente (**Maâtallah et al., 2002**). De même **Zabaloy et Gomez (2005)** ont rapporté que les souches de *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium* exhibent une croissance modérée sur de nombreuses sources de carbone testées par rapport aux souches à croissance rapide de *Rhizobium* et *Sinorhizobium*. **Chakrabarti et al. (1981)** ont rapporté que les souches à croissance lente peuvent montrer une variabilité dans l'utilisation des sources de carbone.

Les résultats sur l'utilisation du carbone par les isolats d'arachide dans la présente étude concordent avec d'autres travaux (**Degefu et al., 2018 ; Yang, et al., 2005, Khalid et al., 2020**). **Zahran et al. (2012)** ont testé la capacité des isolats de *Rhizobium* à utiliser différentes sources de carbone et ont révélé que tous les isolats étaient capables d'utiliser

et de bien se développer sur la plupart des sources de carbone. **Kebede et al., (2021)** ont signalé que les isolats de rhizobium nodulant le niébé ont pu utiliser une grande variété de sources de carbone avec une variation entre les isolats, dont le pourcentage d'utilisation le plus faible (46,43 %) a été trouvé pour le maltose. Ce résultat est conforme au rapport de **Stowers et Elkan (1984)** qui ont rapporté que isolats de niébé ont montré une croissance sur différentes sources de carbone telles que le glucose, le fructose, le galactose et l'arabinose en les utilisant comme bonne source d'énergie avec une réponse de croissance limitée sur le lactose et maltose. **Wang et al., (2012)**, ont rapporté que le *Bradyrhizobium arachidis* peut utiliser du d-glucose, mais ne peut pas utiliser du maltose comme seule source de glucides.

Cependant, **Argaw (2007)** et **Hassan et al. (2015)** ont rapporté que les Rhizobia peuvent également utiliser le lactose comme source de carbone. De même, **Hossain et al., (2019)**, ont rapporté que, tous les isolats de rhizobia à croissance rapide nodulant l'arachide ont montré une meilleure croissance en présence des disaccharides comme le lactose et le saccharose. **Ishihara et al., (2002)** ont noté que le xylose est le préféré des monosaccharides, favorisant une meilleure croissance que le glucose et le galactose. Une possibilité pour ces dissemblances est du aux différentes espèces et biovars utilisés dans les tests (**Zabaloy et Gomez, 2005**). Alternativement, **Wagner et al., (1995)** ont signalé que la composition du milieu de culture pour tester l'utilisation des sources de carbone ou le temps d'incubation peut avoir causé les différences observées.

Dans la présente étude, les isolats EP72, EP6, SP32, EP1, SP42, HBA1, SP8, EP12, EP52 et EP42 ont montré une très bonne croissance sur toutes les sources de carbone fournies et ces isolats sont connus pour utiliser une gamme plus large de source de carbone. Ces isolats ont un avantage de sélection en raison d'une utilisation plus large des nutriments et, par conséquent, sont utiles pour exploiter la fixation de l'azote pour une production durable. Par conséquent, ces isolats ont un meilleur avantage sur ceux ayant une utilisation limitée de sources de carbone.

L'hétérogénéité observée dans l'utilisation des sources de carbone parmi les souches de Rhizobium peut avoir une pertinence écologique car elle pourrait influencer la capacité de l'organisme à vivre de manière saprophyte dans le sol, à coloniser les racines des plantes et à vivre en symbiose (**Chakrabarti et al. 1981; McInroy et al. 1999**). Selon **Degefu et al. (2018)**, les isolats qui utilisent une gamme plus large de source de carbone sont d'une importance primordiale pour la production d'inoculum pouvant être

utilisé dans des sols contenant différentes sources de carbone. Par ailleurs, dans les sols pauvres en carbone organique, l'utilisation de différentes sources de carbone pourrait donner à ces isolats l'avantage de vivre et de persister dans le sol (**Abdelnaby et al., 2015**). En général, les souches qui ont pu se développer sur diverses sources de carbone ont un avantage sélectif dans la colonisation du sol ou de la rhizosphère par rapport à ceux cultivés sur des sources restreintes de carbone (**Zabaloy et Gomez, 2005**).

II-5-3-5 Utilisation des acides aminés

Le test d'utilisation des acides aminés est l'une des caractéristiques physiologiques nécessaires à la sélection d'isolats pour différentes conditions écologiques (**Kebede et al., 2021 ; Jida et Asefa, 2011**). Notre étude a révélé l'existence d'une différence entre les isolats nodulant l'arachide dans l'utilisation de différentes sources d'azote (figure 12)

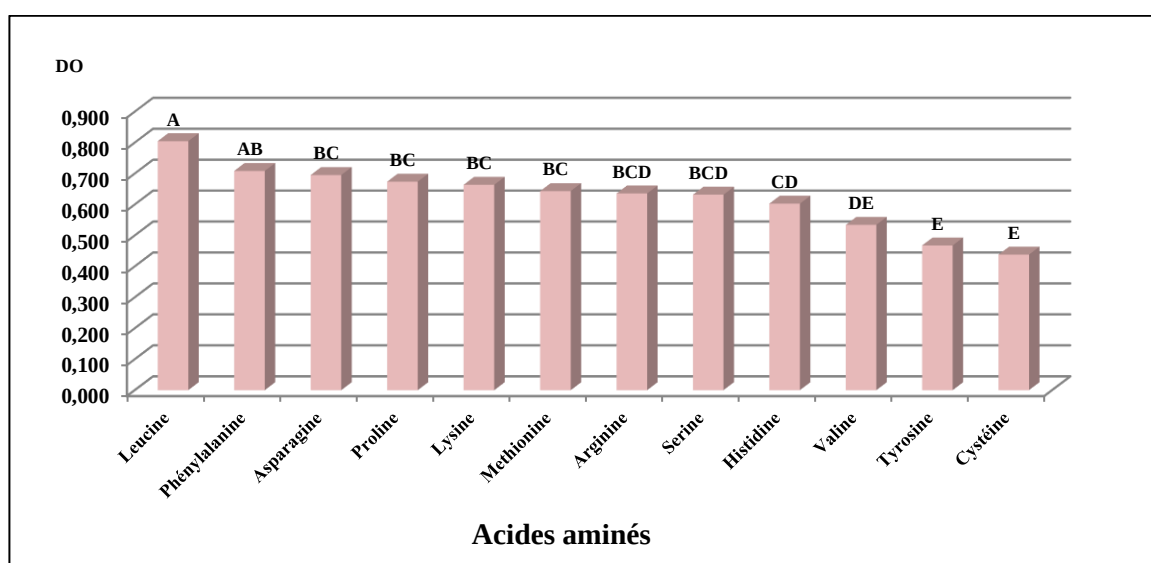


Figure 12: Croissance des isolats sur milieu de culture enrichi en acides aminés

Les données sur les propriétés nutritionnelles azotées ont montré que tous les isolats ont été capables de métaboliser la leucine, la phénylalanine, l'asparagine, la proline, la lysine et la méthionine. La majorité ont utilisé l'arginine, la serine, l'histidine, la valine et moyennement la tyrosine et la cystéine. Ce qui indique que la plupart des rhizobiums nodulant l'arachide ont pu utiliser une grande variété d'acides aminés.

La meilleure densité optique a été enregistrée pour la leucine. L'analyse statistique a montré une différence significative des isolats vis-à-vis de l'utilisation des

acides aminés. Les résultats sur l'utilisation de l'azote par les isolats d'arachide dans la présente étude concordent avec d'autres travaux (**Degefu et al., 2018, Khaled et al., 2020 ; Kebede et al., 2021**). En général, les résultats impliquent que les isolats testés, qui ont pu se développer sur diverses sources d'azote, ont un avantage sélectif sur ceux cultivés sur des sources restreintes de carbone et d'azote.

Vingt-neuf isolats (60.41%) ont utilisé toutes les sources d'azote mises à leur disposition. Ces isolats sont connus pour utiliser une gamme plus large de source d'azote, ce qui les rend principalement importants pour la production d'inoculum. **Girmaye et al. (2014)** ont noté que 48 % des isolats ont utilisé toutes les sources d'acides. **Jida et Asefa (2011)** ont indiqué que la capacité des isolats d'utiliser une gamme plus large de sources d'azote leur permet la survie et la compétitivité avantage dans le sol.

Degefu et al (2018), ont rapporté que tous les isolats nodulant l'arachide et le niébé ont poussé sur L-proline, L-arginine, L-alanine, L-leucine, L-phénylalanine, L-acide glutamique, L-histidine, L-thréonine et L-asparagine comme source d'azote. Cependant, avec la glycine et la D-sérine, se sont avérées inhiber sélectivement la croissance d'un certain nombre d'isolats. En conséquence, la glycine et la D sérine n'ont été utilisées que par 31 et 30% des isolats, respectivement. Dans une autre étude **Degefu et al. (2018)** ont signalé qu'environ 95 % des rhizobia nodulant le pois d'Angole (*Cajanus cajan* L. Millsp.) ont utilisé les différentes sources d'acides aminés. Cependant, les acides aminés les plus sélectifs étaient la glycine et la D-sérine. **Wang et al. (2012)** ont signalé que les Rhizobia testés ont pu utiliser la l-arginine, la l-phénylalanine et la l-thréonine, mais n'ont pas utilisé l'acide d-glutamique, la l-lysine et la l-méthionine comme seules sources d'azote. Les isolats qui n'ont pas pu utiliser les différentes sources d'azote fournies avec les milieux de culture, montre que ces derniers ont une capacité d'utilisation sélective. En général, les résultats impliquent que les isolats testés, qui ont pu se développer sur diverses sources d'azote, ont un avantage sélectif sur ceux cultivés sur des sources restreintes de carbone et d'azote. Dans la présente étude, les isolats EP72, SP32, BDJ1, EP1, HBA1, SP72 ont montré une très bonne croissance sur toutes les sources d'azote fournies et ces isolats sont connus pour utiliser un plus large éventail de sources de d'azote.

Nous pouvons donc conclure de ce test que les isolats de cette étude n'étaient pas trop exigeants quant à leur besoin en acides aminés ; au contraire, ils ont pu se développer sur une large gamme d'acides aminés. Ainsi, ces isolats pourraient donc survivre et

s'établir eux-mêmes dans un environnement où les sources d'azote constitueraient un facteur limitant pour la croissance.

II-5-4 Antibiorésistance des isolats

Les antibiotiques sont introduits dans le sol soit par des organismes producteurs d'antibiotiques ou bien par les matières fécales et l'urine qui persistent et s'accumulent dans les sols après des applications répétées de fumier (**Eliopoulos et al., 2004 ; Ji X et al., 2014**). La performance de l'inoculation de *Rhizobium* dans les champs agricoles et son efficacité sont critiques en raison de la compétition entre les *Rhizobiums* introduits et les *Rhizobiums* indigènes présents à des densités élevées. La résistance aux antibiotiques a été fréquemment utilisée pour distinguer la souche inoculante, introduite des *Rhizobiums* indigènes et surveiller leur survie et l'occupation de nodules de légumineuses (**Naamala et al., 2016**), **Kittiwongwattana et Thawai, 2014**). Le profil de la résistance des souches aux 12 antibiotiques testés, révèle une variabilité de la résistance des souches (photo 4). De manière générale, les isolats ont exhibé une grande résistance aux antibiotiques testés.

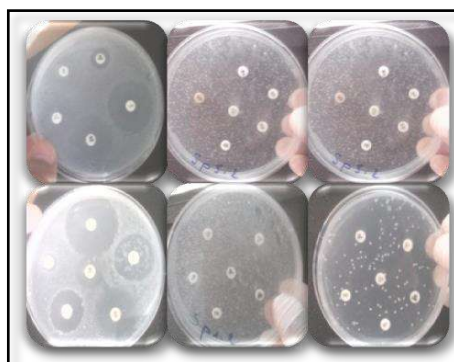


Photo 4: Antibiotogramme de quelques souches.

Il ressort des résultats obtenus représentés dans la figure 13, que les souches ont de fortes résistances, qui dépassent les 85% ont été notées avec le groupe de bêta-lactamines (pénicilline, amoxicilline, Cefazoline), la Spiramycine, le groupe d'aminoglycoside (gentamicine et netilmicine), allant jusqu'à 100% pour la netilmicine. Cependant une sensibilité a été enregistrée pour les souches vis-à-vis de l'acide pipemidique et la tétracycline avec des pourcentages de résistance de 47,91% et 58,33%

respectivement. **Graham et al., (1991)** ont rapporté que l'effet inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature et de sa concentration dans le milieu.

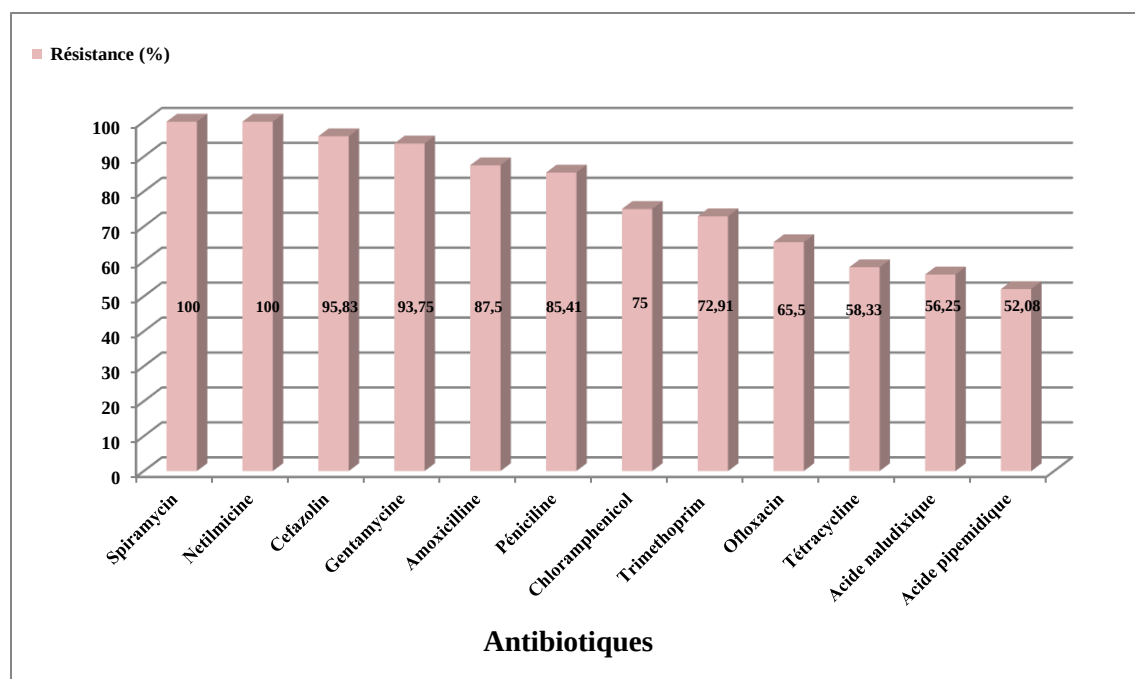


Figure 13 : Pourcentage d'antibiorésistance des isolats nodulant l'arachide.

Bien que la résistance aux antibiotiques chez les bactéries soit une menace dans le secteur de la santé (**Alekshun et Levy, 2007 ; Tenover, 2006 ; Xiong et al., 2015**), il s'agit d'un trait souhaitable dans les populations de rhizobia indigènes et introduites. La résistance aux antibiotiques augmente les chances de survie des Rhizobia dans la rhizosphère (**Anand et al., 2015, Zahran, 1999**). Les Rhizobia doivent être résistantes aux concentrations d'antibiotiques qui inhibent la croissance des autres bactéries du sol tout en préservant leur infectivité et effectivité symbiotique. Malgré que la majorité des souches rhizobiennes dans le sol soient sensibles aux antibiotiques, d'autres ont développé une résistance en réponse aux antibiotiques produits naturellement (**Wiener, 1996 ; Xavier et al., 1998**). Contrairement à la résistance à certains stress du sol, qui peut dépendre de l'origine des souches de Rhizobium, la résistance peut être développée envers une ou plusieurs classes d'antibiotiques (**Anand et al., 2015**). Il a été rapporté que ces bactéries possèdent un chromosome et plusieurs plasmides et/ou mégaplasmides qui peuvent représenter 50 % du génome. Les plasmides non symbiotiques peuvent coder pour des traits adaptatifs locaux qui confèrent des avantages phénotypiques, tels que des

gènes de résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques. En termes évolutifs, les gènes codés par plasmide ont l'avantage d'être plus facilement échangeables au sein d'une certaine population que les gènes localisés dans le chromosome (**Alexandre, 2006**). **Kumbhar et Watve, (2013)** ont signalé que, l'augmentation de la résistance des rhizobiums aux antibiotiques est principalement due aux gènes mobiles sur les plasmides qui peuvent se propager facilement à travers les populations. Par ailleurs, la résistance intrinsèque/innée d'une espèce bactérienne résulte de la présence de gènes portés par le chromosome (**Dermott et al., 2003**). Ces gènes comprennent l'ampicilline et b-lactames trouvées dans les bactéries gram-négatives. **Cole et Elkan (1973)** ont rapporté que le *Bradyrhizobium japonicum* porte des gènes de résistance aux antibiotiques supplémentaires chromosomiques. Plusieurs études ont rapporté une bonne résistance des rhizobia aux antibiotiques (**Bhargava et al., 2016 ; Naamala et al., 2016 Khalid et al., 2020**).

La résistance intrinsèque des Rhizobia aux antibiotiques pourrait résulter d'un manque de site cible de l'antibiotique. Les espèces bactériennes présentant une résistance intrinsèque pourraient être résistantes à une ou plusieurs classes d'antibiotiques (**Dermott et al., 2003 ; Tenover, 2006**). **Bhargava et al. (2016)** ont signalé que la production de quantités élevée d'EPS peut empêcher l'absorption de l'antibiotique par les Rhizobia. Par ailleurs de nouvelles souches résistantes prolifèrent et se propagent dans le sol sous la pression sélective, qui résulte de l'exposition des populations de rhizobiums aux antibiotiques (**Naamala et al., 2016**).

II-5-5 Lyse des phages

Les bactériophages sont omniprésents dans les populations bactériennes et contribuent de manière significative à l'écologie et à l'évolution des communautés microbiennes (**Harrison and Brockhurst, 2017**). Rhizobiophages ou bactériophages lysant les Rhizobiums constituent le facteur biotique le plus important, affectant le nombre de rhizobiums et la nodulation des légumineuses dans les sols agricoles (**Shahaby et al., 2014**). De plus, ces virus peuvent également modifier leur diversité génétique par transduction et/ou conversion lysogénique (**Williamson et al., 2013**). De nombreuses études ont rapporté l'isolement et la caractérisation des phages de Rhizobium, y compris leur rôle dans l'écologie de Rhizobium (**Jaiswal et Dhar. 2011 ; Jaiswal et al., 2012**). Généralement, les phages ont été utilisés pour le typage des

souches de *Rhizobium* indigènes en tant qu'indicateurs de diversité et de performance symbiotique (**Bromfield et al., 2010 ; Jaiswal et al., 2012 ; Ford et al., 2021**).

Les résultats de cette étude, ont montré la présence des rhizobiophages dans les sols des différentes régions d'étude. Ainsi, ils ont marqué leur pouvoir de parasiter les rhizobia nodulant l'arachide (figure 14).

Selon **Allen et Allen (1950)**, **Appunu et Dhar (2006)** et **Williamson et al., (2013)** la présence de phages capables de parasiter et de réduire le nombre de rhizobiums fixateurs de N_2 dans les sols a des implications sur la réduction de la fixation de N_2 et de la contribution de N_2 dans cette légumineuse dans les systèmes de culture traditionnels.

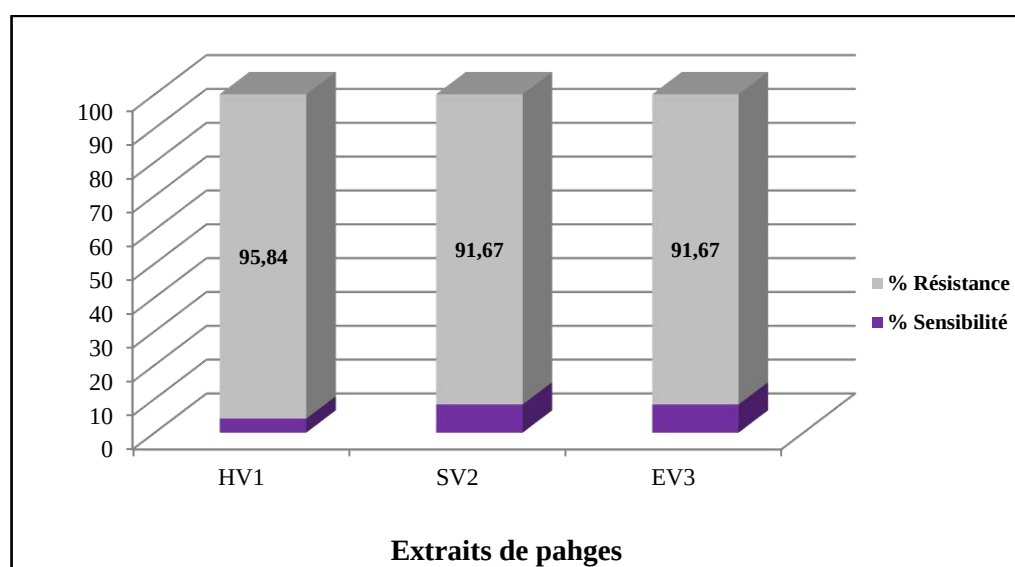


Figure 14: Pourcentage de résistance et de sensibilisé des isolats aux extraits ; HV1 : Extrait de phages de Hassi Ben Abdellah ; SV2 extrait de phages de Sebseb ; EV3 : extrait de phage d'El-Mansoura.

À partir d'essais biologiques des extraits de phage, certaines gouttes ont formé des plaques ou des zones creuses sur le tapis bactérien. Sur les 48 isolats bactériens testés, seuls dix ont formé des zones creuses avec les suspensions de sol et présentaient donc une sensibilité à l'invasion des phages. La présence de souches de *Rhizobium* résistantes et sensibles aux phages suggère que les phages jouent un rôle important dans la sélection ou l'élimination de certains génotypes (**Barnet, 1980, Mendum et al., 2001**). Ainsi, nous avons enregistré un taux de résistance supérieur à 91%. **Evans et al., (1979)** ont signalé que les bactériophages réduisent la densité de population des souches sensibles de

Rhizobium trifolii à la surface des racines, permettant aux souches résistantes de former des nodules.

Les preuves de cette étude montrent clairement qu'il existe des rhizobiophages dans les sols du Sud Est Algérien, qui peuvent réduire la nodulation et la fixation de N₂ de l'arachide cultivée à plein champ. La présence et la distribution de phages actifs contre divers groupes de rhizobiums ont été signalées dans plusieurs travaux dans différents pays. **Msimbira et al. (2016)**, ont récemment isolés, trois phages infectant l'arachide en Afrique du sud. **Hannane, (2020)** a signalé la présence de la résistance des Rhizobia nodulant *Retama monosperma* L. (Boiss) aux rhizophages dans les sols Oranais.

Dans notre étude nous avons remarqué qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'origine géographique des souches de rhizobia sensibles à un phage particulier provenaient de sites géographiques différents. Ainsi, l'extrait de phages de Hassi Benabdella (HV1) a pu infecter des souches des régions de Sebseb et El-Mansoura, de même l'extrait de phages de Sebseb (SV2) a pu infecter des souches de Sebseb et El-Mansoura. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Santamaría et al. (2014)** pour les *Rhizobium etli* nodulant le haricot de différents pays vis-à-vis des rhizophages du Mexique. Ce modèle, d'après **Santamaría et al. (2014)**, pourrait être attendu d'un phage à large gamme d'hôtes. Les phages de Rhizobia présentent généralement une spécificité au sein de leurs clades d'hôtes, mais peuvent avoir une large infectivité au sein des genres (**Shahaby et al., 2014**).

La résistance et la sensibilité des phages peuvent conduire à un succès de la nodulation différentielle des légumineuses. (**Cavassim et al., 2020**). Les travaux sur les phages lytiques de rhizobium suggèrent qu'ils pourraient jouer un rôle dans la structuration des communautés de rhizobium et, par conséquent, dans les interactions avec leurs légumineuses hôtes (**Harrison et Brockhurst, 2017 ; Ford et al., 2021**).

II-5-5 Taxonomie numérique des traits phénotypiques

Les résultats des tests biochimiques, le schéma d'utilisation des sources de carbone et d'azote des isolats ont été comparés au Manuel de bactériologie déterminative de **Bergey et Vincent (1970)** et **Howieson et Dilworth (2016)**, et ont été confirmés comme Rhizobia. La méthodologie que nous avons utilisée dans cette étude nous a permis de discriminer les 48 isolats comme différentes souches de Rhizobia, révélant l'existence d'une diversité phénotypique remarquable. La taxonomie numérique des 48

isolats a été réalisée sur la base de 33 caractères phénotypiques pour construire un dendrogramme par la méthode UPGMA (figure 15).

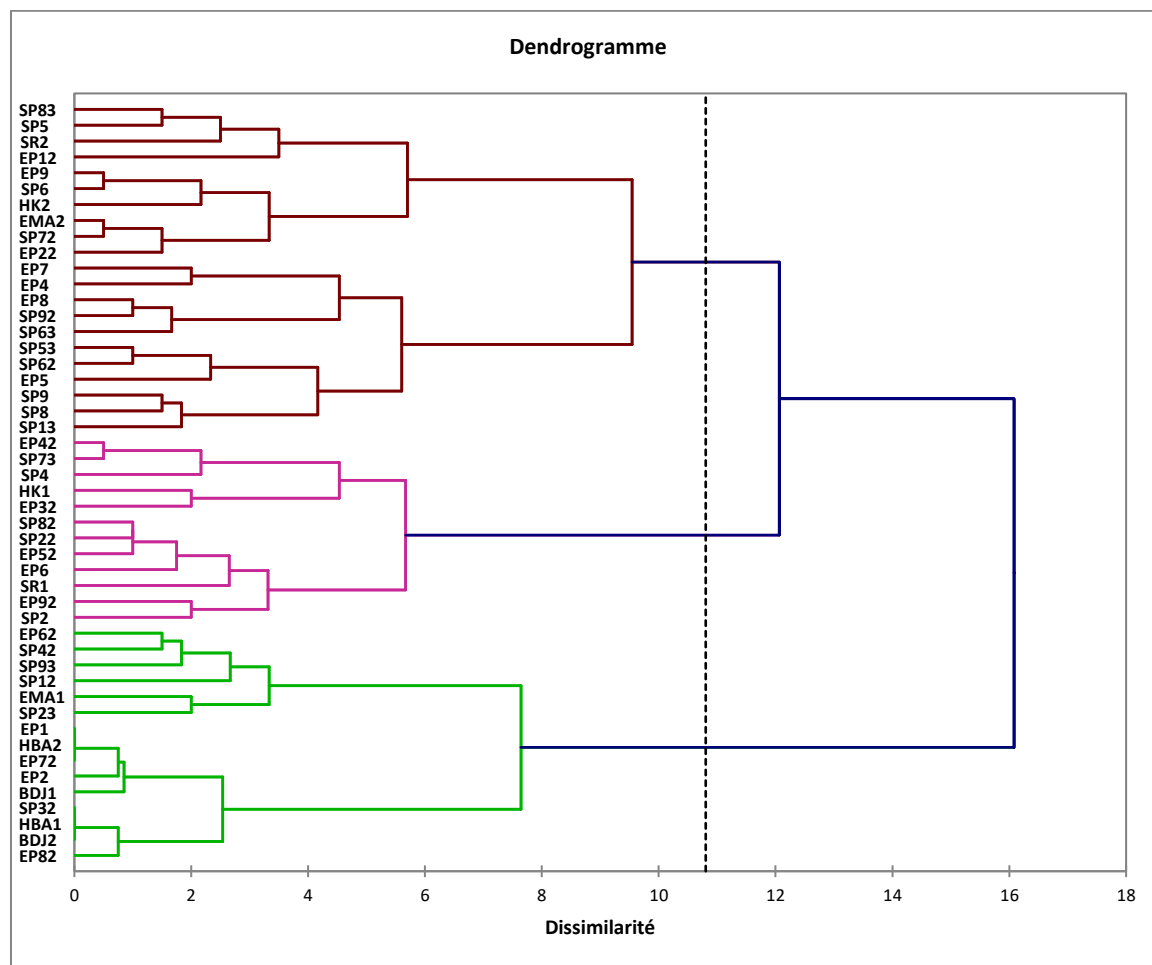


Figure 15: Dendrogramme construit selon la méthode UPGMA montrant la diversité phénotypique de 48 isolats rhizobiens nodulant l'arachide.

Le résultat l'analyse a permis de regrouper les souches en 3 clusters avec 83% niveau de similarité comme point de coupure.

Le cluster 1 comprenait 15 isolats provenant de trois régions d'étude. Ce groupe est très hétérogène composé de 31% des isolats de Rhizobia à croissance rapide et lente, regroupés en 2 sous-clusters à une similarité de 92%.

Le cluster 2 comprend 12 isolats provenant des deux régions d'étude (Sebseb et El-Mansoura). Ce cluster contenait 25% des isolats composés exclusivement de Rhizobia à croissance lente à l'exception de la souche EP42 caractérisée par une croissance intermédiaire. Ainsi, il est réparti en deux grands sous-clusters à un niveau de similarité de 94%.

Le cluster 3 est composé de 21 isolats, provenant des deux régions d'étude (Sebseb et El-Mansoura). Ce cluster comprend 43% des isolats de la collection, dont des Rhizobia à croissance lente, rapide et intermédiaire, divisé en deux sous clusters avec un niveau de similarité de 90%.

Il a été rapporté qu'un nombre important d'isolats à croissance lente, associés à l'arachide, sont phylogénétiquement plus susceptibles de comprendre des *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii* et autres espèces de *Bradyrhizobium* (Yang et Zhou, 2008).

Dans des études antérieures, basées sur une approche taxonomique numérique, il a été constaté que les souches de *Bradyrhizobium japonicum* se regroupaient toujours avec d'autres *Bradyrhizobium* spp. au niveau de similarité de 70 % ou au-dessus (Van Rossum et al., 1994). En outre, des rhizobiums à croissance lente obtenus dans la province de Hainan, en Chine, et trois souches représentatives de *Bradyrhizobium japonicum*, ont été regroupés à un niveau de similarité de 81 % (Gao et al., 1994). De même, la majorité des isolats (58 %) dans le cadre de l'étude de Degefu et al (2018) ont été regroupés avec *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii* à un niveau de similarité de 82 %. Ainsi nos souches à croissance lente pourraient être étroitement liées aux souches de *Bradyrhizobium*. Cependant, une analyse génétique plus poussée des souches s'avère nécessaire.

Il a été rapporté que les rhizobiums à croissance très rapide, rapide, intermédiaire et lente sont mélangés les uns aux autres et apparaissent donc comme un seul groupe (Odee et al., 1997). De même, dans ce travail, les croissances lentes et les croissances rapides sont réunies dans les groupes 1 et 3. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux sur les rhizobiums d'*Arachis hypogaea* L cultivés sur les sols argentins (Taurian et al., 2006). Il est intéressant de noter que le regroupement des isolats au sein des différents clusters ne coïncidait pas tant avec leur origine géographique que précédemment observé dans le dendrogramme généré à partir des caractéristiques phénotypiques (figure 15) . Ceci est probablement dû à l'influence majeure des conditions édapho-climatiques sur le phénotype bactérien (El-Akhal et al., 2009).

Conclusion

En conclusion, cette étude préliminaire basée sur les caractéristiques morphophysiologiques a fourni une collection bien caractérisée et préservée de souches de *Rhizobium* provenant des nodules de l'arachide et a exploré la présence de rhizobiums indigènes nodulant l'arachide dans la zone d'étude.

Il est recommandé de caractériser davantage les isolats de test en utilisant des techniques moléculaires modernes afin d'élucider la bonne identité des souches. De plus, l'efficacité symbiotique dans des conditions de serre et de champ, ainsi que l'évaluation de la compétitivité par rapport aux souches indigènes devraient être étudiées pour exploiter les avantages que ces isolats de test pourraient offrir pour la production de l'arachide.

Selon **Degefu et al. (2018)**, la sélection des rhizobiums comme inoculant et pour la production de biofertilisants, nécessite des isolats ayant une plus grande tolérance à de nombreux stress écologiques et leur plus grande capacité à rivaliser pour l'utilisation des nutriments.

CHAPITRE III :

*Production d'inoculum et réponse de
l'arachide à l'inoculation*

Introduction

L'inoculation des graines avec des Rhizobia efficaces est une pratique ancienne qui remonte à la fin du siècle dernier (**Catroux et al., 2001**). Cette méthode consiste à introduire des souches ces bactéries dans la rhizosphère sol-plante, en utilisant un inoculum sous forme solide ou liquide (**Baraibar, 2000**). Cette inoculation des plantes permet de garantir la présence adéquate et en quantité suffisante de souches de rhizobiennes dans la rhizosphère, favorisant ainsi une nodulation abondante et une fixation efficace de l'azote (**Wolde-meskel et al., 2018**). Malgré les éventuelles difficultés rencontrées lors de cette pratique, elle reste relativement simple (**Date, 2000**).

L'inoculation est considérée comme source d'engrais azotés respectueuse de l'environnement. Il a été estimé que 2000 tonnes d'inocula sont produites annuellement dans le monde. Cette quantité est considérée comme suffisante pour inoculer 20 millions d'hectares de Fabacées (**Rebah et al., 2007**). Les plus grands producteurs se trouvent aux Etats-Unis avec une production annuelle de 1000 tonnes (**Singleton et al., 1997**).

Différentes formes d'inoculums sont disponibles, telles que des poudres, des granulés ou des liquides (**Date, 2000 ; Deaker et al., 2004**). L'application directe sur les semences est la méthode d'inoculation la plus courante. D'autres techniques proposent l'inoculation sur des granulés minéraux (**Wadoux, 1991**) ou sur le lit de semence (**Hynes et al., 1995**). Au cours des dernières décennies, les progrès technologiques ont conduit à l'utilisation de sous-produits économiques et faciles à utiliser en tant que supports pour les rhizobiums (**Ben Rebah et al., 2007 ; Brockwell et Bottomley, 1995 ; Denton et al., 2009**).

Les inoculums sont produits et disponibles commercialement dans de nombreux pays. Leur qualité est déterminée par plusieurs facteurs, tels que le nombre, l'efficacité et la stabilité génétique des souches rhizobiennes qu'ils contiennent (**Brockwell et Bottomley, 1995 ; Stephens et Rask, 2000 ; Amarger, 2001**). De plus, leur capacité à rivaliser avec les rhizobiums indigènes et leur persistance dans le sol sont également des éléments importants à prendre en compte (**Graham et Vance, 2003**).

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était en premier la production de deux formes d'inocula et deuxièmement de connaître la réponse de l'arachide à l'inoculation et de comparer l'efficacité des différents inoculants. L'inoculation de l'arachide n'est pas

une pratique courante et le but de cette étude consistait à comparer les effets des inoculants sur la nodulation, la croissance et le rendement chez l'arachide.

III-1 Matériel et Méthodes

III-1-1 Matériel biologique

Quatre souches de rhizobia associées à l'arachide, provenant des régions de Ouargla (Hassi Ben Abdallah) et de Ghardaïa (Sebseb et El-Mansoura), préalablement isolées et caractérisées ont été utilisées. Elles ont été sélectionnées parmi une cinquantaine de souches pour leur capacité à tolérer les conditions pédoclimatiques prédominantes dans ces régions. Deux souches sont à croissance rapide, une à croissance moyenne et une dernière à croissance lente. Les codes des quatre microsymbiontes utilisés sont mentionnés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Codes des souches, site d'échantillonnage, type de croissance et localisation géographique.

Codes expérimentaux	Site d'échantillonnage	Plante hôte	Type de croissance	Localisation
HBA1	Hassi Benabdellah	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Rapide	32°00'77'' 5°46'27''
EP1	El-Mansoura	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Rapide	31°95'79'' 3°64'23''
SP32	Sebseb	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Moyenne	32°15'70'' 3°58'03''
EP72	El-Mansoura	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Lente	31°95'50'' 3°64'28''

Les souches ont été repiquées sur un milieu solide (photo 5) à base d'extrait de levure et de mannitol (YMA). La préparation d'inoculum liquide de différentes souches a été réalisée par la mise en culture des souches étudiées dans un milieu YEM liquide à pH 6.8. L'incubation a été effectuée dans un incubateur agitateur à 200 tr/min, à la température de 28°C pendant 3 à 7 jours selon le type de croissance des souches pour obtenir une concentration d'environ 10^9 UFC ml⁻¹ (Vincent, 1970).



Photo 5 : Repiquages des souches sur boîtes de Pétri.

III-1-2 Matériel végétal

Le matériel végétal ayant fait l'objet de cette étude est constitué d'une population locale d'arachides, originaire de Ghardaïa. Les graines ont été désinfectées par immersion dans l'éthanol 95% pendant 10 secondes puis dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaClO) à 5% durant 2 minutes, puis rincées 10 fois à l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace du désinfectant (**Tillard et Drevo, 1988**). Au dernier lavage, les graines ont été gardées dans des flacons d'eau distillée stérile au réfrigérateur à 4°C pendant une nuit pour l'imbibition (**Somasgaran et Hoben, 1985**).

III-1-3 Production d'inoculum

Cette étape vise à obtenir une densité élevée de rhizobiums dans le milieu de culture YMB. Cependant, ce processus est influencé par plusieurs facteurs tels que le milieu de culture, la souche de rhizobienne, la température et l'aération (**Yokoyama et al., 2006**). Ce milieu a été choisi en raison de ses propriétés favorables à la croissance des Rhizobiums et à la production d'inoculum de haute qualité (**Montange et Beunard, 1984**).

Les suspensions bactériennes ont été préparées par introduction d'une colonie de chaque la souche à l'aide d'une anse de platine dans un tube à essai contenant le milieu YEM liquide stérile. Ce dernier est réputé être le mieux adapté pour l'étude des

Rhizobiums, il est utilisé pour l'isolement et la production de biomasse des souches des Rhizobiums. Les tubes inoculés par les 4 souches ont été incubés dans un incubateur agitateur à 200 tours/min, à 28°C pendant 3 jours pour l'inoculum des souches à croissance rapide, 5 jours pour celles à croissance moyenne, et 7 jours pour les souches à croissance lente.

Une colonie de chaque souche est prélevée par une anse de platine puis repiquée dans un flacon contenant 100 ml de milieu YEM liquide avec 2 répétitions pour chaque souche, puis placées dans un incubateur agitateur à 200 tr/min, à 28°C pendant 3 jours pour l'inoculum des souches à croissance rapide, 5 jours pour l'inoculum des souches à croissance moyenne, et 7 jours pour l'inoculum des souches à croissance lente. Après incubation, elles ont été conservées au réfrigérateur à 4°C.

Ces précultures ont été utilisées selon la méthode de **Vincent (1970)** et **Somasegaran et Hoben (1994)** pour inoculer des flacons de 250 ml contenant 100 ml de YMB stérile avec 1 ml puis incubés dans un incubateur avec agitation de 200 tr/min, à 28°C. La durée d'incubation est de 3 jours pour l'inoculum des souches à croissance rapide, 5 jours pour celle des souches à croissance moyenne et 7 jours pour l'inoculum des souches à croissance lente. Il est nécessaire d'obtenir une DO égale à 0.6 (à 620 nm lue sur spectrophotomètre), correspondant à une concentration cellulaire de 10^7 cellules/ml. Cette corrélation est déterminée par mesure de la DO et numération des bactéries vivantes sur YMA. Dans le but de standardiser la concentration des bactéries dans le milieu, une dilution est effectuée selon la méthode décrite par **Allem (2011)**.

III-1-4 Préparation du support solide

Plusieurs types de supports peuvent être utilisés. Dans cette expérience, nous avons opté pour la tourbe qui a été séchée, neutralisée et stérilisée avant utilisation.

III-1-4-1 Détermination de l'humidité du support

L'humidité de la tourbe est évaluée en utilisant la méthode décrite par **Somasegaran et Hoben (1994)**. Après avoir séché la tourbe dans une étuve ventilée à 70°C pendant 48 heures, la teneur en humidité du support est calculée en utilisant la formule suivante :

$$M = (W1 - W2) / W2 \times 100$$

M : humidité du support (exprimée en %) ;

W1 : poids frais du support (g) ;

W2 : poids sec du support après séchage à 70°C.

III-1-4-2 Détermination du volume d'inoculum absorbé par le support

Le volume d'inoculum a été déterminé en fonction de la capacité de rétention de la tourbe selon la méthode de **Somasegaran et Hoben (1994)**, qui consiste à ajouter 50 ml d'eau distillée à 20 grammes de tourbe, agiter pendant 2 heures, puis filtrer l'homogénat. La différence entre le volume initial et le volume recueilli d'eau, correspondant à la capacité de rétention. Le support doit être neutralisé en ajustant le pH entre 6.5 et 7 avec addition de CaCO_3 . La tourbe a été mise dans des petits sacs en polyéthylène haute densité d'une dimension de 10x15 cm, à raison de 5g par sac, puis autoclavée à 120°C pendant 20 mn.

Sous une hotte à flux laminaire, l'inoculation des sacs a été réalisée à raison 60% de la capacité de rétention de la tourbe avec les différentes souches à l'aide d'une seringue stérile. Les sacs ont été étiquetés avec le nom de la souche et la date de production (photo 6).



Photo 6 : Production des inoculums ; a : inoculums liquides, b :inoculums solide à base de tourbe.

III-1-5 Conduite de la culture

Le substrat de culture utilisé est exclusivement composé de sable provenant de la haute dune du site sablonneux de la zone de Sidi Khouiled, située dans la région de Ouargla, appartenant au grand erg oriental. Avant son utilisation, ce sable a subi un

processus de déminéralisation. Selon la méthode décrite par **Djerroudi et al. (2017)**, le sable a été tamisé pour éliminer toutes les impuretés d'origine végétale ou animale, puis lavé avec de l'acide chlorhydrique (HCl) pendant 20 minutes afin de supprimer les carbonates, les chlorures, etc. Ensuite, il a été lavé plusieurs fois à l'eau distillée pour éliminer toute trace d'acidité, puis séché à l'air libre. Dans le but de garantir l'absence de toute forme de vie microbienne, le sable a été soumis à une température de 180°C pendant 2 heures dans un four Pasteur. Après cela, il a été stocké dans des sachets stériles.

Des mesures de pH et de conductivité électrique (CE) ont été réalisées avant et après le traitement du sable, conformément à la méthode décrite par **Pansu et Gautheyrou (2003)**.

Les essais ont été menés dans une serre semi-contrôlée située à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Ouargla, entre février et avril 2018. Les conditions de croissance maintenues étaient de 20/25 °C avec une humidité relative de 50/60 %. Les graines ont été semées dans des pots en plastique carrés d'un litre de volume, remplis de sable stérile. Trois graines ont été semées par pot (voir photo 7).



Photo 7: Semis des graines et mise en place de l'expérimentation.

III-1-5-1 L'inoculation des graines d'arachide

Deux méthodes d'inoculation ont été utilisées pour cette étude, en fonction du type d'inoculum (liquide ou solide).

Après la levée des plantes d'arachide, 3 ml d'inoculum de chaque souche ont été ajoutés. Les suspensions bactériennes ont été introduites aseptiquement, à l'aide de seringues médicales pour chaque inoculum, à la base des tigelles des jeunes plantules.

La méthode d'enrobage a été appliquée selon la technique décrite par **Feng et al. (2002)** : 10 graines d'arachide stérile ont été mélangées avec 22 g d'inoculum et 10 ml d'une solution d'adhésif qui est la gomme arabique (40%). L'adhésif est obtenu en chauffant 100 ml d'eau distillée à laquelle 2g de gomme arabique sont ajoutés par petite quantité jusqu'à dissolution complète (**Vincent, 1970 ; Graham, 1994**). Les graines inoculées ont été semées après trois heures d'immersion avec l'inoculum solide dans des flacons en verre à une température de 25°C.

Les pots ont été irrigués avec la solution nutritive de Fahraeus dépourvue d'azote (**Vincent, 1970**) dont la composition est mentionnée en annexe 1. Un témoin non inoculé (T) ainsi qu'un témoin azoté (TN), pour lequel 1g/l de KNO₃ ont été apportés, sont utilisés.

III-1-6 Les paramètres étudiés

Après 8 semaines de l'application des inoculums, les plantes ont été soigneusement déterrées du sable humidifié pour éviter un déracinement brutal puis rincées à l'eau de robinet. Les paramètres de croissance relatifs à la hauteur de la tige principale et la longueur de la racine principale ont été mesurés à l'aide d'une règle graduée. Les parties aériennes, racinaires et les nodules ont été séparés et les biomasses fraîches et sèches ont été déterminées après séchage dans une étuve à 70°C pendant 72 heures. Le nombre de nodules a été compté à l'œil nu et à l'aide d'une loupe. Les mesures du poids ont été effectuées à l'aide d'une balance électronique. Un dosage d'azote par la méthode KJELDHAL a été réalisé afin de quantifier l'azote fixé par le biais de la fixation symbiotique.

III-1-7 Analyse des données

Les analyses statistiques des résultats expérimentaux obtenus ont été effectuées à l'aide du test ANOVA en utilisant le progiciel d'analyse statistique XLSTAT version 2014.

III-2 Résultats et discussion

III-2-1 Caractéristiques physico-chimiques du substrat de culture

Les résultats des différentes analyses physico-chimiques des échantillons de sable sont consignés dans le tableau 8. Les résultats ont été interprétés selon les normes présentées en annexe 2.

Tableau 8: Résultats des analyses physico-chimiques du sol.

Paramètres	Sable non déminéralisé	Sable déminéralisé
CE (dS/cm)	2.03	0.63
pH	7.2	6.53

A partir des résultats du tab.5, nous avons remarqué que selon les paramètres étudiés, le sable présente des variations entre l'état initial et après traitement. Selon l'échelle **USSL (1954)** et **Aubert (1978)**, les valeurs obtenues montrent que le substrat de culture (sable) analysé avant la déminéralisation présente des valeurs de conductivité élevées (moyenne de 2.03) indiquant un sable salé, à pH très légèrement alcalin (7.2)

D'après **Roloff (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. Les valeurs de CE sont supérieures à 2,0 (ds/cm) et peuvent diminuer les rendements de l'arachide, en fonction des ions spécifiques présents dans la solution sol-eau (**Furlan et al., 2017**).

Pour toutes les plantes, les facteurs physiques du sol interviennent dans l'adaptation au milieu. L'arachide est une plante qui peut être cultivée sur des sols à pH allant de 4 à 5, mais son pH optimal du sol est compris entre 5,6 et 7,5 et peut varier entre 5 et 8 (**Gillier, 1969**). Elle est peu sensible aux sols alcalins mais préfère les sols avec un pH voisin de la neutralité (**Mayeux, 2001**).

Bien que l'arachide soit considérée comme une culture des terres arides avec de multiples traits d'adaptation aux stress, la salinité associée aux températures élevées est une menace majeure pour sa productivité (**Meena et al., 2016**)

III-2-2 Effet des souches sur la croissance de la plante

III-2-2-1 Morphologie des plantes inoculées

Les plantes inoculées ont montré une diversité dans leur croissance (hauteur des tiges et longueur des racines), poids secs et nombre de nodules. Comparés aux plantes témoins, les plantes inoculées par un inoculum solide, à base de tourbe, sont plus vertes et leurs parties aériennes sont plus développées (photo 8). La taille des nodules est en relation avec la capacité à supporter les conditions sèches. Selon les travaux de **Ouslim (2016)**, les nodules de petite taille perdent rapidement leur réserve en eau, alors que ceux de taille plus grande possèdent un parenchyme cortical plus épais qui empêche ou réduit leur déshydratation, lorsque la culture est réalisée sur sol sec. De nombreuses études ont indiqué les avantages des inoculants de *Rhizobium* pour la culture d'arachide (**Castor et al., 1999 ; Vicario et al., 2015**). Ces rapports ont signalé que l'application d'inoculants à base de rhizobium, a montré de nombreux effets sur les paramètres culture évalués, était généralement bénéfique.



Photo 8: Croissance et développement des plantes inoculées.

III-2-2-2 Effet de l'inoculation sur la nodulation

Le nombre des nodules est un critère important pour la détermination de la réponse à l'inoculation.

Le nombre total de nodules était plus élevé pour les SP32 TRB et EP72 TRB que pour les souches HBA1 et EP1 (figure 16). L'inoculation avec HBA1 et EP1 a entraîné une augmentation (statistiquement non significative) du nombre de nodules. La nodulation a montré que l'inoculant solide à base de tourbe a été généralement plus bénéfique que l'inoculant liquide appliqué aux semences.

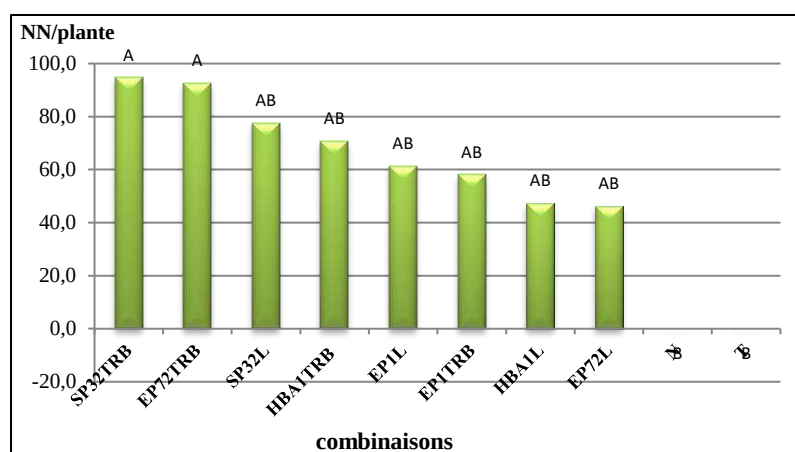


Figure 16: Effets de l'inoculation de l'arachide avec diverses souches de Rhizobiums sur le nombre total de nodules (NN).

Ceci est probablement en relation avec l'apport de la matière organique contenue dans la tourbe qui favorise la croissance et la résistance des bactéries dans le sable. Cette constatation est corroborée par des résultats d'**Agraw et al. (2017)**, **Abdulameer et al. (2011)** et **Badar et al. (2015)**.

Hynes et al. (2001) ont suggéré que les Rhizobium formulés sous forme liquide étaient plus susceptibles de souffrir davantage de stress environnementaux tel que l'excès d'humidité du sol, par rapport à ceux dans d'autres formulations. La tourbe est le support le plus fréquemment utilisé dans l'industrie des inoculants rhizobiens en raison de sa grande capacité de rétention d'eau et de sa surface qui favorisent la croissance et la survie des rhizobiums (**Singleton et al., 2002**). Cependant, la tourbe n'est pas disponible dans de nombreux pays et la production d'inoculants à base de tourbe nécessite une quantité importante de traitement avant d'être utilisée dans un système de production commerciale (**Tittabutr et al., 2007**).

L'inoculation de l'arachide avec des Rhizobia a exercé une grande amélioration de l'état de la nodulation, ce qui a conduit à des augmentations significatives du nombre des nodules par rapport à l'arachide non inoculée. Cette observation a également été rapportée par **El-Sawy et al. (2006)** et **Badawi et al. (2011)**. Cela a pu être observé à partir des différences frappantes entre les traitements inoculés et non inoculés et a souligné l'importance vitale de poursuivre l'inoculation des graines d'arachide successivement avec des souches efficaces. Dans cette préoccupation, l'inoculation de

graines de légumineuses est un moyen efficace et pratique d'introduire des rhizobiums très efficaces dans le sol pour améliorer la production d'arachides (**Deaker et al. 2004**).

Castro et al. (1999) ont constaté que les racines d'arachide ont été bien nodulées par la souche indigène plutôt que par la souche exotique. Par conséquent, la sélection de souches efficaces en fonction de leur adaptation écologique locale peut augmenter la production de cette culture (**Denton et al., 2003 ; Lindström et al., 2010 ; Bianco et al., 2013**).

III-2-2-3 Effet de l'inoculation sur la croissance

Les résultats de la hauteur moyenne du système aérien et sous terrain par plant sont illustrés par la figure 17.

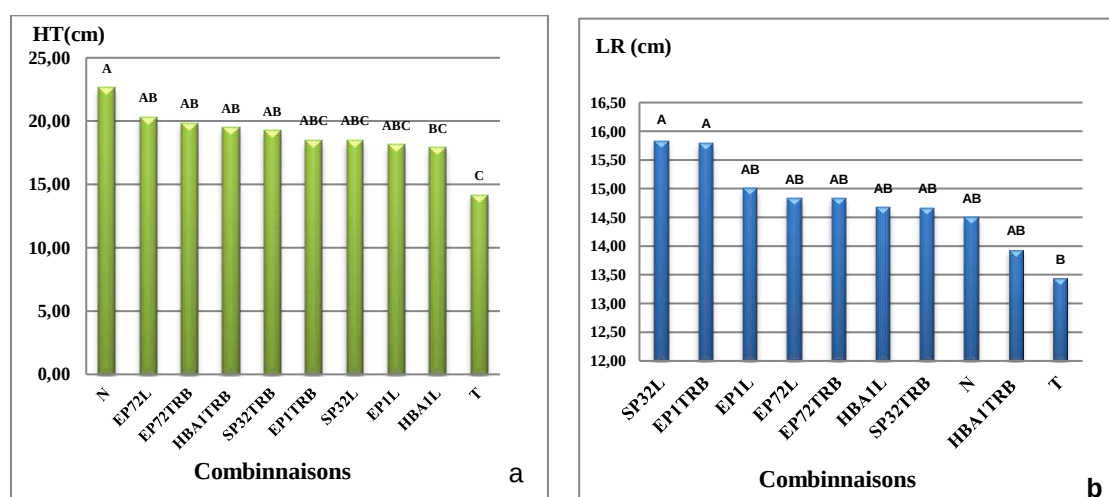


Figure 17: Effets de l'inoculation sur les paramètres de croissance de l'arachide ; a : la hauteur des tiges (HT), b : la longueur des racines (LR).

Nous remarquons que toutes les combinaisons montrent un bon développement comparé au témoin non inoculé. Les plantes inoculées présentent des différences significatives de hauteur de tige et longueur racinaire. Les souches SP32 (liquide) et EP1 (tourbe) ont montré une différence significative de la longueur racinaire par rapport aux autres combinaisons (figure 17 b). Toutes les combinaisons des inoculum tourbe ont induit une réponse similaire de la hauteur des tiges à, l'exception des inoculum EP1 (tourbe). Ce dernier, avec les inoculum liquides des souches HBA1, SP32 et EP1 se sont montrés légèrement moins performants par rapport aux autres inoculum (figure 17 a). Nos résultats sont en accord avec ceux de **Lazali (2009)**, qui signale que la hauteur de la

tige varie légèrement entre les combinaisons étudiées. Ainsi, **Sharma et al. (2011)** n'a pas signalé une différence significative de la hauteur des plants et longueur des racines entre les souches testées. Par ailleurs, **Alem et al. (2011)** ont déclaré que l'inoculation solide augmentait la hauteur des plantes.

Des expériences sur le terrain menées en argentine ont révélé que l'inoculation augmentait les rendements d'arachide par rapport au traitement non inoculé, atteignant des valeurs qui ne différaient pas de celles obtenues avec un traitement inoculant commercial (**Valetti et al., 2016**). Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude menée au Chili, dans laquelle l'inoculation de l'arachide avec les souches *Bradyrhizobium*, a induit une augmentation significative de la croissance des plantes par rapport aux plantes non inoculées sans azote (**Zapata et al., 2014**). En Égypte, il a également été démontré que l'inoculation de l'arachide avec des souches bradyrhizobiennes a entraîné une amélioration considérable du nombre et de la masse des nodules, de la fixation de l'azote et de la croissance des plantes (**Badawi et al., 2011**).

III-2-2-4 Effet de l'inoculation sur le poids sec des plantes

Les résultats de la pesée des parties aérienne et racinaire par plant ont abouti aux résultats illustrés par les figures 18 a et b.

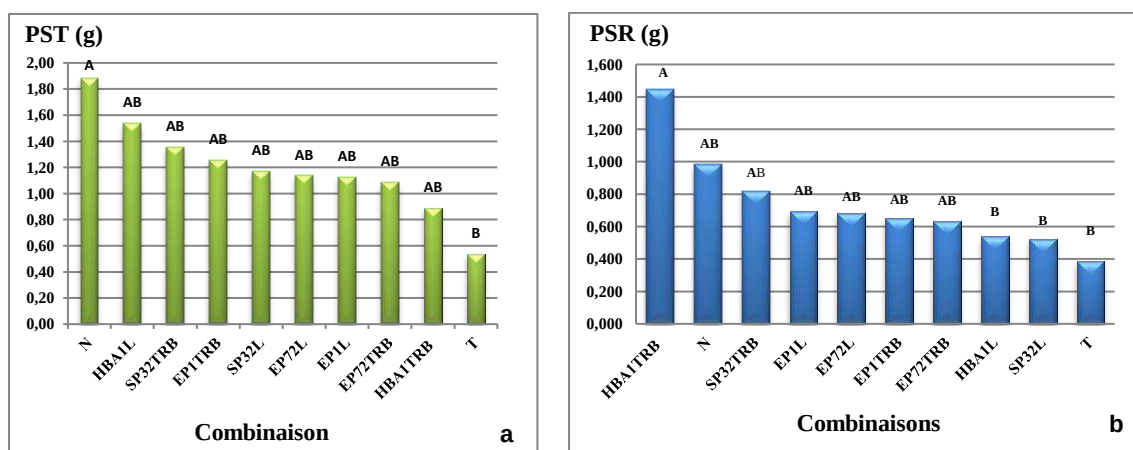


Figure 18 : Effets de l'inoculation sur le poids sec de l'arachide ; a : poids sec des tiges (PST), b : poids sec des racines (PSR).

L'analyse statistique du poids sec du système aérien et racinaire par plant montre que les traitements inoculés sont très hautement significativement différents par

rapport au témoin non inoculé. Par ailleurs, l'inoculation avec la souche HBA1 (tourbe) a montré une différence significative du poids sec des racines comparativement aux autres souches. Aucune différence significative du poids sec des racines des différentes combinaisons n'a été obtenue (figure 18 b).

Les plantes inoculées avec la souche HBA1 (liquide) ont montré une augmentation du poids sec des parties aériennes, mais les différences observées n'étaient pas statistiquement significatives entre les différentes combinaisons utilisées (figure 18 a). Le témoin non inoculé azoté a permis une augmentation significative de la matière sèche des parties aériennes. En général, l'inoculation par les Rhizobia a permis une augmentation du poids sec des plantes par rapport au témoin non inoculé. Cette amélioration pourrait être attribuée au fait que les rhizobiums peuvent augmenter la croissance des plantes en fournissant des produits de fixation de N₂ (**Kumar et al., 2011**). Cette augmentation a été soulignée par plusieurs travaux (**Bogino et al., 2006 ; Agraw et al., 2017, Touil, 2017**).

Ainsi, les travaux de **Vitousek et al. (2015)**, *in situ* sur l'inoculation de l'arachide, ont indiqué que le poids sec des parties aériennes ainsi que pour tous les paramètres de croissance des plantes évaluées ont été améliorés par l'inoculation avec une souche native de Bradyrhizobium par rapport aux plantes témoins non inoculées. De même, **Neellipally (2020)** a rapporté que les traitements d'inoculés avec Bradyrhizobium ont amélioré la synthèse de la chlorophylle et la croissance en hauteur, entraînant des augmentations significatives du poids sec et du rendement des plantes.

Divers auteurs ont constaté que la plupart des espèces de Rhizobium produisent des régulateurs de croissance des plantes, tels que l'acide gibberellique, la cytokinine, l'auxine et de (**Shengepallu et al., 2018 ; Mouradi et al., 2018**). L'amélioration de la croissance des semis d'arachide peut être attribuée à la production de tels régulateurs de croissance qui peuvent fournir directement et indirectement les conditions favorables à la croissance des plantes (**Patel et al., 2017 ; Pria et al., 2019 ; Naceer et al., 2019**).

III-2-2-5 Effet de l'inoculation sur la fixation d'azote

L'azote est parmi les éléments nutritifs nécessaires, le plus souvent limitant pour la croissance des plantes. L'efficacité des performances de fixation de N₂ est exprimée par l'accumulation d'azote dans les tissus végétaux (**Bhargava et al., 2019**).

L'étude de l'effet de l'inoculation sur la teneur d'azote dans la partie aérienne (figure 19), a montré que l'interaction symbiotique a positivement affecté la fixation azotée par l'inoculation avec les Rhizobia par rapport aux plantes témoins non inoculées.

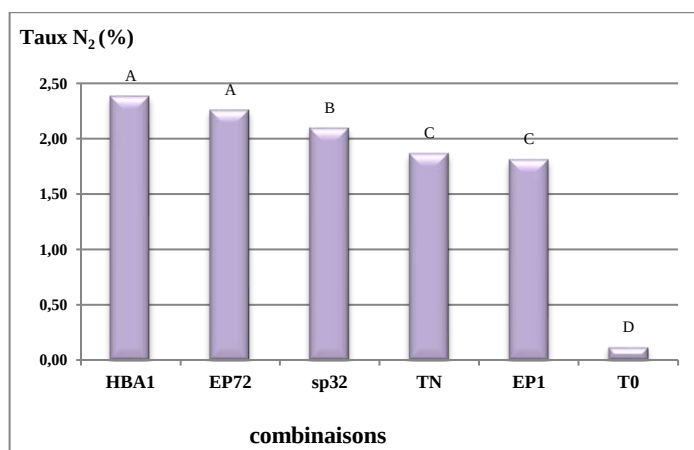


Figure 19: Effets de l'inoculation de l'arachide sur la fixation d'azote

L'ensemble des données obtenues ont montré que toutes les souches testées ont permis un gain en azote nettement supérieur à celui de (T0) et même plus important à celui du témoin azoté pour certaines souches. Une différence significative entre les combinaisons a été constatée, les meilleurs taux d'azote ont été obtenus par les souches HBA1 et EP72, suivies de SP32. Ces dernières ont permis un gain en azote supérieur à celui du témoin azoté et la souche EP1. Ces résultats rejoignent ceux observés dans d'autres travaux (Shil *et al.*, 2007 ; Kabir *et al.*, 2013 ; Alam *et al.*, 2015, Bogino *et al.*, 2006, Lanier, *et al.*, 2005, Mathu *et al.*, 2012).

Jovino *et al.*, (2022) ont signalé que les rendements ainsi que la contribution de BNF a été améliorée par l'inoculation de l'arachide par deux souches de *Bradyrhizobium* allant de 42 à 60 %.

Mandou *et al.* (2017) ont noté une augmentation significative de la teneur en N₂ des parties aériennes de l'arachide après inoculation sur le site de Yaoundé (Cameroun). De même, Valetti *et al.* (2016) ont rapporté que les plants inoculés avec des isolats natifs ont exhibés de meilleurs paramètres symbiotiques, produisant ainsi un rendement de 44% en gousses d'arachides à Pizarro au Brésil par rapport aux plants non inoculés. Ainsi, les souches natives sont plus adaptées à leur environnement alors que

celles apportées par inoculums commerciaux, peuvent avoir des difficultés à exprimer leur capacité de fixation de N₂.

III-2-2-6 Réponse de l'arachide à l'inoculation par les Rhizobia

Le but de l'inoculation est de fournir un nombre suffisant de Rhizobiums viables et efficaces pour induire une colonisation rapide de la rhizosphère, ce qui permet une nodulation rapide après la germination en produisant des rendements optimaux (**Catroux et al., 2001 ; Sharma et al., 2011**). L'analyse de variance du comportement de l'arachide à l'inoculation par les différentes souches de Rhizobia testées est résumée dans le tableau 9.

Tableau 9: Synthèse des moyennes de l'effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance, de rendement et de la fixation d'azote de l'arachide.

Traitements	FBN %	HT	PST	LR	PSR	NN
SP32	2,093 b	17,867 bc	1,242 b	13,917 a	0,758 a	78,000 a
EP72	2,253 a	20,083 ab	1,112 bc	14,833 a	0,657 a	69,500 a
EP1	1,810 c	18,500 bc	1,213 bc	15,667 a	0,587 a	67,833 a
HBA1	2,380 a	17,000 cd	1,215 bc	13,550 a	0,993 a	59,000 a
TN	1,863 c	22,667 a	1,883 a	14,500 a	0,990 a	0,000 b
T	0,117 d	14,667 d	0,623 b	13,433 a	0,437 b	0,000 b
Pr > F	< 0,0001	0,001	0,042	0,212	0,186	0,006
Significatif	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui

HT : Hauteur des tiges, PST : poids sec des tiges, PSR : poids sec des racines, NN : nombre de nodules et LR : longueur racinaire. 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 quatre souches par rapport à la hauteur et au poids sec des tiges (tableau 9). Les souches EP72 et SP32 ont augmenté significativement la hauteur des tiges et leur poids sec respectivement. Par ailleurs, les souches EP72 et HBA1 ont contribué à une bonne fixation d'azote par rapport aux autres souches. L'effet bénéfique de l'inoculation sur ces mêmes paramètres a été signalé chez d'autres fabacées comme le soja (**Gebrehana et Dagnaw, 2020**), le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) (**Khaitov et al., 2020**), les petits pois (*Pisum sativum*)

(Ranjbar Sistani et al., 2020), ou encore chez des fabacées non alimentaires comme *Robinia pseudoacacia* (Sun et al., 2020), luzerne (*Medicago sativa*) (Azib et al., 2020) et chez la légumineuse arborescente *Leucaena leucocephala* (da Silva et al., 2018).

L'influence de la plante hôte sur l'efficacité symbiotique, la nodulation, la fixation de N_2 et le rendement en biomasse a été rapportée dans d'autres études (Hafeez et al., 2000 ; Nkot et al., 2011; Thrall et al. 2011). Selon Mathu et al (2012), la variabilité observée dans les différents paramètres peut être attribuée aux différences des capacités effectives et de l'efficacité des Rhizobia utilisés dans cette étude.

Conclusion

La fixation biologique de l'Azote (FBN) est un processus important dans le cycle de vie des fabacées. L'application d'inoculum de bactéries fixatrices d'azote est favorable au double plan économique et environnemental. Le but de cette étude était de sélectionner des bactéries symbiotiques de l'arachide natives et compétitives.

Il ressort de ce travail que l'absorption de nutriments et le bon développement de l'arachide sont fortement influencés par l'inoculation par les Rhizobia. Ces derniers ont montré un effet significatif sur la nodulation, les différents paramètres de croissance (hauteur de tiges, longueur racinaire, poids sec des parties aériennes et souterraines) ainsi que sur la fixation d'azote atmosphérique. Ceci prouve la dépendance rhizobienne de l'arachide et témoigne de l'infectivité et de l'effectivité des souches de Rhizobia utilisées.

Les résultats ont montré l'efficacité symbiotique des quatre souches, indiquant que la souche native EP72 comme une bactérie potentielle à recommander comme inoculants pour l'arachide.

Bien que l'inoculation ne soit toujours pas une pratique courante pour la production d'arachides dans les systèmes agricoles, cette étude confirme que l'inoculation de l'arachide avec des souches de Rhizobia sélectionnées peut améliorer le rendement.

Chapitre IV :

*l'Effet de la salinité et de l'inoculation de
Bradyrhizobium sp et de Rhizobium sp sur la
croissance et le rendement de l'arachide (Arachis
hypogaea L.)*

Introduction

Dans la région méditerranéenne, la symbiose entre les légumineuses et les rhizobiums joue un rôle crucial dans les agrosystèmes en raison de ses avantages agronomiques, économiques et écologiques (FAO, 2009). En effet, lorsque cette symbiose fonctionne correctement, elle permet d'assurer une nutrition azotée adéquate aux plantes, favorisant ainsi une production satisfaisante. Cela permet aux agriculteurs de réduire les coûts liés aux engrais chimiques et contribue à la préservation de l'environnement en réduisant la pollution (Faghire et al., 2011). Cependant, ce processus naturel est influencé par diverses contraintes abiotiques qui diminuent son efficacité et constituent une menace sérieuse pour le système agricole, telles que la sécheresse, la salinité et les températures extrêmes (Bhatnagar et al., 2008 ; Cesar et al., 2011 ; Pruthvi et al., 2014). La salinité du sol est l'un des facteurs environnementaux les plus destructeurs qui peut entraîner une diminution remarquable de la superficie des terres cultivées et le rendement des cultures (Meguekam et al., 2021). Étant donné que la plupart des espèces cultivées sont sensibles au sel, la salinité est devenue un problème sans cesse croissant, en particulier dans les régions arides, semi-arides et côtières du monde (Meena et al., 2016). La FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), a rapporté que plus de 6 % des terres de la planète sont affectées par la salinité, dont 3,8 % se trouve en Afrique (FAOSTAT, 2011). Ce phénomène est de plus en plus préoccupant car la salinité réduit la disponibilité des terres cultivables et constitue une menace pour la sécurité alimentaire de ces régions. La salinisation des sols est non seulement liée aux conditions climatiques, mais aussi à mauvaise qualité et gestion des des eaux d'irrigation (Benidire et al., 2015).

. À l'heure actuelle, près de 20 % de toutes les terres cultivées et irriguées (équivalent à 62 millions d'hectares) sont affectées négativement par le sel, certaines estimations atteignant 50 % (Khan et al., 2015). Dans les zones arides et semi-arides, la contrainte saline, qu'elle soit du sol ou de l'eau reste l'un des facteurs majeurs limitant la production des légumineuses, particulièrement lorsque la nutrition azotée est assurée par la FSN (Munns et tester, 2008).

Le stress salin peut avoir un impact sur la symbiose légumineuse-rhizobia de deux manières : indirectement, en réduisant la croissance de la plante hôte et en perturbant certains de ses processus physiologiques, et directement, en inhibant le processus

d'infection et le développement des nodules (**Zahran, 1999 ; El-sheikh et al., 1989 ; Cesar et al., 2011**). En effet, le stress salin peut avoir des effets néfastes sur la croissance des rhizobiums, limitant ainsi leur persistance et leur développement dans le sol, la colonisation des racines, l'inhibition des infections, ainsi que la production et le fonctionnement des nodules (**Mustafakulova et Qobilov, 2020**).

La prévention et la réparation des dommages causés par le stress salin sont essentielles pour assurer la survie des cellules. Ces stratégies peuvent impliquer des modifications morphologiques, biochimiques et physiologiques (**Geetanjali et Neera, 2008**). Le développement des symbioses rhizobiennes performantes est l'une des approches les plus envisageables pour réduire les effets délétères de diverses contraintes biotiques et abiotiques dont la salinité. Plusieurs travaux ont signalé la contribution du partenaire rhizobien à parvenir cette contrainte via l'utilisation des souches rhizobiennes sélectionnées (**Mnasri et al., 2007a, Ben Rhomdhane et al., 2007, Tajini et al., 2008**). Dans ce chapitre, nous allons étudier l'effet de la contrainte saline sur l'arachide inoculée avec des souches de rhizobia autochtones.

IV-1 Matériel et méthodes

IV-1-1 Matériel biologique

Quatre souches de Rhizobia associées à l'arachide, provenant de Ouargla (Hassi Ben Abdallah) et de Ghardaia (Sebseb et El-Mansoura), préalablement isolées et caractérisées. Elles ont été sélectionnées parmi une cinquantaine de souches pour leur capacité à tolérer les conditions pédoclimatiques prédominantes dans ces régions. Deux souches sont à croissance rapide, une à croissance moyenne et une dernière à croissance lente. Les codes des quatre micro-symbiontes utilisés sont mentionnés dans le tableau 10.

Tableau 10: Codes des souches, site d'échantillonnage, type de croissance et localisation géographique

Codes expérimentaux	Sites d'échantillonnage	Plante hôte	Types de croissance	Localisations
HBA1	Hassi Benabdellah	<i>Arachis hypogaea</i> L	Rapide	32°00'77'' 5°46'27''
EP1	El-Mansoura	<i>Arachis hypogaea</i> L	Rapide	31°95'79'' 3°64'23''
SP32	Sebseb	<i>Arachis hypogaea</i> L	Moyenne	32°15'70'' 3°58'03''
EP72	El-Mansoura	<i>Arachis hypogaea</i> L	Lente	31°95'50'' 3°64'28''

La préparation des inocula liquides des différentes souches a été réalisée selon la méthode de **Vincent (1970)**, décrite dans le chapitre III (point III-1-1).

IV-1-2 Matériel végétal

Le matériel végétal ayant fait l'objet de cette étude est constitué d'une population locale d'arachides, originaire de Ghardaïa. La désinfection et la mise en germination des graines sont réalisés selon les méthodes **Tillard et Drevon (1988)** et **Somasegaran et Hoben (1985)** (voire chapitre III).

IV-2 Conduite de la culture

Nous avons entrepris, pour la réalisation de cette expérience, la même démarche détaillée dans le chapitre III (point III-1-5).

Durant les trois premières semaines, les pots ont été arrosés tous les deux jours avec 150 ml (capacité au champ) avec une solution nutritive, de Fahraeus, sans azote (**Vincent, 1970**). Pour évaluer l'effet de la salinité sur l'arachide, quatre niveaux de concentrations de NaCl ont été utilisés (0, 40, 80 et 160 mM), le dispositif expérimental est un dispositif bloc randomisé avec trois répétitions.

IV-2-1 Les paramètres étudiés

Après 4 semaines de l'application du traitement salin, les plantes ont été soigneusement déterrées du sable humide pour éviter un déracinement brutal puis rincées à l'eau de robinet. Les paramètres étudiés dans ce travail sont la hauteur de la tige principale, la longueur de la racine principale et le rapport longueur tige et racine $RL = \text{rapport longueur tige (cm)} / \text{longueur racine (cm)}$. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'une règle graduée.. Les parties aériennes, racinaires et les nodules des plantes ont été séparés et les biomasses fraîches et sèches ont été déterminées après séchage dans une étuve à 70°C pendant 72 heures. Le nombre de nodules a été compté à l'œil nu et à l'aide d'une loupe. Les mesures du poids ont été effectuées à l'aide d'une balance électronique.

IV-3 Analyse des données

Les analyses statistiques des résultats expérimentaux obtenus ont été effectuées à l'aide du test ANOVA en utilisant le progiciel d'analyse statistique XLSTAT version 2014.

IV-4 Résultats et Discussion

IV 4-1 Caractéristiques physico-chimiques du substrat de culture

Les résultats et la discussion du pH et de la CE du substrat de culture sont détaillés dans le chapitre III.

IV 4-2 Effet de l'irrigation avec de l'eau salée sur le développement de l'arachide

La salinité est une contrainte majeure qui affecte la croissance et le développement des plantes (Wang *et al.*, 2012, Dodd et Perez-Alfocea, 2012). La production d'arachides s'est avérée être entravée à plusieurs reprises par divers stress abiotiques, telle que la forte teneur en sel, qui entraînent de graves pertes de rendement (Sharma *et al.*, 2016).

Les conditions salines ont affecté négativement et d'une manière significative tous les paramètres de croissance et de développement des plantes (photo 9).

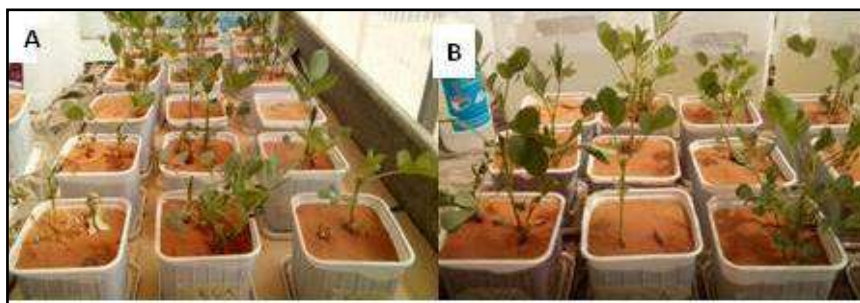


Photo 9 : Effet du stress salin sur l'arachide A : plantes témoins sans inoculation, B : plantes inoculées

La figure (20 A) indique que le nombre de nodules a diminué de manière significative ($P < 0.0001$) avec l'augmentation de la salinité. Cette dernière a influencé le processus de nodulation dont le nombre de nodules a baissé de plus de 81% à la concentration C2 (40mM). Le nombre de nodules des plantes a diminué respectivement de 88 et 93% avec l'augmentation de la concentration en NaCl de 80 et 160 mM sans que cela ne se traduise par des différences significatives pour les plantes (figure 20 A).

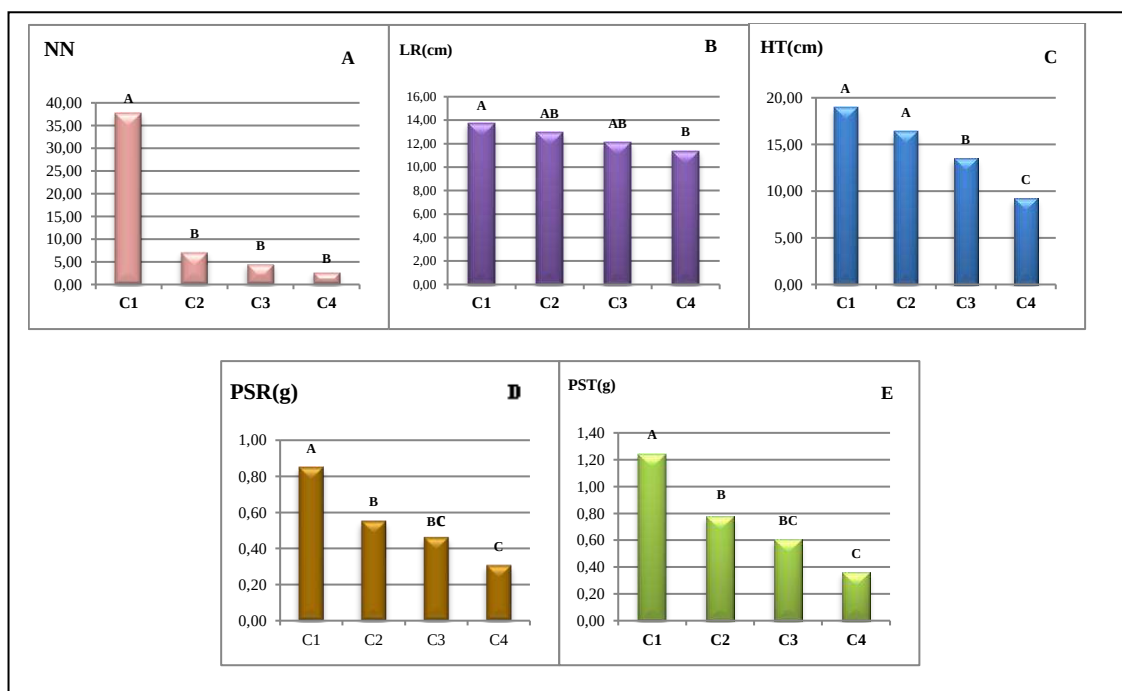


Figure 20 : Effets du stress salin sur le nombre de nodules (A), la longueur de la racine (B), la hauteur de la plante (C), le poids des tiges (D) et poids des racines (E). NN : nombre de nodules, HT : hauteur de la tige, LR : longueur de la racine, PST : poids sec des tiges, PSR : poids sec des racines

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Tegger (2015)** et **Saadallah et al. (2001)** qui ont observé respectivement une diminution du nombre de nodules chez la lentille (*Lens culinaris* L.) et chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) proportionnelle à l'intensité du stress salin appliqué. Des résultats similaires sont également obtenus pour l'arachide (**Dangue et al., 2021**). Selon **Saadallah et al. (2001)**, la réduction du nombre de nodules est liée à une diminution des sites potentiels d'infection, résultant principalement d'une inhibition de l'émergence et de l'allongement des poils absorbants et de la croissance du système racinaire en général.

La hauteur des tiges (figure 20 C) a diminué de manière significative ($P < 0,0001$) avec l'augmentation de la salinité. Des réductions de 13, 28 et 51% ont été observées avec les concentrations C2, C3 et C4 respectivement par rapport à la concentration C1. Ces résultats sont également en accord avec ceux de **El-akhal et al. (2013)**, **Coba Peña et al. (2012)**, **Hirich et al. (2014)** et **Aydinşakir et al. (2015)**, qui ont signalé une baisse significative de la longueur des tiges des plants d'arachide à des niveaux de salinité élevés.

A partir des résultats obtenus (figure 20 B), on note une fluctuation des valeurs de la longueur des racines en présence du NaCl. Aux concentrations d'irrigation C2, C3 et C4 la croissance par rapport aux plantes témoins non stressées (C1) a été moyennement affectée respectivement de plus de 5, 12 et de 17%. Ainsi, la salinité a réduit davantage la croissance des parties aériennes comparativement à celle des racines. Des résultats similaires ont été rapportés par **Dubey et Singh (1999)** et **Zouaoui et al. (2012)**.

L'augmentation de la concentration d'eau d'irrigation en NaCl a affecté considérablement le rendement en diminuant le poids sec des parties aériennes et souterraines (figure 20 D et E). Cet effet négatif a été de plus de 37 et 51% sur les tiges et de 35 et 45% sur les racines, aux concentrations C2 et C3 respectivement. L'augmentation de la concentration d'eau d'irrigation en NaCl jusqu'à 160mM a retardé considérablement le développement en diminuant le poids des tiges et racines de plus de 70,98 et 63,88% respectivement. Ceci corrobore avec les résultats de plusieurs auteurs (**Long et al., 2010 ; Vibhuti et al., 2015 ; Petrović et al., 2016**). La réduction des poids secs due à l'augmentation de la salinité, peut être le résultat d'une combinaison d'effets osmotiques et d'ions spécifiques, en raison de l'absorption d'ions sodium, ce qui entraîne également une carence en nutriments (**Shrivastava & Kumar, 2015 ; Khan et al., 2015**). L'un des premiers effets de la salinité sur les plantes est la réduction du taux de croissance (**Munns et al., 2008**).

Des effets néfastes ont été rapportés lors d'une exposition à la salinité pour l'arachide (**Correia et al., 2009**) et d'autres légumineuses. La réponse au stress salin dépendrait de la variété d'arachide étudiée (**El-akhal et al., 2012**). Plusieurs travaux ont signalé que le stress salin a des effets négatifs sur presque tous les aspects de la croissance et du développement de l'arachide, y compris la germination des graines, la photosynthèse, la formation des gousses, la biomasse totale et enfin, sur le rendement (**Salwa et al., 2010 ; Qin et al., 2011 ; El-Akhal et al., 2013**).

IV 4-3 Effet de l'inoculation avec des souches de rhizobium sélectionnées et du stress salin sur la croissance de l'arachide

Pour déterminer l'effet de l'inoculation de rhizobium par rapport à la croissance et le rendement de l'arachide dans des conditions de stress salin, les plantes ont été inoculées avec quatre souches de rhizobium, HBA1, EP1, EP72 et SP32 précédemment identifiés. Les résultats sont consignés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance et de rendement de l'arachide sous stress salin

Concentrations	Traitements	HT	LR	PST	PSR	NN
C1 (0mM)	EP1	18,57 a	14,667 a	1,363a	1,043 a	77,333 a
	EP72	21,8 ab	14,833 a	1,250 a	0,997 a	66,333 a
	HBA1	17,33 c	15,233 a	1,540 a	0,783 ab	57,333 a
	SP32	18,67 abc	15,000 a	1,197 a	0,850 ab	61,333 a
	TN	22,67 a	14,500 a	1,493 a	0,990 a	0,000
	T	14,67 c	13,433 a	0,623 a	0,437 b	0,000
	Pr > F Significatif	0,000 Oui	0,890 Non	0,410 Non	0,020 Oui	< 0,0001 Oui
C2 (40mM)	EP72	18,667 a	13,900	0,850 a	0,807a	13,333 a
	EP1	16,667 a	14,000	0,930 a	0,703 ab	9,667 ab
	TN	17,000 a	13,500	0,887 a	0,630 abc	0,000 c
	SP32	16,833 a	12,833	0,780a	0,463 bc	13,667 a
	HBA1	16,300 a	12,400	0,733 a	0,363 c	5,667 b
	T	12,633 b	12,000	0,473 a	0,343 c	0,000 c
	Pr > F Significatif	0,000 Oui	0,292 Non	0,082 Non	0,001 Oui	< 0,0001 Oui
C3 (80mM)	EP1	16,667 a	12,333 a	0,770 a	0,507 ab	7,333 ab
	EP72	16,767 ab	12,167 a	0,713 ab	0,567 ab	9,667 a
	HBA1	14,367 ab	13,667 a	0,720 ab	0,650 a	4,000 c
	TN	13,000 b	12,333 a	0,587 ab	0,387 bc	0,000 d
	SP32	11,000 bc	11,667 a	0,530 ab	0,373 bc	5,333 bc
	T	9,167 c	9,667 a	0,300 b	0,280c	0,000 d
	Pr > F Significatif	< 0,0001 Oui	0,129 Non	0,031 Oui	0,001 Oui	< 0,0001 Oui
D4 (160mM)	EP72	15,233 a	12,333	0,453 ab	0,457 a	5,000 a
	EP1	12,000 b	13,833	0,383 ab	0,347 ab	4,333 a
	HBA1	7,500 c	11,333	0,560 a	0,380 ab	2,667 ab
	SP32	7,500 c	10,833	0,337 b	0,303 ab	3,333 a
	TN	8,833c	9,333	0,317 b	0,217 ab	0,000 c
	T	4,167 d	6,333	0,113 c	0,137 b	0,000 c
	Pr > F Significatif	< 0,0001 Oui	< 0,0001 Oui	0,000 Oui	0,016 Oui	0,000 Oui

HT : Hauteur des tiges, PST : poids sec des tiges, PSR : poids sec des racines, NN : nombre de nodules et LR : longueur racinaire. Pour chaque paramètre, les moyennes dans la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, selon le test de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher à P = 0,05.

L'efficacité des souches rhizobiennes comme PGPR dans la promotion de la croissance des plants d'arachide sous contrainte saline a été évaluée. Les résultats ont indiqué que toutes les souches ont augmenté de manière significative la croissance de l'arachide par rapport au témoin négatif.

IV 4-3-1 Effet de l'inoculation sur le poids sec

Le poids sec des parties aériennes a été mesuré comme indicateur du rendement des plants d'arachides inoculés aux rhizobiums, fertilisés à l'azote et les témoins (tableau 11). Le poids sec des pousses d'arachide peut être considéré comme un indicateur de rendement valide, car des corrélations positives avec le poids sec des gousses et également la fixation de N ont été signalées dans des conditions de déficit hydrique (**Pimratch et al., 2009**).

Les plantes non inoculées ont été très affectées par la salinité et leur poids sec des pousses a baissé lors de l'exposition au stress salin.

Aucune différence significative dans le poids sec des pousses n'a été observée après inoculation et fertilisation azotée à 40mM de NaCl. A 80mM la souche EP1 a été la plus efficiente, suivie des souches EP72, HBA1 et SP32 respectivement. A 160mM, la souche HBA1 a donné le meilleur poids sec des parties aériennes, suivie de EP72 et EP1. Cependant, aucune différence significative entre les souches SP32 et TN n'a été obtenue.

Le poids sec des parties aériennes des plantes fertilisées n'a pas été significativement différent des plantes inoculées dans la concentration C2. Cependant, les plantes inoculées avec EP1 et EP72 ainsi que HBA1 ont présenté un poids sec significativement plus élevé que les plantes fertilisées avec N, à la fois à des concentrations modérées et élevées de sel (C3 et C4 respectivement). Ces résultats concordent avec ceux de **EL-akhal et al. (2013)**. En effet, ces auteurs suggèrent que la fixation biologique de l'azote pourrait remplacer efficacement la fertilisation chimique dans des conditions de salinité pour la culture de l'arachide.

IV 4-3-2 Effet de l'inoculation sur la hauteur des tiges et la longueur racinaire

Les plantes inoculées ont connu une variation minimale de la longueur des racines lorsqu'elles ont été irriguées avec de l'eau salée à 40 et 80mM. En effet, aucune différence majeure n'a été constatée entre les plantes inoculées et les témoins. A 160mM, une différence très hautement significative ($< 0,0001$) a été enregistrée entre les différentes combinaisons ; la longueur la plus élevée a été notée pour les plantes inoculées par la souche EP1.

Les plantes fertilisées ont produit significativement plus de hauteur des pousses que les plantes inoculées dans des conditions non stressées (tableau 11). Lorsqu'elles ont

été irriguées avec de l'eau modérément salée, nous avons relevé une différence hautement significative ($< 0,000$) de la hauteur des pousses entre les plantes inoculées et fertilisées, par rapport aux témoins. Aux concentrations C3 et C4, une différence très hautement significative ($< 0,0001$) a été relevée entre les différentes combinaisons. Les meilleurs résultats ont été enregistrés pour la souche EP1, suivie d'EP72. Une corrélation positive et significative entre l'inoculation et les paramètres de croissance des plantes a été obtenue.

IV 4-3-3 Effet de l'inoculation sur la nodulation

La nodulation des plantes a montré des différences significatives en réponses à l'inoculation avec les quatre souches rhizobiennes, sous les trois niveaux de salinité (tableau 11).

A la concentration C1, la souche HBA1 a contribué à la formation du plus grand nombre de nodules, suivie par EP1, HBA1 et EP72. A la concentration C2, les souches HBA1 et EP1 ont été affectées par la salinité, alors que les souches SP32 et EP72 ont gardé leur pouvoir nodulant. Aux concentrations C3 et C4, la nodulation a été affectée par l'augmentation de la salinité. Ainsi, à la concentration 80mM, la souche EP72 a formé le plus grand nombre de nodules par rapport aux autres souches. Cependant, à 160mM aucune différence significative entre les souches EP1, SP32 et EP72 n'a été relevée ; bien que cette dernière ait formé le un nombre de nodules supérieur aux autres. Par ailleurs, les témoins négatif (T) et témoins azotés (TN) n'ont pas formé de nodules. **Shahid et al., (2021)** ont montré un effet dépressif de la salinité sur le nombre de nodules chez *Vigna radiata* inoculée avec des bactéries halotolérantes, ainsi que pour l'arachide (**EL-akhal et al., 2013**).

IV - 4-3-4 Réponse de l'arachide à l'inoculation par les rhizobia sous stress salin

La symbiose rhizobienne augmente la tolérance au stress salin chez les légumineuses cultivées dans des conditions salines (**Bertrand, et al., 2015, Qin et al., 2011**). Son succès nécessite la sélection de rhizobiums indigènes tolérants, isolés des sols salins (**Zahran, 1991**).

Le tableau 12 indique les résultats relatifs à l'effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance ainsi que le rendement de l'arachide.

Tableau 12 : Synthèse des moyennes de l'effet de l'inoculation sous contrainte saline sur les paramètres de croissance, de rendement de l'arachide.

	HT	LR	PST	PSR	NN
EP1	15,975 ab	13,708 a	0,862 a	0,650 a	21,417 a
EP72	18,117 a	13,308 a	0,817 a	0,707 a	16,833 a
HBA1	13,875b	13,158 a	0,888 a	0,544 a	14,917 a
SP32	13,500 b	12,583a	0,711a	0,498 a	24,500 a
Pr > F	0,015	0,546	0,703 a	0,173a	0,763 a
Significatif	Oui	Non	Non	Non	Non

HT : Hauteur des tiges, PST : poids sec des tiges, PSR : poids sec des racines, NN : nombre de nodules et LR : longueur racinaire Pour chaque paramètre, les moyennes dans la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, d'après le test de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher à $P = 0,05$.

Les résultats montrent que l'inoculation contribue significativement à l'amélioration des paramètres étudiés. Aucune différence significative entre les souches n'a été enregistrée pour le poids sec des parties aériennes et racines, le nombre de nodules et longueur racinaire par rapport à toutes les concentrations utilisées. Cependant, l'analyse statistique a révélé une différence significative entre la souche EP72 et autres souches (EP1, HBA1 et SP32) par rapport à la hauteur des tiges.

La croissance, la survie et la distribution des rhizobiums dans le sol sont affectées par les stress environnementaux, y compris la salinité (**Tate, 1995**). Cette dernière est l'un des stress environnementaux les plus importants, limitant la croissance des rhizobiums, qui fixent le N_2 atmosphérique et fournissent les plantes hôtes en azote (**Moussaid et al., 2015 ; Qin et al., 2011**). Elle diminue également l'absorption nutritionnelle des plantes, en particulier P, en raison de leur liaison avec les ions Ca dans les sols stressés par le sel. Une concentration plus élevée d'ions (Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-}) dans les sols salins s'accumule dans les cellules végétales et inactive les enzymes qui inhibe la synthèse des protéines et la photosynthèse (**Serraj et al., 1994 ; Zhu 2001**). La salinité affecte le processus d'infection bactérienne, la croissance et le fonctionnement des nodules, en limitant l'apport de nutriments via les produits de la photosynthèse et la consommation d'oxygène. Il en est de même pour la fixation biologique d'azote, en réduisant le métabolisme des nodules, la teneur en légghémoglobine et la diffusion d'azote atmosphérique (**Gopalakrishnan et al., 2015 Allito, 2015**). La population autochtone peut facilement s'adapter aux conditions environnementales locales, de sorte qu'elle est comparativement plus efficace et compétitive (**Mrabet et al., 2005, Sun et al., 2020**).

Les souches rhizobiennes utilisent différents mécanismes pour faire face aux stress de salinité. L'inoculation de plantes cultivées avec des rhizobiums tolérants au sel a la capacité d'améliorer la productivité des cultures en cas de stress salin (**Ahmad et al., 2013a, Naceer et al., 2019, Fan et al., 2020**).

Zouaoui et al. (2018) ont signalé une augmentation de l'accumulation de la proline et des sucres solubles totaux en présence de *Bradyrhizobium* sp comparé à leur faible accumulation dans les plants de *Phaseolus vulgaris* soumis au stress salin en absence d'inoculation bactérienne.

Conclusion

Il a été rapporté que la colonisation réussie de la rhizosphère de rhizobia est affectée par une variété de facteurs de stress, tels que la sécheresse, la température, la salinité et le type de sol (**Compant et al., 2010**).

L'étude de l'effet de la salinité sur la croissance de l'arachide nous a permis d'évaluer l'effet dépressif que joue la salinité sur les plantes. Dans notre étude, le potentiel des souches rhizobiennes a été légèrement inhibé par le stress salin par rapport aux conditions témoins. Cependant, nous avons constaté que l'inoculation par rhizobia nous a permis d'observer l'effet bénéfique de ces rhizobactéries sur la résistance et croissance des plantes au stress salin par rapport au témoin non inoculé.

Chapitre V:

*Effet de la sécheresse et de l'inoculation par
Bradyrhizobium sp et de Rhizobium sp sur
la croissance et le rendement de l'arachide
(Arachis hypogaea L.).*

Introduction

Les Fabacées sont d'importantes sources d'huile, de fibres, de micronutriments, de minéraux, et de protéines végétales adaptées à l'alimentation animale et à la consommation humaine (MacCracken, 2008 ; Furlan et al., 2017). En outre, ils peuvent fixer l'azote en raison de leur capacité à former des associations symbiotiques avec les rhizobiums. La fixation biologique de l'azote (BNF) contribue à maintenir la fertilité des sols à un niveau optimal. Cependant, ils sont fréquemment exposés à des conditions de stress.

Parmi divers facteurs de stress environnementaux, la sécheresse est considérée comme l'une des principales causes de la diminution de la croissance et du rendement des grandes cultures et y compris les légumineuses dans le monde (Naresh et al., 2013). Chez les Fabacées, la sécheresse réduit également la fixation de l'azote et ses caractéristiques associées. Ce phénomène a été observé chez l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) (Sinclair et al., 1995), le soja (*Glycine max* Merr.) (Serraj et al., 1997), le niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp.) (Hall, 2012), le haricot mungo (*Vigna radiata* L.) (Ranawake et al., 2011), le sulla (*Sulla coronarium* L.) (Sana et al., 2012), la luzerne (*Medicago sativa* L.) (Azib et al., 2019) et le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) (Sassi Aydi et al., 2008). Le stress hydrique est le facteur le plus dévastateur, détruisant à la fois la croissance rhizobienne et la symbiose Rhizobium-légumineuse.

L'étude du potentiel de ces bactéries à réduire les stress abiotiques, comme le déficit hydrique est encore plus prometteur lorsque les bactéries indigènes des régions arides ou semi-arides sont évaluées, présentant une tolérance plus élevée au déficit hydrique (Zahran, 1999 ; Kavamura et al., 2013 ; Fernandes-Júnior et al., 2015) et peuvent conférer une certaine tolérance au stress hydrique dans les cultures (Kavamura et al., 2013). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'inoculation par des Rhizobia peut augmenter la tolérance de l'arachide au déficit hydrique. Le but de cette étude était d'évaluer l'effet de l'inoculation par quatre souches de rhizobiums sur la nodulation et les caractéristiques biométriques de l'arachide soumise à un stress hydrique.

V-1 Matériel et méthodes

V-1-1 Matériel biologiques

Quatre souches de Rhizobia associées à l'arachide provenant de Ouargla (Hassi Ben Abdallah) et de Ghardaïa (Sebseb et El-Mansoura), préalablement isolées et caractérisées. Elles ont été sélectionnées parmi une cinquantaine de souches pour leur capacité à tolérer les conditions pédoclimatiques prédominantes dans ces régions. Deux souches sont à croissance rapide, une à croissance moyenne et une dernière à croissance lente. Les codes des quatre micro-symbiontes utilisés sont mentionnés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Codes des souches, site d'échantillonnage, type de croissance et localisation géographique.

Codes expérimentaux	Sites d'échantillonnage	Plante hôte	Types de croissance	Localisations
HBA1	Hassi Benabdellah	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Rapide	32°00'77'' 5°46'27''
EP1	El-Mansoura	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Rapide	31°95'79'' 3°64'23''
SP32	Sebseb	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Moyenne	32°15'70'' 3°58'03''
EP72	El-Mansoura	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Lente	31°95'50'' 3°64'28''

La préparation des inocula liquides des différentes souches a été réalisée selon la méthode de **Vincent (1970)**, décrite dans le chapitre III (point III-1-1).

V-1-2 Matériel végétal

Le matériel végétal ayant fait l'objet de cette étude est constitué d'une population locale d'arachides, originaire de Ghardaïa. La désinfection et la mise en germination des graines sont réalisés selon les méthodes **Somasegaran et Hoben (1985)** (voire chapitre III).

V-1-3 Dispositif expérimental et mise en place de l'essai

Nous avons entrepris, pour la réalisation de cette expérience, la même démarche détaillée dans le chapitre III (point III-1-5).

Durant les trois premières semaines, les pots ont été arrosés tous les deux jours avec 150 ml (capacité au champ) de la solution nutritive de Fahraeus dépourvue d'azote (**Vincent, 1970**). Pour évaluer l'effet du stress hydrique sur l'arachide, 3 doses de la solution nutritive ont été appliquées, D1 : 100% avec 150 ml, D2 : 75% avec 112 ml et D3 : 50% avec 75 ml, ont été utilisés.

Le dispositif expérimental est de type bloc randomisé à 3 répétitions, chaque répétition comprend deux facteurs :

Facteur I : dose d'irrigation ;

Facteur II : représente les quatre souches rhizobiennes, dont deux à croissance rapide (HBA1, EP1), une à croissance moyenne (SP32) et une autre à croissance lente (EP72).

Le stade de développement de la culture choisi pour l'application du stress est le stade de la croissance végétative. Des plantes non inoculées ont été utilisées comme témoins (T), ainsi qu'un témoin azoté (TN) pour lequel 1g/l de KNO_3 a été apporté.

V-1-4 Paramètres étudiés

Après 4 semaines de l'application du traitement hydrique, les plantes ont été soigneusement déterrées du sable humide pour éviter un déracinement brutal, puis rincées à l'eau de robinet. Les paramètres étudiés dans ce travail sont la hauteur de la tige principale et la longueur de la racine principale. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'une règle graduée. Ainsi, la biomasse sèche des plantes et le nombre de nodules ont été évalués. Les parties aériennes, racinaires et les nodules des plantes ont été séparés et les biomasses fraîches ont été déterminées ensuite les biomasses sèches après séchage dans une étuve à 70°C pendant 72 heures. Le nombre de nodules a été compté à l'œil nu et à l'aide d'une loupe. Les mesures du poids ont été effectuées à l'aide d'une balance électronique.

V-2 Analyses statistiques

Nos résultats ont fait l'objet d'une analyse de la variance (ANOVA) à l'aide du logiciel XLSTAT, Version 2014. 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%. L'analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95%.

V-3 Résultats et discussion

V-3-1 Caractéristique physico-chimique du substrat de culture

Les résultats et la discussion du pH et de la CE du substrat de culture sont détaillés dans le chapitre III.

V-3-2 Effet de la dose d'irrigation sur le développement de l'arachide

La sécheresse est l'un des facteurs environnementaux qui affecte le plus la culture de l'arachide dans les régions semi-arides, entraînant des pertes économiques pour les producteurs (Barbarosa et al., 2018).

Les conditions de sécheresse ont affecté négativement et d'une manière significative tous les paramètres de croissance et de développement des plantes (figure 21).

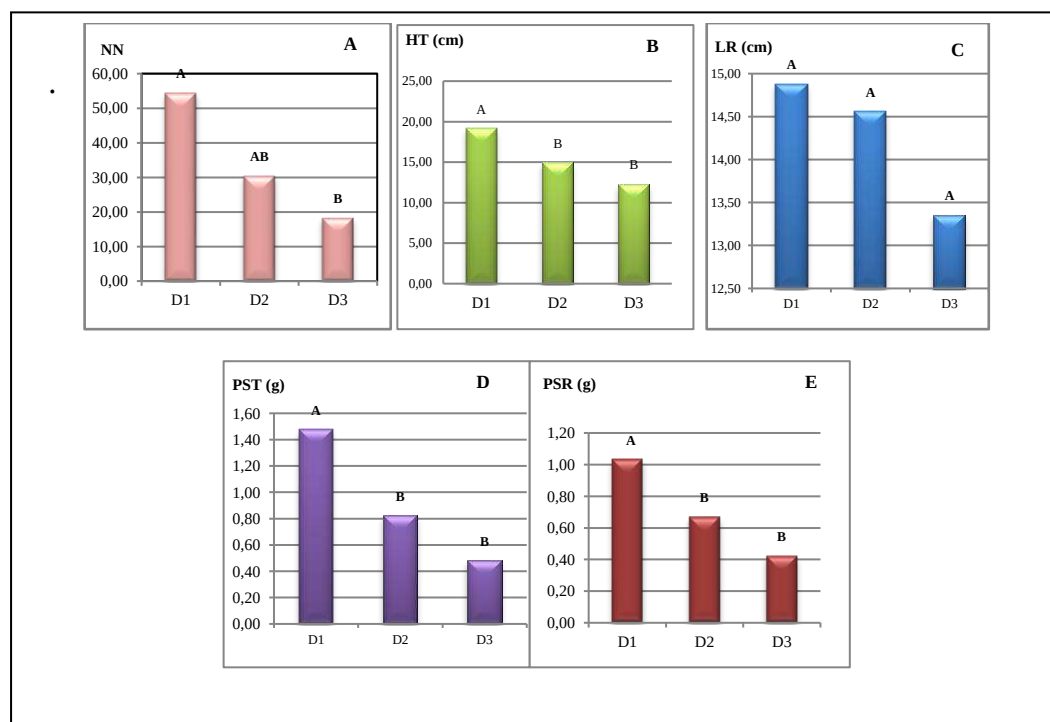


Figure 21: Effets du stress hydrique sur le nombre de nodules (A), la hauteur de la tige (B), la longueur de la racine (C), le poids sec des tiges (D) et le poids sec des racines (E). NN : nombre de nodules, HT : hauteur de la tige, LR : longueur de la racine, PST : poids sec des tiges, PSR : poids sec des racines

Tous les paramètres mesurés ont été significativement affectés par le stress hydrique aux doses D2 et D3 (Figure 21) par rapport à la dose témoin D1, sauf la

longueur moyenne de la racine pivotante qui n'a pas été significativement affectée sous les doses D2 et D3 (figure 21 C).

Les plants d'arachide exposés au stress de la sécheresse ont subi une baisse significative moyenne de la hauteur des tiges (figure 21 B) de 22,6% et de 35,75% aux doses D2 et D3 respectivement, comparativement à la dose témoin D1. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été signalée entre les doses de stress hydrique D2 et D3.

Le poids sec des pousses a été significativement réduit de 44, 31 % à la dose D2 et de 67, 34% à la dose D3 par rapport à la dose témoin D1 (figure 21 D). De même, le poids sec des racines a été significativement affecté par le stress hydrique, avec 33,39% à la dose D2 et 59% à la dose D3 (figure 22 E). Malgré la baisse du rendement des matières sèches (aérienne et racinaire), aucune différence significative n'a été enregistrée entre les doses D2 et D3.

Le processus de nodulation a diminué d'une manière très significative ($> 0,007$), d'environ 43,89 % et de 66% aux doses D2 et D3 respectivement (figure 21 A). Ce résultat est en accord avec ceux de **Furlan et al. (2017)** et **Barbarosa et al. (2018)**. **De Jesus Moraes et al. (2016)** ont indiqué que les réserves glucidiques des pousses/racines sont mobilisées vers moins de nodules, entraînant le maintien d'un poids sec total des nodules constant chez le niébé. Il a été démontré que, lors d'une exposition au stress hydrique, une activité nitrogénase et une teneur en légghémoglobine sont plus faibles (**Furlan et al., 2014**).

Une faible croissance est couramment observée chez les plantes exposées au stress hydrique. Des résultats similaires ont été rapportés pour les plants de soja et de haricot commun exposés au stress hydrique (**Silvente et al., 2012 ; Coletto et al., 2014**). **Liu et al. (2003)** ont également révélé que le rendement du soja a été fortement affecté par le stress hydrique, en particulier lorsque la sécheresse coïncide avec la floraison et au début de la formation des gousses.

Le déficit hydrique peut provoquer de graves altérations physiologiques, biochimiques et moléculaires des plantes, entraînant des pertes significatives sur la croissance et le rendement des cultures (**Farooq et al., 2009**). Ces effets sont observés même chez les cultures présentant une certaine tolérance au stress hydrique, comme l'arachide (**Barbosa et al., 2018**). Ceci est dû à l'altération du processus de fixation de

l'azote dans les tissus déshydratés des légumineuses nodulées (Furlan *et al.*, 2017). La limitation en oxygène, le manque du carbone et la rétroaction azotée ainsi que le rôle du stress oxydatif ont été considérés comme des signaux impliqués dans la fixation de l'azote selon la légumineuse étudiée (González *et al.*, 2015). Plus récemment, le métabolisme du soufre et le métabolisme redox ont été suggérés comme mécanismes responsables de la baisse de la fixation de N sous stress hydrique (Furlan *et al.* 2017).

IV -3-3 Effet de l'inoculation et du stress hydrique sur la croissance de l'arachide.

Afin de déterminer l'effet de l'inoculation par rapport à la croissance et le rendement de l'arachide dans des conditions de stress hydrique, les plantes ont été inoculées avec quatre souches de rhizobium : HBA1, EP1, EP72 et SP32 précédemment identifiés. Les résultats sont représentés dans le tableau 14.

Tableau 14: Effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance et de rendement de l'arachide sous stress hydrique.

Doses d'irrigation	Combinaisons	HT	PST	LR	PSR	NN
D1	EP72	21,667 a	1,547 a	15,500 b	1,660 a	119,333 a
	EP1	17,500 bc	1,673 a	15,167 bc	1,163 b	73,667 b
	N	21,600 a	1,747 a	14,500 bc	1,067bc	0,000 c
	HBA1	21,167 a	1,873 a	14,167 bc	0,863 bc	64,000 b
	SP32	18,250 ab	1,585 a	19,250 a	0,640 c	77,500 b
	T	14,300 c	0,467 a	12,167 c	0,667 c	0,000 c
	Pr > F	0,003	0,037	0,020	0,008	< 0.0001
	Significatif	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
D2	EP72	19,167 a	1,163 a	19,000 a	1,067 a	54,667 ab
	SP32	14,750 b	0,955 ab	16,950 ab	0,485 c	44,000 b
	EP1	13,833 b	0,800 b	14,833 bc	0,763 b	62,333 a
	N	18,000 a	0,873 ab	12,000 c	0,723 b	0,000 d
	HBA1	11,250 c	0,840 ab	13,750 bc	0,480 c	25,000 c
	T	11,333 c	0,350 c	11,367 c	0,367 d	0,000 d
	Pr > F	0,000	0,004	0,006	< 0.0001	< 0.0001
	Significatif	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
	EP72	16,667 a	0,537 bc	18,000 a	0,823 a	36,333 a
	HBA1	12,750 abc	0,795 a	17,500 ab	0,320 b	9,000 b

D3	EP1	11,167 bc	0,443 c	12,000 cd	0,353 b	31,667 a
	SP32	11,000 bc	0,667 ab	14,500 bc	0,307 b	30,333 a
	N	13,500 ab	0,350 c	10,167 d	0,427 b	0,000 b
	T	8,833 c	0,207 d	9,333 c	0,267 b	0,000 b
	Pr > F	0,034	0,001	0,000	0,004	< 0.0001
	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 dose D2 avec un apport de 112 ml de solution nutritive (75 %), une différence hautement significative ($<0,000$) a été observée entre les différentes combinaisons. L'inoculation rhizobiale avec la souche EP72 a favorisé la croissance en hauteur d'une façon similaire à celle occasionnée par la fertilisation azotée. Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre les souches SP32 et EP1. Une différence très significative ($<0,006$) de la longueur racinaire a été obtenue entre les différentes combinaisons. La valeur la plus élevée a été enregistrée pour les plantes inoculées avec la souche EP72 par rapport à toutes les autres combinaisons.

La production de la biomasse sèche aérienne et souterraine, a connu une baisse par rapport à la dose témoin D1. Cependant, l'inoculation a amélioré ces deux paramètres d'une façon très significative ($<0,004$) pour le poids sec des racines et hautement significative (< 0.0001) pour celui des parties aériennes. Les meilleurs rendements ont été attribués respectivement aux plantes inoculées avec la souche EP72 (133%), suivis de SP32 (109%), HBA1 (96%) et EP1 (91%) par rapport au témoin azoté. La sécheresse a affecté négativement la nodulation. L'ANOVA a révélé une différence significative entre les souches et le nombre de nodules le plus important a été enregistré pour la souche EP1, suivi de EP72, SP32 et HBA1 respectivement.

En augmentant le stress hydrique à 50% avec une dose d'irrigation D3 de 75 ml de solution nutritive, la nodulation a été significativement impactée, affectant aussi bien la croissance et le rendement de l'arachide (Tableau 14). En effet, la souche EP72 a montré la plus faible réduction (69%) et la souche HBA1 a enregistré la plus forte réduction qui a atteint 85% de son témoin correspondant.

Le stress hydrique a négativement affecté la longueur de l'appareil végétatif des plantes chez la plupart des combinaisons symbiotiques testées. Cependant, une variabilité évidente entre les combinaisons symbiotiques dans leurs réponses à la sécheresse a été

mise en évidence dans ce travail. Les plantes inoculées avec la souche EP72 ont été plus tolérantes que celles inoculées avec les souches EP1, HBA1 et SP32. Ces dernières ont subi un rabougrissement de leur port avec des longueurs respectives de 12,750 ; 12,167 et 11 cm. De même, la longueur racinaire a été significativement (0,000) affectée par la sécheresse. La longueur la plus élevée, pour les différentes combinaisons symbiotiques, a été notée pour les plantes inoculées avec la souche EP72 (18 cm) et la plus faible est celle des plantes inoculées avec la souche EP1 (12 cm).

Chez toutes les combinaisons testées, le régime hydrique a réduit de façon significative le rendement avec quelques variations entre les combinaisons symbiotiques testées. Chez les plantes témoins et sous les conditions de la fixation symbiotique de l'azote, les plantes inoculées avec les souches HBA1 ont montré un poids sec des parties aériennes significativement supérieur à ceux des autres plantes inoculées. Les plantes inoculées avec les souches HBA1, SP32, et EP72 ont montré une différence significativement élevée du rendement par rapport aux plantes témoins sous traitement azoté.

Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs travaux (**Lazali et al., 2013, Vilma et al., 2018 ; Brito et al., 2019, Hamidou et al., 2018, Islam et al., 2021**). La fixation de l'azote chez les espèces cultivées est sensible aux contraintes environnementales, en particulier la sécheresse (**Arrese et al., 2009**). Les effets de la contrainte hydrique se répercutent négativement sur la croissance végétative ainsi que sur l'assimilation et la fixation de l'azote et enfin sur le rendement (**Lazali et al., 2013**). Dans la présente étude, le nombre de nodules racinaires a été considérablement réduit lorsque la sécheresse chevauche l'arachide de 50% (tableau 16). Plusieurs facteurs limitent la fixation de N₂, le stress hydrique peut diminuer le nombre et la forme des poils absorbants, et lorsque les nodules se forment, la sécheresse modifie leurs structure (**Hungria & Vargas, 2000 ; Ramos et al., 2003**). Cependant, la présence de nodules actifs indique que nos plantes, sont tolérantes à de légers déficits hydriques. Les nodules des plantes inoculées ont donné le plus grand poids sec des pousses. Des résultats similaires ont été signalés chez l'arachide par **Dardanelli et al. (2009) et Vilma et al. (2016)**.

Le stress osmotique peut même affecter la croissance des rhizobiums du sol en limitant la colonisation des racines, l'inhibition de l'infection, le développement et le fonctionnement des nodules (**Sharma et al., 2020**). Afin d'éviter les conditions difficiles de stress hydrique, les rhizobia utilisent divers mécanismes physiologiques tels que

l'accumulation d'osmolytes (proline, la glycine bêtaïne, le tréhalose, les polyamines), ainsi que la production d'antioxydants (Gururani *et al.* 2013 ; Wang *et al.* 2016), des phytohormones (Fahad *et al.* 2014), des composés volatils (Vurukonda *et al.* 2016) et d'exopolysaccharides (Mohammadipanah *et al.*, 2019 ; Upadhyay *et al.*, 2011 ; Dardanelli *et al.*, 2009 ; Pandey *et Mann*, 2000). D'autres études ont rapporté que la tolérance bactérienne à la sécheresse est si étroitement liée à la production d'exopolysaccharides et que leur production est déclenchée par l'augmentation du potentiel hydrique. En effet, les exopolysaccharides rendent l'eau disponible et protègent le milieu bactérien de la dessiccation (Vurukonda *et al.*, 2016 ; Wei *et al.*, 2004, Upadhyay *et al.*, 2011 ; Kavamura *et al.* 2013).

Ces bactéries bénéfiques en symbiose avec les Fabacées, confèrent une tolérance à la sécheresse en modifiant la morphologie des racines (Vurukonda *et al.*, 2016). La modification des caractéristiques racinaires associée à la préservation de la productivité de la plante dans des conditions de sécheresse, comprend la prolifération dans le rapport des racines avec de petits diamètres et une longueur de racine plus profonde. Un plus grand nombre de racines plus fines permet aux plantes d'excéder la conductance hydraulique en améliorant la surface en contact avec l'eau du sol, en augmentant parallèlement l'étendue du sol qui peut être utilisée pour l'absorption d'eau (Ngumbi *et Kloepper*, 2016 ; Sijilmassi *et al.*, 2020).

IV -3-4 Réponse de l'arachide à l'inoculation sous stress hydrique

Dans la présente étude, l'inoculation de rhizobiums a réduit significativement les effets de la sécheresse sur les plants d'arachides (tableau 15).

Tableau 15 : Synthèse des moyennes de l'effet de l'inoculation sous contrainte hydrique sur les paramètres de croissance, de rendement de l'arachide.

Traitements	HT	PST	LR	PSR	NN
EP72	19,167 a	1,082 ab	17,500 a	1,183 a	70,111 a
HBA1	15,929 ab	1,270 a	15,000 abc	0,599 b	37,143 a
EP1	14,167 ab	0,972 ab	14,000 bcd	0,760 ab	55,889 a
SP32	14,143 ab	1,011 ab	16,557 ab	0,453 b	47,714a
N	17,700 a	0,990 ab	12,222 cd	0,739 ab	0,000 b
T	11,489 b	0,341b	10,956 d	0,433 b	0,000 b
Pr > F	0,001	0,024	< 0,0001	0,000	< 0,0001
Significatif	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui

NN : nombre de nodules, HT : hauteur de la tige, LR : longueur de la racine, PST : poids sec des tiges, PSR : poids sec des racines. 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 $P = 0,05$.

Plusieurs études ont signalé que l'inoculation de l'arachide avec des *Bradyrhizobium sp* et *Rhizobium sp* sélectionnés peut permettre aux plantes de surmonter les conditions de sécheresse (**Dakora, 2003; Barbosa et al., 2018 ; Sijilmassi et al., 2020 ; Vimala et al., 2018**), comme nous l'avons observé pour la symbiose EP72- arachide, puisque le stress hydrique n'était pas un facteur limitant pour le maintien des nodules.

La souche EP72 a probablement atténué les effets du déficit hydrique, car elle a fourni une augmentation de la masse sèche des racines et une réduction plus faible de la hauteur de la plante dans des conditions de stress. Cependant, la souche HBA1 a permis une réduction la plus faible de la masse sèche des pousses. Des résultats similaires pour les pousses et les racines ont été obtenus par **Barbosa et al., (2018) et Brito et al., (2019)**

Cette efficacité symbiotique en condition de déficit hydrique de la souche EP72 serait en relation avec son efficience et sa tolérance au stress osmotique. **Fitouri et al., (2012)** ont rapporté que l'adaptation au stress est aussi liée à la morphologie des nodosités. En effet, il est probable que les nodules volumineux occasionnés par la souche de *Bradyrhizobium sp* EP72 soient en partie responsables de son adaptation au stress hydrique sévère. Selon **Figueiredo et al. (1998) et Sprent (1981)**, les gros nodules possèdent un parenchyme cortical plus épais qui empêche ou réduit leur déshydratation, alors que les nodules de petite taille perdent rapidement leur réserve en eau. De plus, cette souche aurait probablement la capacité de libérer certains métabolites directement ou indirectement responsables de la modération des effets du stress hydrique sur la plante (**Figueiredo et al., 2008**).

Conclusion

Il ressort de ce travail qu'en condition de culture contrôlée sous serre, l'inoculation rhizobiale a amélioré respectivement la croissance et les rendements de l'arachide à tous les niveaux de stress hydrique par rapport aux plantes témoins dans les mêmes conditions. Les souches EP72 et HBA1 ont montré les meilleures performances symbiotiques.

La capacité des Rhizobia à être utilisés non seulement pour les Fabacées comme fixateurs d'azote mais aussi comme promoteurs de croissance des plantes, est une qualité recherchée. Le défi d'utiliser les Rhizobia comme bio-fertilisants, réside dans leur maintien dans un état actif de promotion de la croissance des plantes dans des conditions difficiles (salinité, sécheresse, pH du sol défavorable et températures extrêmes).

Chapitre VI :

*Activité antagoniste, in vitro et in vivo, des
Rhizobia nodulant l'arachide vis à vis de
Fusarium oxysporum.*

Introduction

L'arachide est sensible à plusieurs maladies qui sont causées par la confluence d'un cultivar sensible, d'un agent pathogène (champignon, bactérie ou virus) et d'un environnement favorable. Les maladies fongiques de l'arachide transmises par le sol sont très répandues, causant de telles pertes qu'elles sont considérées comme l'un des facteurs les plus importants dans la diminution du rendement en arachide (**Sharma et al., 2012 ; André et al., 2016 ; Channya et Asama, 2019**).

De nos jours, la lutte biologique se propose comme une option alternative pour une meilleure gestion des maladies (**Schmidt et al., 2018**). L'inoculation avec les rhizobia joue un rôle important dans l'acquisition des nutriments (**Beebe et al., 2013**), en plus d'être une alternative intéressante pour contrôler la dissémination des maladies des plantes (**Das et al. 2017**). Le mécanisme de biocontrôle des rhizobia peut impliquer la production d'antibiotiques, de cyanure d'hydrogène (HCN), de sidérophores et/ou de phytoalexines qui agissent contre les microorganismes phytopathogènes (**Arfaoui et al., 2007 ; Das et al., 2017**).

L'objectif de la présente investigation était d'étudier la relation entre l'efficacité symbiotique des souches de rhizobium et *Bradyrhizobium* nodulant l'arachide et le degré d'antagonisme qu'elles exercent contre la souche de *Fusarium oxysporum* basée sur des études *in vitro* et *in vivo*.

VI-1 Matériel et méthodes

VI-1-2 Matériel biologique

VI-1-2-1 Préparation de la souche fongique

Pour l'isolement du *Fusarium* à partir des graines d'arachide en post-récolte, la méthode du « test blotter » telle que décrite par **Dhingra et Sinclair (1987)** a été adoptée. Les gousses d'arachide présentant les symptômes de maladies, ont été décortiquées puis désinfectées par passage instantané dans l'éthanol à 95°, suivi d'un trempage dans une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium pendant 10 minutes. Elles ont subi par la suite une série de 3 rinçages successifs à l'eau distillée stérile pendant 5, 10 et 15 mn. Ces mêmes graines ont été imbibées dans de l'eau distillée stérile pendant 12h à 4°C pour déclencher leur germination (**Foko, 1987**). Après élimination de l'excès d'eau sur du

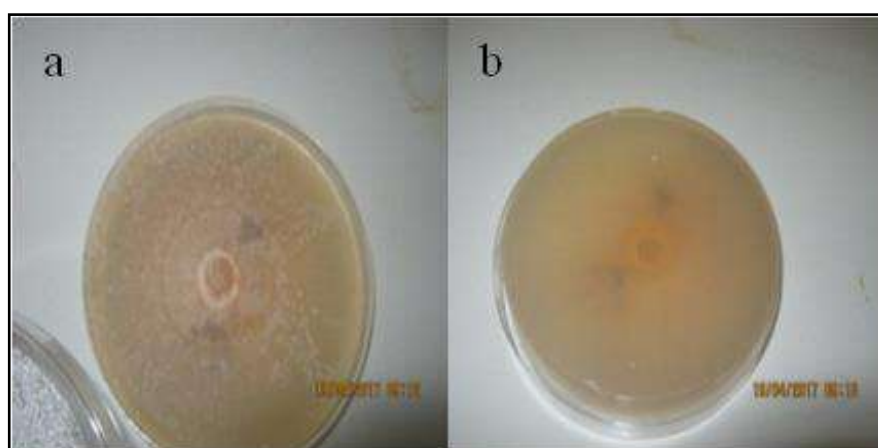
papier buvard stérile, elles ont été déposées aseptiquement dans des boîtes de Pétri, de 9 cm de diamètre, contenant une double couche de rondelles de papier filtre stérile, imbibé avec 5 ml d'eau distillée stérile, à une distance d'environ 2 cm les unes des autres à raison de 5 graines/boîte. Ensuite, elles ont été placées dans un incubateur à 25°C pendant 10 jours jusqu'à leur germination.

VI-1-2-1-1 Isolement des champignons sur milieu PDA

Les champignons, apparus sur chaque graine d'arachide, ont été repiqués sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) puis incubés à 25°C pendant 7 jours. Les colonies retrouvées ont été purifiées sur les boîtes de Pétri contenant le PDA jusqu'à l'obtention des isolats purs puis conservées à 4°C pour une éventuelle utilisation.

VI-1-2-1-2 Identification morphologique des espèces de *Fusarium oxysporum*

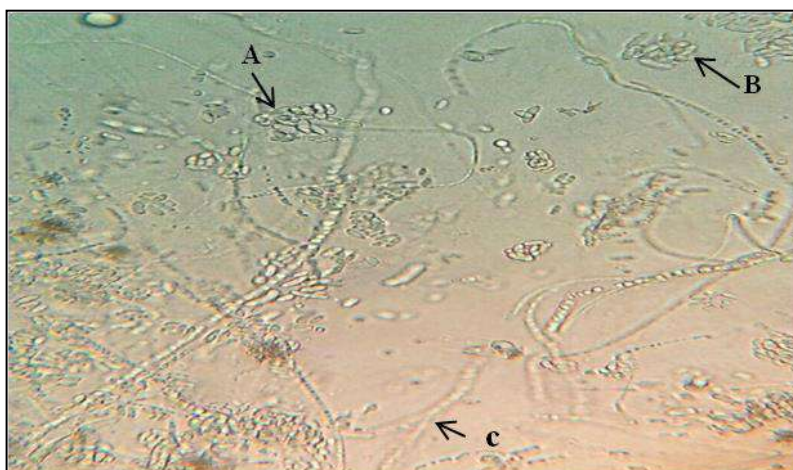
L'identification s'est basée sur les différents critères morphologiques proposés par **Booth (1971)** qui repose dans un premier temps sur une étude macroscopique des caractères morphologiques de la culture. Dans une seconde étape, sur une étude microscopique des caractères morphologiques du mycélium et des différents organes de reproduction en utilisant la méthode décrite par **Singh et al. (1991)**, **Filtenborg et al. (1995)** et **Tabuc (2007)**. Parmi les champignons en croissance, les moisissures du genre *Fusarium* sont repérées visuellement à la surface de la gélose par leur forme et leur couleur caractéristiques (colonies duveteuses à floconneuses, blanches au départ puis devenant rosées à pourpres avec un verso foncé) (photo10).



**Photo 10: Aspect macroscopique de *Fusarium oxysporum* sur milieu PDA ;
a : Recto de la boîte, b : Verso de la boîte.**

VI-1-2-1-3 Identification par observation microscopique

L'examen microscopique d'un fragment de culture du champignon a été effectué entre lame et lamelle, afin d'observer l'aspect du mycélium ainsi que la forme et la taille des conidies (photo 11).



**Photo 11: Aspect microscopique du *Fusarium* sur milieux PDA (Grx400) ;
A : Conidiophore, B : Conidies ; C : Mycélium.**

VI-1-2-1-4 Identification par la technique de microculture

L'identification est effectuée selon la méthode des microcultures (**Harris, 1989**). Elle consiste à ensemercer les spores sur une lame munie d'un petit carré, d'une mince couche de milieu PDA. Le carreau ensemençé a été recouvert par une lamelle. La lame est placée dans une boîte de Pétri stérile, contenant du papier filtre stérile, imbibé d'eau distillée stérile. L'ensemble est incubé à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 à 5 jours.

Après incubation, la lamelle à laquelle adhère le mycélium a été transférée sur une autre lame stérile contenant quelques gouttes de lactophénol pour l'observation microscopique aux grossissements G400.

VI-1-2-1-5 Identification des espèces par la technique de « Single Spore »

L'identification des espèces a été réalisée par la méthode de **Pitt (1973)** et **Ramirez (1982)** (photo 12). Cette méthode est dite « Single Spore », basée sur la relation

entre l'activité de l'eau du milieu de culture et la température d'incubation. Elle consiste en l'inoculation de quelques spores d'une culture jeune dans des tubes à hémolyse contenant une suspension semi solide (2/3 de son volume) à base d'agar et quelques gouttes de Tween 80 (0.2%), qui a pour but la dilution des spores pour l'ensemencement des milieux de culture. Après agitation du tube au vortex, des gouttes de cette suspension ont été déposées sur les milieux : CYA, MEA et G25N, et incubé à différentes températures pendant 5 à 14 jours.

Les cultures pures ont été ensemencées comme suit :

- MEA (Malt Extract Agar) à 25°C (Annexe 3) ;
- G25N (Glycérol Nitrate Agar) à 25°C (Annexe 3) ;
- CYA (Czapek Yeast Agar) à 37°C (Annexe 3) ;
- CZ (Czapek concentrate) à 25°C (Annexe 3) ;
- CDA (Czapek dox agar) à 25°C (Annexe 3) ;
- YES (Yeast Extract sucrose) à 25°C (Annexe 3).

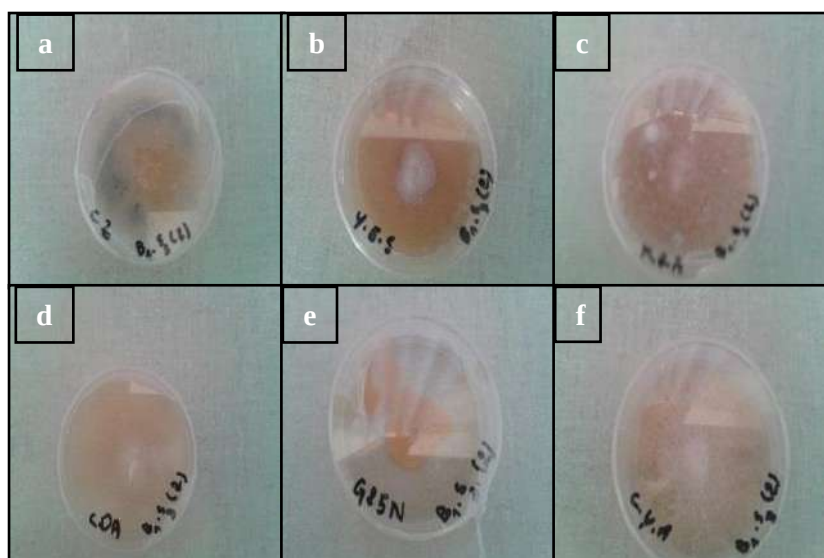


Photo 12 : Identification de l'espèce *Fusarium oxysporum* par la méthode de Single Spore a : sur milieu CZ, b : sur milieu YES, c : sur milieu MEA, d : sur milieu CDA, e : sur milieu G25N et f : sur milieu CYA.

VI-1-2-2 Préparation des souches rhizobiennes

Les souches rhizobiennes conservées, utilisées dans ce test, ont été repiquées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu YEM (Annexe1) et mises en culture de 3 à 7 jours

à 28°C. Par la suite, de chaque souche une colonie a été prélevée, à l'aide d'une anse de platine et ensemencée dans des tubes à essai contenant 9ml du milieu YMB (Annexe1), puis incubée sous agitation de 160 trm à 28°C de 3 à 7 jours. La densité optique des cultures bactériennes liquides a été mesurée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde $\lambda=600$ nm.

VI-1-3 Potentialités antagonistes *in vitro* des isolats rhizobiens vis-à-vis du *Fusarium oxysporum*

Nous avons effectué un test d'antagonisme entre le *Fusarium oxysporum* (Fu) et quatre souches de Rhizobia à savoir : HBA1, EP72, SP32 et EP1, isolées à partir des nodules de l'arachide dans les régions de Ghardaïa et de Ouargla.

VI-1-3-1 Méthode de confrontation directe bactéries/champignon

Le pouvoir antagoniste *in vitro* a été étudié par un test de compétition en utilisant la méthode de coculture par étalement. Elle est effectuée comme décrite par **Buyer et al. (1989)**, sur le milieu YEM solide. Ce milieu possède relativement une composition minérale et organique de la rhizosphère, ce qui permet l'évaluation des capacités compétitives des souches bactériennes, envers le champignon phytopathogène utilisé dans ce travail. Chacune des 4 souches rhizobiennes a été confrontée au *Fusarium oxysporum* à raison de 3 répétitions.

VI-1-3-1-1 Test d'étalement du Rhizobium

Dans ce test, les souches de Rhizobia ont été étalées sur milieu YEM (Annexe1) dans une boîte de Pétri. Après 1-2 heures, une culture pure de champignons de 7 jours a été découpée en forme de disque, de 6 mm de diamètre à l'aide d'un emporte-pièce stérile, trois disques du champignon ont été déposés dans la même boîte. Chacune des quatre souches a été testée contre le champignon étudié. Le témoin consiste à placer un disque du champignon au centre de chaque boîte de Pétri contenant le YEM sans bactéries (figure 22). Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 10 jours.

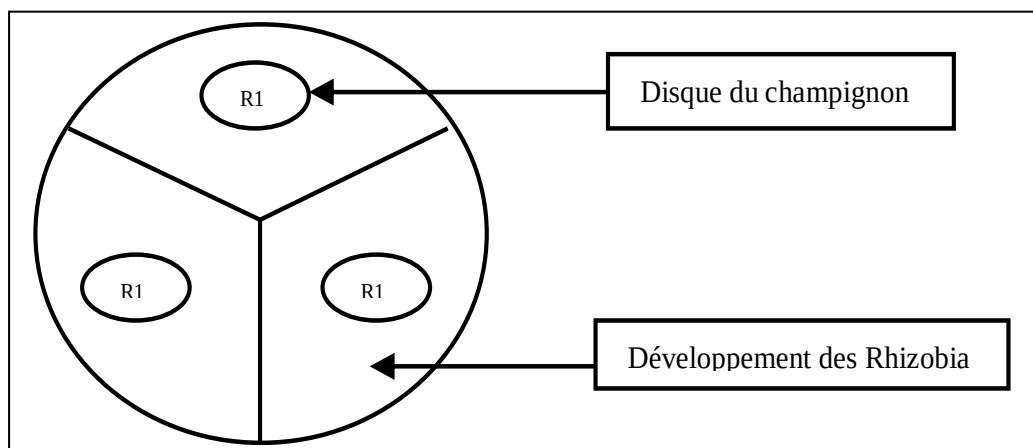


Figure 22: Représentation schématique de la méthode de confrontation directe sur boîte de Pétri

VI-1-3-1-2 Test de stries

Le champignon, comme les espèces bactériennes, provient de pré cultures en boîtes de Pétri. Selon la méthode de stries, un disque de *Fusarium oxysporum* de 8 mm de diamètre a été prélevé puis déposé à l'aide d'une pince stérile au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu YEMA 2 cm de la pastille du champignon, une souche bactérienne est ensemencée en trait (figure 23).

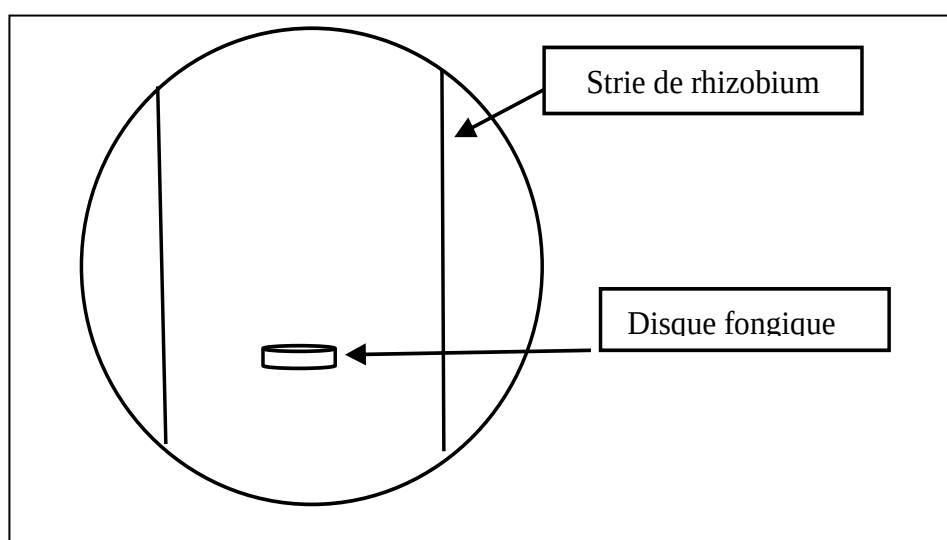


Figure 23 : Représentation schématique de la méthode de strie utilisée pour les tests d'antagonisme.

Le témoin consiste en une boîte contenant une pastille du champignon de 8 mm de diamètre et où l'inoculum bactérien a été remplacé par un trait d'eau distillée stérile. L'incubation des boîtes a été réalisée à 28°C pendant 10 jours (Weller et Cook, 1988 ; Inam-ul-Haq et al., 2003).

VI-1-3-2 Méthode de confrontation indirecte bactéries/champignon

Cette technique consiste à confronter indirectement la souche bactérienne avec le champignon phytopathogène et évaluer l'action antagoniste grâce à l'action des substances volatiles sécrétées par la bactérie testée. Dans cette technique, nous avons utilisé une culture bactérienne liquide, préparée dans des tubes à essai contenant le milieu YEM (Annexe1) liquide. Un volume de 100µl de la culture bactérienne prélevé à l'aide d'une micropipette a étéensemencé par étalement dans des boîtes de Pétri contenant du milieu YEM.

Par la suite, dans des conditions stériles, le couvercle a été remplacé par le fond d'une boîte de Pétri dans laquelle a été placé un disque de 8 mm de diamètre du champignon testé. Les deux parties ainsi réunies ont été entourées par du parafilm de façon à former une enceinte étanche afin d'éviter toute déperdition de substances volatiles (figure 24). Les effets de ces substances sont évalués après estimation de la croissance mycélienne, en présence et en absence du *Fusarium oxysporum*. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 10 jours (Essalman et Lahlou, 2002 ; Trivedi et al., 2006).

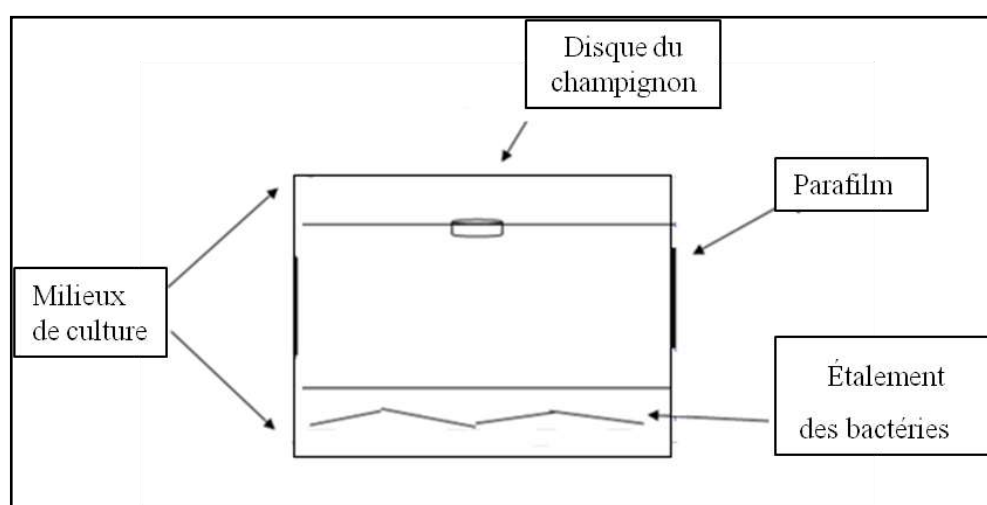


Figure 24 : Méthode de confrontation indirecte sur milieu de culture par action des substances volatiles entre les souches bactériennes et l'agent phytopathogène.

VI-1-3-3 Mise en évidence de la sécrétion de substance inhibitrice

Selon les résultats obtenus de la confrontation directe et indirecte entre les Rhizobia et le *Fusarium oxysporum*, les boîtes sélectionnées pour ce test sont celles marquées par la formation de zones d'inhibition. Ces dernières sont mises dans un milieu dans le but d'étudier le type de réaction antagoniste.

Cette technique a été réalisée par le prélèvement d'un disque de champignon provenant d'une culture fraîche de 7 jours, déposé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu YEM. Trois disques prélevés à partir des zones d'inhibition ont été déposés sur les côtes de la même boîte (figure 25). Celles-ci sont ensuite incubées à 28°C pendant 10 jours.

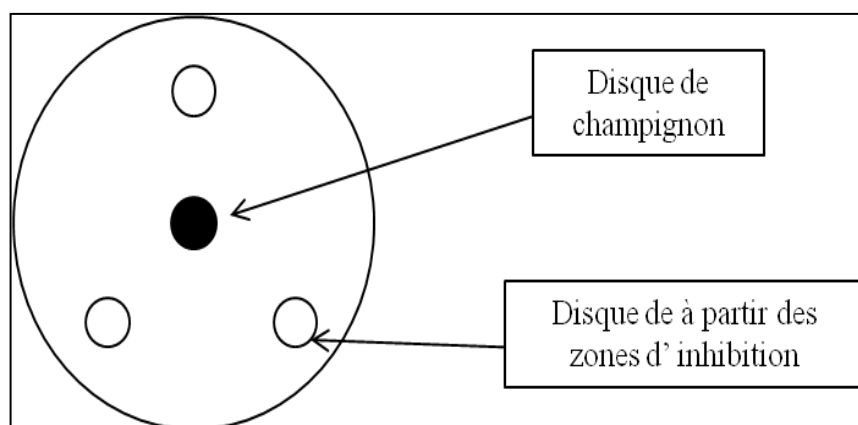


Figure 25 : Méthode de confrontation à partir des zones d'inhibition.

VI-1-3-4 Lecture de la croissance des champignons

L'apparition d'une zone claire signifie l'inhibition des champignons par les rhizobiums et qui peut être mesurée par un diamètre (mm) d'inhibition. La lecture des résultats consiste à mesurer la distance parcourue par les champignons dans la boîte à partir du disque (**Wang et al., 2002**). L'évaluation du pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons a été calculée en utilisant la formule décrite par **Whipps (1987)** :

Où le pourcentage d'inhibition (%) = $(R-r/R) \times 100$;

r : rayon de la colonie fongique en présence de la colonie bactérienne
R : rayon de la colonie fongique témoin.

VI-1-3-4 Coloration et observation microscopique du champignon

L'étude macroscopique nous permet de relever le diamètre, la pigmentation et l'aspect des colonies. Alors que l'étude microscopique par l'intermédiaire de la coloration, nous permet d'examiner la forme des hyphes, le mode d'association et le résultat de la coloration des champignons.

Deux types de lames ont été préparés (avec coloration et sans coloration). Sur les lames, une goutte soit le rouge Congo a été déposée. À l'aide d'une anse de platine nous avons prélevé une partie des extrémités d'une colonie du *Fusarium oxysporum* des trois types de confrontation : direct, indirect et à partir des zones d'inhibition. Le fragment de champignon a été bien étalé et mélangé avec l'eau distillée et le colorant dans le cas de l'observation avec coloration, ce qui nous permet d'avoir une bonne observation sous le microscope (Mannai et al., 2018). L'observation microscopique a été réalisée au niveau du laboratoire de la faculté de médecine de l'université KASDI Merbah, Ouargla. Les lames ainsi préparées ont été placées sous microscope avec un grossissement de x10 avec logiciel LASEZ.

VI-1-4 Potentialités antagonistes *in vivo* des isolats rhizobiens vis-à-vis du *Fusarium oxysporum*

VI-1-4-1 Préparation des inoculums bactériens et l'inoculum du pathogène

Les cultures des rhizobia ont été mises en incubation à 28°C sous agitation, après ensemencement d'un ml d'une préculture fraîche à 250 ml de milieu YEM liquide et dont la durée d'incubation varie selon le type de croissance des rhizobia testés. La densité optique de la suspension bactérienne lue à 600nm, elle a été uniformisée pour toutes les souches.

Les cultures de champignons utilisées dans ce travail ont été obtenues à partir de suspensions de spores congelées dans 25% de glycérol. Quelques gouttes de glycérol stock ont été étalées sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar), dans des boîtes de Pétri puis les cultures ont été incubées pendant 7 jours à 24°C et à l'obscurité. Plusieurs repiquages ont été effectués pour avoir des cultures fraîches. La suspension sporale a été obtenue en inondant des disques de 6 mm de diamètre d'une culture fraîche de 4 jours dans des boîtes de Pétri avec de l'eau distillée stérile.

VI-1-4-2 Inoculation du pathogène et de l'antagoniste dans le même compartiment

L'action du champignon pathogène et de l'agent de lutte biologique a été évaluée en pots sur l'arachide. Les graines ont été stérilisées en surface comme précédemment (chapitre 3), puis trempées dans de l'eau distillée pendant une nuit.

Elles ont été ensuite mises à germer dans des pots contenant du sable préalablement déminéralisé et stérilisé pendant 24 h à 180°C. Les étapes de préparation ont été décrites dans le chapitre 3. Les plantules ayant des tailles identiques sont choisies pour les expériences. Après la levée des plantes d'arachide, 1 ml d'inoculum de chaque souche a été ajouté. L'inoculum est stérilement injecté à la base des tiges des jeunes plantules.

Après 30 jours, les plantes ont été inoculées par la suspension sporale du champignon, en déposant 1 ml l'inoculum dans le sable situé à proximité de la plante.

Dans ce protocole, certaines plantes sont inoculées uniquement par le *Fusarium oxysporum*, d'autres par le rhizobia seul. Les plantes « control » sont de 2 types : non inoculées (C-) et non inoculées avec KNO³ (C+). Les plantes ont été irriguées avec la solution nutritive de Fahreaus (Annexe 1) dépourvue d'azote (Vincent, 1970). Le dispositif expérimental est de type bloc randomisé avec trois répétitions. Les symptômes de la fusariose ont été surveillés quotidiennement à partir d'une semaine après l'inoculation du champignon. La virulence est alors évaluée de 0 à 4 selon l'apparence de la plante (Le et al., 2012) :

0 : plante saine (0%), **1** : léger jaunissement (25%), **2** : jaunissement important (50%), **3** : plante fanée (75%), et **4** : plante morte (100%).

L'incidence de la maladie est calculée à la base de l'indice de la maladie (DI %) selon la formule de Townsend Heuberger (Erkilic et al., 2006 ; Le et al., 2012) :

$$IM (\%) = \frac{\sum(n*v)}{N*V} * 100$$

n : degré d'infection selon l'échelle
v : nombre de plants par catégorie.

N : nombre total de plantules criblées.

V : degré d'infection le plus élevé.

Au terme de l'expérience (30 jrs), les plantes ont été délicatement retirées des pots, une à une. Les racines ont été lavées pour les débarrasser du reste de sable (**Yaquib et Shahzad, 2005**). Afin d'estimer la gravité de la maladie, plusieurs paramètres ont été étudiés dans ce travail à savoir : la hauteur de la tige principale et la longueur de la racine principale. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'une règle graduée. Ainsi, la biomasse sèche des plantes et le nombre de nodules ont été évalués. Les parties aériennes, racinaires et les nodules des plantes ont été séparés et les biomasses fraîches et sèches ont été déterminées après séchage à l'étuve à 70°C pendant 72 heures. Le nombre de nodules a été compté à l'œil nu et à l'aide d'une loupe. Les mesures du poids ont été effectuées à l'aide d'une balance électronique (**Sennoi et al., 2010**).

VI-1-5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel XLSTAT version 2018. Les résultats expérimentaux sont comparés par analyse de variance. 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%. L'analyse des différences entre les modalités est réalisée avec un intervalle de confiance à 95%.

VI-1-6 Résultats et discussions

VI-1-6-1 Antagonisme par confrontation directe sur boîte de Pétri

L'activité antagoniste a été évaluée par rapport à la réduction de la croissance du mycélium fongique lors de l'interaction avec les différentes souches bactériennes. Les résultats de la confrontation directe sur milieu de culture YEM montrent que les quatre souches rhizobiennes (HBA1, EP1, SP32 et EP72) possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis du champignon phytopathogène (*Fusarium oxysporum*). Les résultats sont représentés dans les figures 26 (a et b)

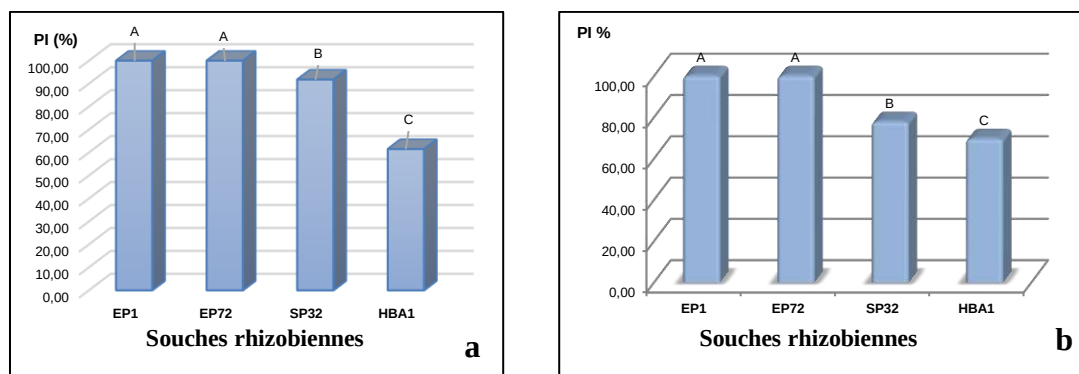


Figure 26: Pourcentage d'inhibition (PI) du *Fusarium oxysporum* par confrontation directe avec les rhizobia. a : méthode d'étalement ; b : méthode de stries.

Par méthode d'étalement, les souches EP1(*Rhizobium*) et EP72 (*Bradyrhizobium*) ont totalement inhibé (100%) la croissance du *Fusarium oxysporum*, alors que les souches SP32 et HBA1 ont réduit le développement du pathogène de plus de 90 et 60% respectivement (figure 26 a). Les boîtes de pétri témoins, sans rhizobium, étaient complètement couvertes par le mycélium du pathogène, ne montrant aucune inhibition de la croissance du champignon.

Selon la méthode des stries, l'inhibition du champignon a été variable d'une souche à l'autre. Les souches EP1 et EP72 ont montré des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de 100% (figure 26 b). Les souches SP32 et HBA1 ont présenté des pourcentages élevés d'inhibition d'environ 77.80 et 69.50% respectivement (figure 26 b). Ces souches rhizobiennes se sont révélées moins performantes que les deux premières.

Plusieurs travaux ont démontré la capacité des rhizobia à inhiber différentes espèces de *Fusarium* : *F. solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. culmorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina* ainsi que *Rhizoctonia solani* et *Pythium spp.*, pathogènes pour diverses cultures de Fabacées (Antoun et al., 2002 ; Estevez de Jensen et al., 2002 ; Bardin et al., 2004 ; Shaban et El-Bramawy, 2011).

Kanouni et al. (2018) ont rapporté une inhibition, *in vitro*, de plus de 80% contre *Fusarium spp.* et 90% contre *Alternaria spp.*, avec un effet létal du *Rhizobium leguminosarum* sur les conidies de *Fusarium oxysporum*. Hoqué et al. (2015) ont observé dans la méthode de culture double, une zone d'inhibition élevée du *Fusarium oxysporum* (57,37 %) par des isolats de *Rhizobium leguminosarum*.

Hmissi et al. (2011) ont également rapporté que les rhizobiums inhibent le *Fusarium* du blé de plus de 60 %. Ainsi, **Sharif et al. (2003)** ont indiqué une inhibition de 36% de *Fusarium sp.* et 54% d'*Alternaria alternata*. Parfois, l'action de *Rhizobium leguminosarum* était létale sur les conidies de *Fusarium oxysporum* (**Essalmani et Lahlou, 2002 ; Kanouni et al., 2018**).

L'activité antagoniste des rhizobia contre les pathogènes du sol est principalement liée à la production de substances diffusibles inhibitrices telles que les antibiotiques, les sidérophores et les métabolites volatiles, dont le cyanure d'hydrogène et l'acétoïne (**Kumar et al., 2002 ; Chandra et al., 2007 ; Martínez-Viveros et al., 2010 ; Rakh et al., 2011 ; Neupane et al., 2013**).

VI-1-6-2 Antagonisme par confrontation indirecte sur boîte de pétri

Les résultats de la confrontation indirecte entre le *Fusarium oxysporum* et les rhizobia ont montré une différence hautement significative ($<0,0001$) entre les différentes combinaisons testées (figure 27).

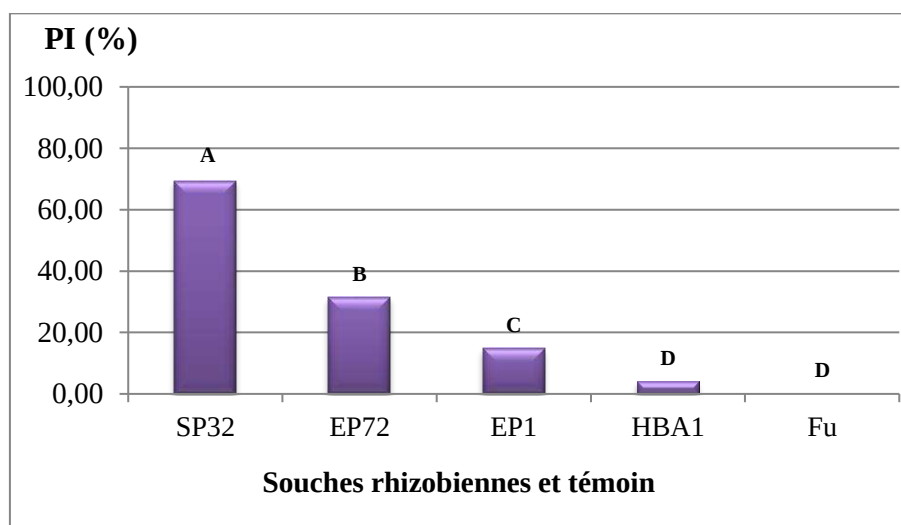


Figure 27 : Pourcentage d'inhibition (PI) du *F. oxysporum* par confrontation indirecte avec les Rhizobia

La croissance du *F. oxysporum* exposé aux substances volatiles des rhizobia a été ralentie par rapport au témoin non exposé (figure 27). L'aptitude inhibitrice des substances volatiles apparaît significative pour les souches : SP32, EP72 et EP1. Ces

dernières ont montré une efficacité par rapport à l'inhibition du pathogène avec des pourcentages respectifs de 69.35, 31.40 et 14.74 %. Cependant aucune différence significative n'a été observée pour la souche HBA1.

L'effet de lutte biologique des rhizobiums est également attribué à la production de NH_3 et de HCN , qui sont des composés inorganiques polyvalents, contribuant au mécanisme de lutte biologique contre plusieurs phytopathogènes à l'acide cyanhydrique (Martínez-Viveros *et al.*, 2010 ; Soni et Choure, 2022). Tariq *et al.* (2020) ont rapporté également que la production de NH_3 et de HCN dans le sol par les Rhizobia réduit la croissance des champignons phytopathogènes et inhibe la germination des spores.

VI-1-6-3 Antagonisme à partir des zones d'inhibition

D'après les résultats obtenus (figure 28), certains rhizobia ont montré un potentiel antifongique par le mécanisme de substances antagonistes diffuses dans le milieu. Les résultats ont révélé une différence significative des pourcentages d'inhibition entre les différentes combinaisons. En effet, chez la souche EP72, le pourcentage d'inhibition a atteint 32,04 %. Aucune différence significative n'a été observée entre les souches SP32 et HBA1 avec des pourcentages respectifs de 27.74 et 25.09 %. Le pourcentage d'inhibition le plus faible a été enregistré chez la souche EP1 avec seulement 11,53%.

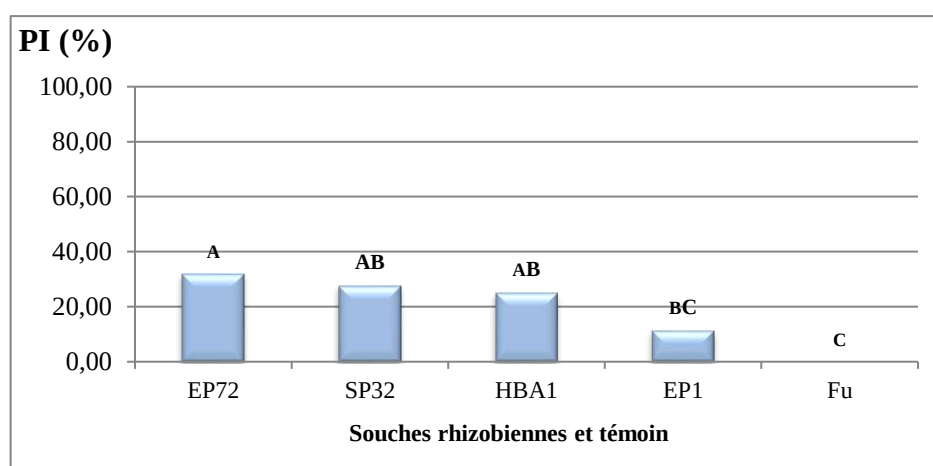


Figure 28 : Pourcentage d'inhibition (PI) du *F. oxysporum* par confrontation avec les disques des zones d'inhibition.

Ce phénomène d'inhibition de la croissance radiale du *F. oxysporum* a été observé dans plusieurs travaux. **Montealegre et al. (2003)** ont suggéré que les rhizobiums pourraient produire certains métabolites secondaires antifongiques (AFM). Selon **Landa et al. (1997)**, la compétition nutritionnelle est exclue comme mode d'action pour ces isolats dans ce test.

L'activité antagoniste des Rhizobia contre les phytopathogènes du sol est principalement liée à la production d'antibiotiques (**Chandra et al., 2007 ; Das et al., 2017**), à certaines enzymes mycolytiques (**Sridevi et Mallaiah, 2008**), et aux sidérophores (**Jaiswal, et al., 2021 ; Shahid et al., 2021**). Ces derniers sont des composés chélateurs du fer, jouant un rôle important en tant qu'agent de lutte biologique. En raison de l'apport limité de fer dans la rhizosphère, les Rhizobiacées productrices de sidérophores peuvent réduire les agents pathogènes (**Gopalakrishnan et al., 2015 ; Tagele et al., 2019 ; Soni et Choure, 2022**). En plus d'améliorer la nutrition en Fe et de favoriser la croissance des plantes, les sidérophores rhizobiens ont également été impliqués dans l'adaptation des plantes à de fortes concentrations de métaux lourds dans les sols agricoles (**Jaiswal et al., 2018**).

Plusieurs espèces de rhizobiums ont été décrites comme des inhibiteurs naturels de certains agents pathogènes du sol. Parmi ces espèces, on peut citer : *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* chez le pois chiche (**Singh et al., 2010**), *Rhizobium japonicum* contre *Macrophomina phaseolina* et *Fusarium solani* chez le soja, *Bradyrhizobium japonicum* contre le *Fusarium* chez le niébé (**Kannan et al., 2019**), ainsi que d'autres espèces de rhizobia non identifiées contre *Sclerotium rolfsii*, *Cylindrocladium parasiticum*, *Pythium* sp. (**Al-Ani et al., 2012**).

VI-1-6-4 Observations microscopiques des hyphes

Les observations microscopiques des hyphes du *Fusarium oxysporum*, confrontés vis-à-vis des rhizobia dans la zone de contact entre eux, montre une lyse des hyphes observés en réponse au stress biologique provoqué par les rhizobia chez les combinaisons Fu vs EP72, Fu vs HBA1 et Fu vs EP1 (photo 13). Une déformation des hyphes et absence des conidiophores et conidies ont été observées pour la combinaison Fu vs EP1. Les substances inhibitrices émises par notre collection de rhizobia ont une importante activité fongicide puisque la majorité des conidies ont été tuées. Ce phénomène est probablement dû à la présence de molécule(s) présentant une action lytique.

Plusieurs travaux ont signalé que l'enquête microscopique après coloration avec du colorant bleu coton a montré une morphologie des hyphes fongiques déformée et fragmentée en raison de la production d'enzymes mucolytiques dégradant la paroi cellulaire (protéase, lipases et cellulase) (Arora *et al.*, 2001 ; Arfaoui *et al.*, 2006 ; Sridevi et Mallaiah, 2008).

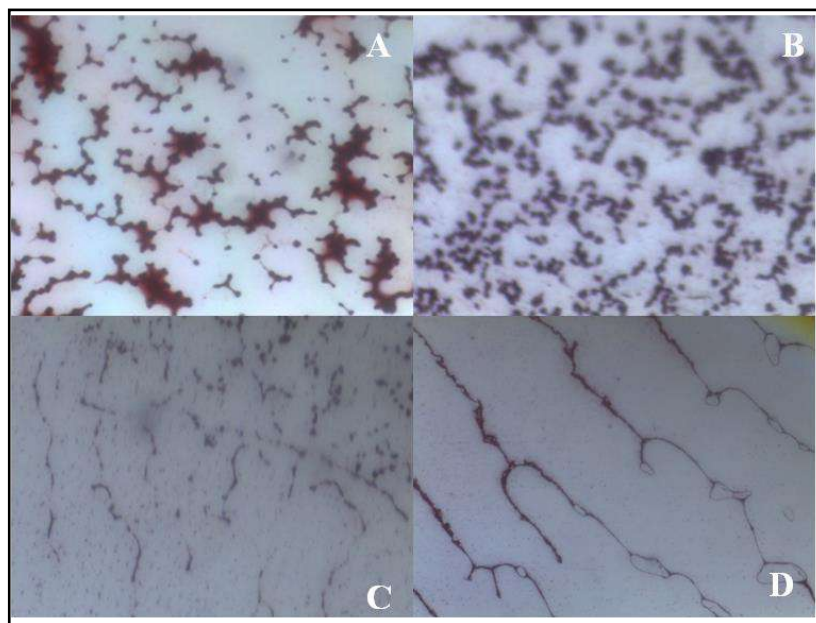


Photo 13 : Aspect microscopique des hyphes du *Fusarium oxysporum* dans la zone de confrontation avec les rhizobia (Grx100). A : Fu vs HBA1; B : Fu vs EP72; C : Fu vs SP32 et D : Fu vs EP1.

Nos résultats concordent avec ceux de Mannai *et al.* (2020) qui ont signalé une grande altération des hyphes du champignon phytopathogène de *Pythium ultimum* dans les zones de contacts avec *Burkholderia glathei*, exprimée par la lyse du mycélium et la formation des cordes mycéliennes. De même, Kumar *et al.* (2011) ont noté que les rhizobia associées au fenugrec ont supprimé la croissance de *Fusarium oxysporum*, entraînant une perte d'intégrité structurelle du mycélium, une perforation et lyse d'hyphes, une fragmentation et une dégradation. De même, Soni et Choure (2022) ont observé une déformation mycélienne ainsi qu'une perte complète des spores de *Fusarium oxysporum* par *Rhizobium tarimense*.

Des investigations microscopiques de Deshwal *et al.* (2003) et Volpiano *et al.* (2019) ont également révélé que l'inoculation de rhizobium conduit à un gonflement intercalaire anormal, un dépliement, une déformation de la pointe, une lyse des hyphes et une dégénérescence du cytoplasme de champignons tels que *Rhizoctonia solani*,

Fusarium oxysporum, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Macrophomina phaseolina*, en raison de leurs interactions avec les rhizobiums.

VI-1-7 Antagonisme *in vivo* des rhizobiums vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*

VI-1-7-1 Effet de la double inoculation rhizobienne et fongique sur l'incidence de la maladie et de la nodulation

Les plants d'arachide inoculés avec les rhizobia se sont montrés sains par rapport à ceux inoculés avec le *F. oxysporum* seulement. Les résultats ont révélé une différence significative entre les différents traitements (figure 29).

L'inoculation a diminué significativement l'indice de maladie. Ainsi, les souches EP72 et EP1 ont réduit de manière significative les symptômes de la maladie causés par *F. oxysporum* à 13,83 % et 22,20 % respectivement (figure 29 a).

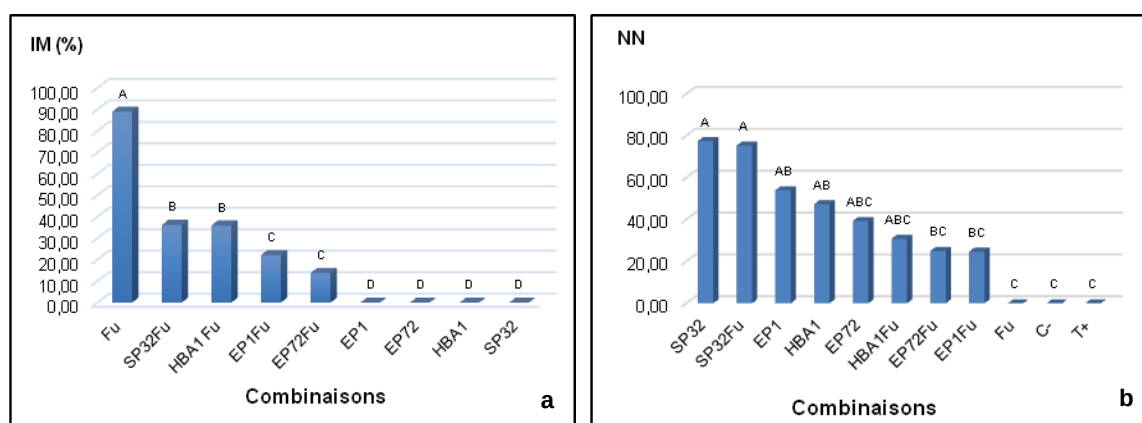


Figure 29: Double inoculation rhizobienne et fongique :

a : effet sur l'incidence de la maladie (IM); b : effet sur la nodulation (NN).

L'inoculation avec la souche EP72 a induit une suppression des symptômes de la maladie de plus de 86%, tandis que l'inoculation avec les souches SP32 et HBA1 a réduit la maladie de plus de 60% (figure 29 a). Les symptômes de la maladie n'ont pas été observés chez les témoins sans aucune inoculation fongique.

L'agent pathogène fongique a été également capable d'infecter les plantules (photo 14). Après 4 jours d'inoculation, les premiers symptômes ont été observés autour de la région du collet, sur les cotylédons et les vieilles feuilles basales. Un jaunissement a été

observé, suivi d'un dessèchement progressif des feuilles des plantes infectées. Un développement des hyphes blancs du champignon est également apparu près de la région du collet de la plante. La région du collet a été affaiblie par l'agent pathogène, ce qui a entraîné le flétrissement et la mort des plantes.



Photo 14 : Effet de la double inoculation Rhizobia et Fusarium. a : plants avant le stress biotique ; b : jaunissement des feuilles ; c : hyphes blancs près du collet ; d : la fin du stress biotique.

Les souches de rhizobiennes ont montré une grande différence dans leur capacité à noduler la plante hôte (figure 29 b) La présence de *F. oxysporum* a significativement affecté la nodulation des plantes associées aux souches rhizobiennes EP1, HBA1 et EP72. Le nombre moyen de nodules par plante a varié de 39 à 77 avec les souches EP72 et SP32 respectivement. Cette dernière semble être la plus effective, où la nodulation est restée très importante malgré la présence du champignon.

VI-1-7-2 Effet de la double inoculation rhizobienne et fongique sur la croissance et le rendement

La longueur et le poids sec des pousses ont montré une variation parmi les plantes doublement inoculées avec les différentes souches rhizobiennes et les spores de *F. oxysporum* (figure 30). Les plants d'arachide infestés, inoculés avec les souches EP1 et EP72, possèdent un faible nombre de nodules, mais un poids sec des pousses significativement plus élevé par rapport aux autres plants

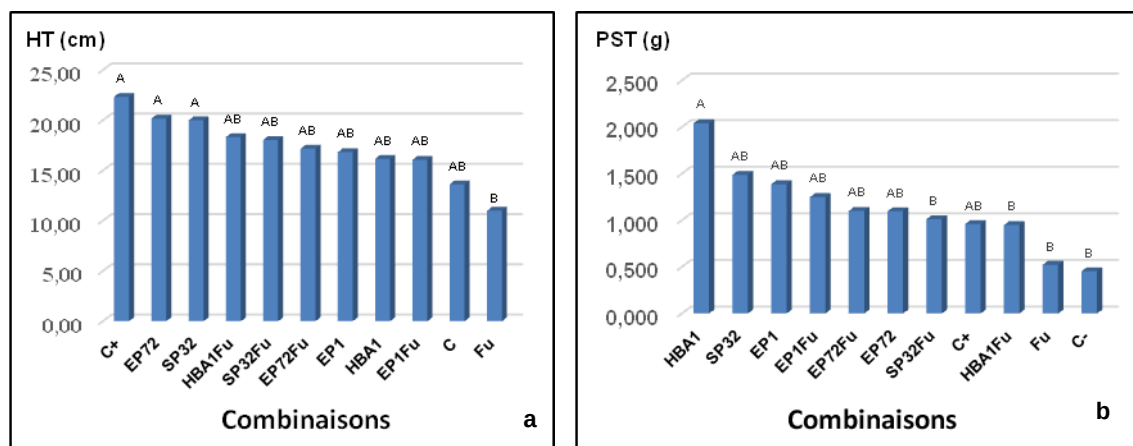


Figure 30 : Effet de la double inoculation rhizobiale et fongique. a : sur la hauteur des tiges (HT) ; b : Sur le poids sec des pousse (PST).

Malgré la présence de quelques symptômes de maladie chez les plantes co-inoculées, ces dernières ont manifesté une augmentation significative de la longueur et le poids sec des pousses par rapport au témoin infesté (Fu). Les plantes inoculées avec des Rhizobiums antagonistes ont induit une réduction de l'indice de maladie (figure 29 a) Ces souches ont également été efficaces pour favoriser la croissance des plantes, en augmentant le poids sec des pousses par rapport au témoin (C-) (figure 30). Ces bénéfices peuvent être attribués à un meilleur contrôle de la maladie en présence de la bactérie et/ou à une meilleure nutrition, due notamment à une nodulation plus importante.

Plusieurs travaux ont relevé les effets bénéfiques des rhizobiums sur la croissance des plantes et la réduction de l'incidence des maladies (Hussain et Ghaffar, 1990, Mohammed et Hossain 2002, Arfaoui et al., 2006, Ghasemi et al., 2017). Les métabolites secondaires antifongiques produits par *Rhizobium* spp., dans le contrôle des maladies des plantes causées par des champignons pathogènes, ont été cités par Siddiqui et al. (2000). De plus, l'efficacité d'un agent de lutte biologique donné, résulte

majoritairement, non seulement d'un mécanisme unique mais d'une combinaison de différents modes d'actions (**Khan et al., 2007**). Nos expériences ont révélé l'efficacité des souches bactériennes EP1 et EP72. Ces deux souches ont pu augmenter de manière significative l'émergence des plantes, qui est un paramètre important qui influence positivement le peuplement et la production des plantes au champ.

Ganesan et al. (2007) ont indiqué que l'application des micro-organismes indigènes a réussi à réduire l'incidence de la pourriture de la tige et a également augmenté la croissance des plants d'arachide. Selon **Khalifa et al. (2013)**, dans des conditions de serre et de champ, l'inoculation du sol et des graines avec des rhizobiums a amélioré l'efficacité du contrôle des maladies sur l'arachide telles que la fonte des semis, la pourriture des racines et la pourriture des gousses, par rapport au contrôle non traité. Dans notre étude, les souches les plus actives EP1 et EP72 se sont révélées fournir une suppression significative de la gravité de la maladie *in vivo* et inhibent la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum in vitro*. Ces résultats rejoignent ceux de **Idris et al. (2007)**.

De la même manière, les espèces de *Rhizobium* ont considérablement réduit le flétrissement et la pourriture des racines du haricot commun et du pois chiche causés par les espèces de *Fusarium* (**Akhtar et Siddqui, 2007 ; Arfaoui et al., 2007**). **Sridevi et Mallaiah (2008)** ont également signalé que des souches de *Rhizobium* de sesbania ont été capables de produire des chitinases et d'inhiber *Fusarium udum* et *Fusarium oxysporum*. L'activité chitinase des isolats de *Rhizobium* pourrait être avantageuse dans la lutte biologique contre certains champignons communs du sol, y compris les espèces pathogènes. Ainsi, la production d'hormones de croissance, d'antibiotiques, d'enzymes, de sidérophores et de cyanure d'hydrogène (HCN), ont une signification écologique dans les interactions des rhizobiums avec les champignons du sol (**Deshwal et al., 2003 ; Ahemad et Kibret, 2014 ; Tariq et al., 2020**).

Outre leurs effets favorisant la croissance, les rhizobiums ont été impliqués dans des processus conduisant à la résistance systémique induite (ISR) chez les plantes hôtes qui est régie par des mécanismes complexes via l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène et de phytoalexines. L'augmentation de la production de la callose et l'activation des gènes liés à la défense conduisent à une résistance accrue à l'infection (**Díaz-Valle et Alvarez-Venegas, 2019**). En plus de leur rôle de molécules « signal » dans la symbiose légumineuse-rhizobium, les métabolites rhizobiens tels que la

riboflavine et le lumichrome, ainsi que des vitamines telles que la thiamine, la biotine, la niacine et l'acide ascorbique ont été impliqués dans la défense des plantes légumineuses contre les agents pathogènes (**Palacios et al., 2014**)

Conclusion

Le test de confrontation *in vitro* nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antagoniste des quatre souches de rhizobia vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* par divers mécanismes.

A la lumière de ces investigations réalisées *in vitro* et *in vivo*, il s'avère que les rhizobia testés pourraient être des agents de contrôle biologique efficaces, capables de réduire la sévérité de la fusariose de l'arachide ou même chez d'autres plantes, dans la mesure où leur innocuité à l'égard de l'hôte aura été prouvée.

Il serait très intéressant de mener des investigations approfondies pour déterminer la nature des molécules inhibitrices des souches prometteuses de cette étude, qui peuvent être développées en inoculants commerciaux. Cependant, leur efficacité en biocontrôle doit d'abord être confirmée dans des conditions de terrain.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La croissance et la productivité des plantes dépendent de plusieurs facteurs, dont la nutrition minérale, la résistance aux insectes nuisibles et aux maladies. La mise en valeur de l'effet bénéfique des Rhizobia a été l'une des priorités de recherche au cours des dernières années. Ces derniers sont capables de déclencher des voies biologiques qui provoquent des résultats avec des effets directs et indirects sur la protection et la promotion de la croissance des plantes. L'étude des liens entre les résultats des symbioses légumineuses-rhizobia a le potentiel d'identifier les microsymbiotes à utiliser comme inoculants en raison de la multiplicité des fonctions qu'ils suscitent.

La présente étude a porté en premier lieu sur l'intérêt d'évaluer la biodiversité des microorganismes symbiotiques nodulant l'arachide cultivée au Sahara Septentrional Est Algérien. Le second objectif a consisté à réaliser des essais production d'inoculum rhizobiens pour l'inoculation de l'arachide avec des souches à haute performance symbiotique, les mieux adaptées aux conditions environnementales prédominantes dans les régions candidates pour sa culture.

L'évaluation de la variabilité phénotypique, écophysiological, nutritionnelle et symbiotique des bactéries associées aux nodules de l'arachide nous a permis d'évaluer la biodiversité de ces microsymbiotes. Ainsi, nous avons pu construire une rhizothèque composée de 48 souches autochtones infectives et effectives regroupées en rhizobia à croissance lente (60,41%) et à croissance rapide (39,58%). Les tests nutritionnels nous ont permis de mettre en évidence la capacité des souches à utiliser un large spectre de substrats carboné et azoté. Cette caractéristique leur permet une bonne résistance au sol à l'état saprophyte.

Le comportement des souches et la comparaison de leurs aptitudes de croissance sous les différentes conditions de stress biotique et abiotique, ont révélé une grande diversité de leurs réponses vis-à-vis des différentes contraintes. Nos souches ont une meilleure croissance aux températures comprises entre 28°C et 37° avec un optimum de 28 °C. Elles ont présenté une large gamme de tolérance à la concentration de NaCl allant de 0 mM (0 g/l) à 640 mM (37,4 g/l). La tolérance à l'acidité s'est révélée faible aux pH 4 et 5 par rapport à l'alcalinité (pH 8 et 9). Une forte antibiorésistance des souches à testés allant jusqu'à 100% pour la netilmicine et la spiramycine. Les souches

sont dotées d'une bonne résistance aux rhizophages de plus de 91%. Les souches tolérantes de la collection peuvent être considérées comme une ressource pouvant être appliquée dans le développement des inoculants. La taxonomie numérique des 48 souches réalisée sur la base des caractères phénotypiques a permis de regrouper les souches en 3 clusters avec niveau de similarité de 83%.

Nous avons réalisé une production de deux types d'inoculums liquide et solide (à base de tourbe), en utilisant quatre souches rhizobiennes provenant des régions de Ouargla (Hassi Ben Abdallah) et de Ghardaïa (Sebseb et El-Mansoura), sélectionnées parmi toute la collection de souches pour leur capacité à tolérer les facteurs biotiques et abiotiques dans ces régions.

Les tests d'inoculation contrôlée, des plantes d'arachides avec les souches de *Bradyrhizobium sp.* et *Rhizobium sp.* en pots sous serre, ont révélé que les inoculants étaient des promoteurs de croissance, significativement efficaces d'*Arachis hypogaea* L., comme en témoignent la croissance le rendement. Les souches ont induit une nodulation importante avec un gain en azote nettement supérieur à celui du témoin et même plus important que celui du témoin azoté pour certaines souches. Les souches EP72 et SP32 ont augmenté significativement la hauteur et le poids sec des tiges respectivement. Par ailleurs, les souches EP72 et HBA1 ont contribué à une bonne fixation d'azote par rapport aux autres souches. Il ressort de cette étude que l'inoculation procure des bénéfices importants à la plante et peuvent être utilisés comme source de biofertilisants respectueuse de l'environnement, pour améliorer la croissance et le rendement de l'arachide dans les zones sahariennes d'Algérie.

La réponse de l'arachide à l'inoculation sous contrainte saline, a révélé que le stress salin réduisait de manière significative la croissance et le rendement des plantes. L'inoculation a amélioré la capacité de la plante à résister à la salinité. L'inoculation avec les souches EP72, EP1, SP32 et HBA1 était bénéfique pour augmenter le poids sec des parties aériennes et racinaires, le nombre de nodules et la longueur racinaire. A 160mM, les souches HBA1, EP72 et EP1 ont montré des meilleurs résultats du poids sec des parties aériennes comparé à celui du témoin azoté. Cependant la souche EP72 a augmenté significativement la hauteur des tiges par rapport à toutes les autres combinaisons. Ce

travail met l'accent sur l'intérêt de l'inoculation rhizobienne dans la tolérance de l'arachide à la salinité.

L'essai de culture de l'arachide sous contrainte hydrique a révélé que la sécheresse a affecté significativement la croissance, la nodulation et le rendement de l'arachide. De même, l'inoculation a été affectée par le stress hydrique, avec quelques variations entre les combinaisons symbiotiques testées. Cependant, l'inoculation a permis à la plante de mieux tolérer cette contrainte. La souche EP72 a atténué les effets du déficit hydrique, car elle a fourni une augmentation de la masse sèche des racines et une réduction la plus faible de la hauteur de la plante. Par ailleurs, la souche HBA1 a permis une plus faible réduction de la masse sèche des pousses. Cette étude met en valeur l'importance de l'inoculation rhizobienne sur la tolérance de l'arachide à la sécheresse.

Quant aux tests d'antagonismes, *in vitro*, entre les souches rhizobiennes et l'agent phytopathogène *Fusarium oxysporum*, les résultats ont montré une bonne inhibition du champignon supérieur à 60%. A partir des observations macroscopiques et microscopiques des différentes confrontations, nous avons remarqué l'existence de plusieurs mécanismes d'inhibitions impliqués par les Rhizobia qui affectent fortement la croissance du champignon, y compris, la compétition nutritionnelle, la sécrétion des substances inhibitrices diffuses et la production de composés volatiles ainsi que des enzymes lytiques.

Nous avons réussi à développer un inoculum de Rhizobia favorisant la croissance des plantes avec le potentiel de maîtriser les phytopathogènes et de stimuler la croissance d'arachide. L'inoculation rhizobienne a permis une bonne résistance de la plante au *Fusarium oxysporum* avec une diminution de l'indice de maladie de moins de 36%, et une croissance plus vigoureuse des plantes, en augmentant le poids sec des pousses par rapport au témoin.

Au final, nous pouvons dire que les potentialités antagonistes de nos Rhizobia dans le biocontrôle du *Fusarium oxysporum*, *in vitro* et *in vivo*, avec une préférence effective de la croissance globale des plantes *Arachis hypogaea* L., sous contrainte biotique, ont été démontrées.

Il ressort de cette thèse que l'utilisation d'inoculant est l'une des approches clés en matière d'amélioration du rendement des cultures et de lutte biologique contre les maladies des plantes. La génération de connaissances étendues sur l'inoculation peut également en constituer une priorité de recherche pour améliorer l'adoption, l'exploitation et les succès de cette approche. Il sera très intéressant de poursuivre cette étude en réalisant des études futures :

- Caractériser sur le plan moléculaire les souches à fin de déterminer avec exactitude leur position taxonomique ;
- Réaliser des essais d'inoculation, *in situ*, à fin de vérifier l'efficacité et la compétitivité des souches élites de cette étude ;
- Produire des inoculums mixtes, visant à favoriser la croissance des plantes en combinant des mécanismes distincts et les potentialités de différents PGPR ;
- Valoriser les substrats peu coûteux dans la production d'inoculum, comme les déchets agricoles pour répondre aux objectifs de l'agriculture verte sans préjudice pour le milieu.

Références bibliographiques

- Abd-El-Khair, H., Elshahawy, I. E., & Haggag, H. E. (2019). Field application of *Trichoderma* spp. combined with thiophanate-methyl for controlling *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in dry bean. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-9
- Abdelnaby, M., Elnesairy, N. N. B., Mohamed, S. H., & Alkhayali, Y. A. A. (2015). Symbiotic and phenotypic characteristics of rhizobia nodulating cowpea (*Vigna Unguiculata* L. Walp) grown in arid region of Libya (Fezzan). *J Environ Sci Eng*, 4, 227-239.
- Abdulameer, A. S. (2011). Impact of rhizobial strains mixture, phosphorus and zinc applications in nodulation and yield of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Baghdad Science Journal*, 8(1), 357-365.
- Aber, J. D., Nadelhoffer, K. J., Steudler, P., & Melillo, J. M. (1989). Nitrogen saturation in northern forest ecosystems. *BioScience*, 39(6), 378-286.
- Abou-El-Hassan, S., & Elbatran, H. S. (2020). Production of pea without chemical fertilizers via integrating biofertilizers with vermiwash. *Plant Arch*, 20(2), 4319-4325.
- Abrol, Y. P., Adhya, T. K., Aneja, V. P., Raghuram, N., Pathak, H., Kulshrestha, U., ... & Singh, B. (Eds.). (2017). *The Indian nitrogen assessment: Sources of reactive nitrogen, environmental and climate effects, management options, and policies*. Elsevier.
- Ahamd, M., Zahir, Z. A., Nadeem, S. M., Nazli, F., Jamil, M., & Jamshaid, M. U. (2014). Physiological response of mung bean to *Rhizobium* and *Pseudomonas* based biofertilizers under salinity stress. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 51(3).
- Ahemad, M., and Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* 26, 1–20. doi: 10.1016/j.jksus.2013.05.001
- Mushtaq, Z., Faizan, S., Gulzar, B., & Hakeem, K. R. (2021). Inoculation of *Rhizobium* alleviates salinity stress through modulation of growth characteristics, physiological and biochemical attributes, stomatal activities and antioxidant defence in *Cicer arietinum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 2148-2163.
- Ahmad, E., Zaidi, A., Khan, M. S., & Oves, M. (2012). Heavy metal toxicity to symbiotic nitrogen-fixing microorganism and host legumes (pp. 29-44). Springer Vienna.
- Ahmad, M., Zahir, Z. A., Nadeem, S. M., Nazli, F., Jamil, M., & Khalid, M. (2013). Field evaluation of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains to improve growth, nodulation and yield of mung bean under salt-affected conditions. *Soil & Environment*, 32(2).
- Ahmad, M., Zahir, Z. A., Nazli, F., Akram, F., Arshad, M., & Khalid, M. (2013). Effectiveness of halo-tolerant, auxin producing *Pseudomonas* and *Rhizobium* strains to improve osmotic stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 1341-1348.
- Albáñez, F., Wall, L., & Fabra, A. (2017). Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots. *Journal of Experimental Botany*, 68(8), 1905-1918.
- Akhtar, M. S., & Siddiqui, Z. A. (2007). Effects of *Glomus fasciculatum* and *Rhizobium* sp. on the growth and root-rot disease complex of chickpea. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 40(1), 37–43. <https://doi.org/10.1080/03235400500320133>
- Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: the European situation. *European journal of plant pathology*, 114(3), 329-341.
- Alam, F., Kim, T. Y., Kim, S. Y., Alam, S. S., Pramanik, P., Kim, P. J., & Lee, Y. B. (2015). Effect of molybdenum on nodulation, plant yield and nitrogen uptake in hairy vetch (*Vicia villosa* Roth). *Soil Science and Plant Nutrition*, 61(4), 664-675.
- Al-Ani, R. A., Adhab, M. A., Mahdi, M. H., & Abood, H. M. (2012). *Rhizobium japonicum* as a biocontrol agent of soybean root rot disease caused by *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina*. *Plant Protection Science*, 48(4), 149-155.

- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050.
- Alexandre, A., & Oliveira, S. (2013). Response to temperature stress in rhizobia. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(3), 219-228.
- Alexandre, A., Laranjo, M., & Oliveira, S. (2006). Natural populations of chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods. *Microbial ecology*, 51, 128-136.
- Allito, B. B. (2015). Soil population and phenotypic characterization of soybean (*Glycin max*) and haricot bean (*Phaseolus vulgaris*) nodulating rhizobia at Hawassa and Ziway. *Scholarly Journal of Agricultural Sciences*, 5(1), 30-38.
- Allito, B. B., Ewusi-Mensah, N., & Alemneh, A. A. (2014). Rhizobia strain and host-legume interaction effects on nitrogen fixation and yield of grain legume: A review.
- Anand, A., Jaiswal, S. K., Dhar, B., & Vaishampayan, A. (2012). Surviving and thriving in terms of symbiotic performance of antibiotic and phage-resistant mutants of *Bradyrhizobium* of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Current microbiology*, 65, 390-397.
- Andrés, J. A., Pastor, N. A., Ganuza, M., Rovera, M., Reynoso, M. M., & Torres, A. (2016). Biopesticides: An Eco-Friendly Approach for the Control of Soilborne Pathogens in Peanut. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*, 161–179. doi:10.1007/978-81-322-2647-5_9
- Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., & Lalande, R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Molecular microbial ecology of the soil: results from an FAO/IAEA co-ordinated research programme, 1992–1996*, 57-67.
- Appunu, C., Reddy, L. M., Reddy, C. V. C., Sen, D., & Dhar, B. (2009). Symbiotic diversity among acid-tolerant bradyrhizobial isolates with cowpea.
- Arfaoui, A., Sifi, B., Boudabous, A., El Hadrami, I., & Chérif, M. (2006). Identification of rhizobium isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f.sp. *Ciceris*, the causal agent of fusarium wilt of chickpea. *Journal of Plant Pathology*, 88(1), 67–75. <https://doi.org/10.4454/jpp.v88i1.832>
- Arfaoui, A., El Hadrami, A., Mabrouk, Y., Sifi, B., Boudabous, A., El Hadrami, I., Daayf, L., & Chérif, M. (2007). Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(6-7), 470–479. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.04.004>
- Arora, N. K., Kang, S. C., & Maheshwari, D. K. (2001). Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *CURRENT SCIENCE*, 81(6), 673–677. Consulté sur <https://www.jstor.org/stable/24106362>
- Arrese-Igor, C., González, E. M., Marino, D., Ladrera, R., Larrainzar, E., & Gil-Quintana, E. (2011). Physiological responses of legume nodules to drought. *Plant stress*, 5(1), 24-31.
- Ausili, P., Borisov, A., Lindblad, P., & Mårtensson, A. (2002). Cadmium affects the interaction between peas and root nodule bacteria. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Plant Soil Science*, 52(1), 8-17.
- AYDİNŞAKİR, K., BÜYÜKTAŞ, D., Nazmi, D. İ. N. Ç., & KARACA, C. (2015). Impact of salinity stress on growing, seedling development and water consumption of peanut (*Arachis hypogaea* cv. NC-7). *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2).

- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C. D., Banks, H., Barbosa, A. R., Pinto, R. B., ... & Zimmerman, E. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *taxon*, 66(1), 44-77.
- Azib, S., Cheloufi, H., Attab, S., & Bouras, N. (2019). Improvement of alfalfa growth under water stress by inoculation with *Sinorhizobium meliloti* strains from the Algerian Sahara. *International Journal*, 75(7/1).
- Azib, S. (2020). La symbiose rhizobium-luzerne : étude de la diversité rhizobienne et essais d'inoculation en vue d'améliorer les rendements en fourrage dans le Sahara septentrional est-algérien. Thèse Doctorat, UKM Ouargla.
- Azib, S., Cheloufi, H., Attab, S., Bouras, N., & Holtz, M. D. (2022). Phenotypic and Genotypic Diversity of Microsymbionts Nodulating *Medicago sativa* (L.) in the Algerian Sahara. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15(2).
- Badar, R., Nisa, Z., & Ibrahim, S. (2015). Supplementation of P with rhizobial inoculants to improve growth of Peanut plants. *International Journal of Applied Research*, 1(4), 19-23.
- Bakholdina, S. I., Sanina, N. M., Krasikova, I. N., Popova, O. B., & Solov'eva, T. F. (2004). The impact of abiotic factors (temperature and glucose) on physicochemical properties of lipids from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochimie*, 86(12), 875-881.
- Baraibar, A., Frioni, L., Guedes, M. E., & Ljunggren, H. (1999). Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34, 1010-1017.
- Bardin, S. D., Huang, H., Pinto, J., Amundsen, E. J., & Erickson, R. S. (2004). Biological control of *Pythium* damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. *Canadian Journal of Botany*, 82(3), 291-296. <https://doi.org/10.1139/b04-003>
- Barnet, Y. M. (1972). Bacteriophages of *Rhizobium trifolii* I. Morphology and host range. *Journal of general virology*, 15(1), 1-15.
- Barnet, Y. M. (1980). The effect of rhizobiophages on populations of *Rhizobium trifolii* in the root zone of clover plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 26(5), 572-576.
- Beattie, G. A., & Handelsman, J. (1989). A rapid method for the isolation and identification of *Rhizobium* from root nodules. *Journal of microbiological methods*, 9(1), 29-33.
- Beebe, S. E., Rao, I. M., Blair, M. W., & Acosta-Gallegos, J. A. (2013). Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in physiology*, 4, 35.
- Benidire, L., Daoui, K., Fatemi, Z. A., Achouak, W., Bouarab, L., & Oufdou, K. (2015). Effet du stress salin sur la germination et le développement des plantules de *Vicia faba* L. (Effect of salt stress on germination and seedling of *Vicia faba* L.). *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(3), 840-851.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, 84(1), 188-198.
- Berner, R. A. (2006). Geological nitrogen cycle and atmospheric N₂ over Phanerozoic time. *Geology*, 34(5), 413-415.
- 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.
- Bhargava, Y., Murthy, J. S. R., Kumar, T. 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*, 6(1), 1-12.

- Bhargava, Y., Murthy, J. S. R., Kumar, T. 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*, 6(1), 1-12.
- Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., & Sharma, K. K. (2008). Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant cell reports*, 27, 411-424.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350.
- Bogino, P., Banchio, E., Rinaudi, L., Cerioni, G., Bonfiglio, C., & Giordano, W. (2006). Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. in soils of Argentina. *Annals of applied biology*, 148(3), 207-212.
- Bogino, P., Banchio, E., Rinaudi, L., Cerioni, G., Bonfiglio, C., & Giordano, W. (2006). Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. in soils of Argentina. *Annals of applied biology*, 148(3), 207-212.
- Booth, C. (1971). *The genus Fusarium*. Kew, UK, Commonwealth Mycological Institute..
- Borucki, W., & Sujkowska, M. (2008). The effects of sodium chloride-salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 293-301.
- Boyd, S. R. (2001). Nitrogen in future biosphere studies. *Chemical Geology*, 176(1-4), 1-30.
- Brewin, N. J. (2004). Plant cell wall remodelling in the Rhizobium-legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(4), 293-316.
- Brito, S. L., Santos, A. B., Barbosa, D. D., Fernandes, P. D., Fernandes Júnior, P. I., & de LIMA, L. M. (2019). *Bradyrhizobium* spp. as attenuators of water deficit stress in runner peanut genotypes based on physiological and gene expression responses.
- Brockwell, J., Bottomley, P. J., & Thies, J. E. (1995). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. In *Management of Biological Nitrogen Fixation for the Development of More Productive and Sustainable Agricultural Systems: Extended versions of papers presented at the Symposium on Biological Nitrogen Fixation for Sustainable Agriculture at the 15th Congress of Soil Science, Acapulco, Mexico, 1994* (pp. 143-180). Springer Netherlands.
- Bromfield, E. S., Tambong, J. T., Cloutier, S., Prévost, D., Laguerre, G., Van Berkum, P., ... & Barran, L. R. (2010). Ensifer, Phyllobacterium and Rhizobium species occupy nodules of *Medicago sativa* (alfalfa) and *Melilotus alba* (sweet clover) grown at a Canadian site without a history of cultivation. *Microbiology*, 156(2), 505-520.
- Buyer, J. S., Sikora, L. J., & Chaney, R. L. (1989). A new growth medium for the study of siderophore-mediated interactions. *Biology and fertility of soils*, 8, 97-101.
- Catroux, G., Hartmann, A., & Revellin, C. (2001). Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and soil*, 230(1), 21-30.
- Cavassim, M. I. A., Moeskjær, S., Moslemi, C., Fields, B., Bachmann, A., Vilhjálmsson, B. J., ... & Andersen, S. U. (2020). Symbiosis genes show a unique pattern of introgression and selection within a *Rhizobium leguminosarum* species complex. *Microbial genomics*, 6(4).
- Chaintreuil, C., Giraud, E., Prin, Y., Lorquin, J., Bâ, A., Gillis, M., ... & Dreyfus, B. (2000). Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5437-5447.
- Chaintreuil, C., Rivallan, R., Bertoli, D. J., Klopp, C., Gouzy, J., Courtois, B., ... & Arrighi, J. F. (2016). A gene-based map of the Nod factor-independent *Aeschynomene evenia* sheds new light on the evolution of nodulation and legume genomes. *DNA Research*, 23(4), 365-376.

- Chandra, S., Choure, K., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2007). Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 124-130.
- Chang, M. S., Hung, L. J., Kloks, T., & Peng, S. L. (2011). Block-graph width. *Theoretical Computer Science*, 412(23), 2496-2502.
- Channya, F. K., & Asama, P. (2019). Control of Fungal Pathogens of Postharvest Rot of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using Aqueous and Ethanol Root Extracts of Mahogany (*Khaya senegalensis*) in Hong Local Government Area of Adamawa State Nigeria. *International Journal of Sciences*, 5(01), 48–54. <https://doi.org/10.18483/ijsci.1851>
- Chen, J. Y., Gu, J., Wang, E. T., Ma, X. X., Kang, S. T., Huang, L. Z., ... & Wu, Y. L. (2014). Wild peanut *Arachis duranensis* are nodulated by diverse and novel *Bradyrhizobium* species in acid soils. *Systematic and applied microbiology*, 37(7), 525-532.
- Chen, J., Hu, M., Ma, H., Wang, Y., Wang, E. T., Zhou, Z., & Gu, J. (2016). Genetic diversity and distribution of bradyrhizobia nodulating peanut in acid-neutral soils in Guangdong Province. *Systematic and applied microbiology*, 39(6), 418-427.
- Chi, F., Yang, P., Han, F., Jing, Y., & Shen, S. (2010). Proteomic analysis of rice seedlings infected by *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Proteomics*, 10(9), 1861-1874.
- Coba Peña, T., El-Akhal, M. R., Rincón, A., Lucas, M. M., Barrijal, S., & Pueyo, J. J. (2012). Response of three varieties of groundnut (*Arachis hypogaea*) to rhizobia inoculation and saline stress [Conference poster]. IV Jornadas de la AEL-V Seminario de Judía, Ponte.
- Cole, M. A., & Elkan, G. H. (1973). Transmissible resistance to penicillin G, neomycin, and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4(3), 248-253.
- Coletto, I., Pineda, M., Rodiño, A. P., De Ron, A. M., & Alamillo, J. M. (2014). Comparison of inhibition of N₂ fixation and ureide accumulation under water deficit in four common bean genotypes of contrasting drought tolerance. *Annals of Botany*, 113(6), 1071-1082.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 4951-4959. doi: 10.1128/AEM.71.9.4951-4959.
- Corby, H. D. L. (1988). Types of rhizobial nodules and their distribution among the Leguminosae. *Kirkia*, 53-123.
- Cordovilla, M. D. P., Ligeró, F., & Lluch, C. (1999). Effects of NaCl on growth and nitrogen fixation and assimilation of inoculated and KNO₃ fertilized *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. plants. *Plant science*, 140(2), 127-136.
- Cordovilla, M. P., Ligeró, F., & Lluch, C. (1994). The effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany*, 45(10), 1483-1488.
- Costa, J. L., Paulsrud, P., & Lindblad, P. (1999). Cyanobiont diversity within coralloid roots of selected cycad species. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(1), 85-91.
- Dakora, F. D., & Phillips, D. A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Food security in nutrient-stressed environments: exploiting plants' genetic capabilities*, 201-213.
- Dardanelli, M. S., González, P. S., Medeot, D. B., Paulucci, N. S., Bueno, M. Á., & Garcia, M. B. (2009). Effects of peanut rhizobia on the growth and symbiotic performance of *Arachis hypogaea* under abiotic stress. *Symbiosis*, 47, 175-180.

- Dardanelli, M., Angelini, J., & Fabra, A. (2003). A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. *Canadian journal of microbiology*, 49(6), 399-405.
- Daroanelli, M. S., Woelke, M. R., Gonzalez, P. S., Bueno, M. A., & Ghittoni, N. E. (1997). The effects of nonionic hyperosmolarity and of high temperature on cell-associated low molecular weight saccharides from two peanut rhizobia strains. *Symbiosis*.
- Das, K., Prasanna, R., & Saxena, A. K. (2017). Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiologica*, 62(5), 425–435. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0513-z>
- Date, R. A. (2000). Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. *Field Crops Research*, 65(2-3), 123-136.
- de Jesus Moraes, N., da Costa Neto, V. P., de Araújo, A. S. F., Figueiredo, M. D. V. B., Bonifacio, A., & Rodrigues, A. C. (2016). Bradyrhizobium sp. inoculation ameliorates oxidative protection in cowpea subjected to long-term composted tannery sludge amendment. *European Journal of Soil Biology*, 76, 35-45.
- 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.
- de Melo, E. B. S., de Lima, L. M., Fernandes-Júnior, P. I., de Tarso Aldar, S., Freire, M. A. O., Freire, R. M. M., & dos Santos, R. C. (2016). Nodulation, gas exchanges and production of peanut cultivated with Bradyrhizobium in soils with different textures. *Comunicata Scientiae*, 7(2), 160-166. DOI: 10.14295/CS.v7i2.1449
- Degefu, T., Wolde-meskel, E., Ataro, Z., Fikre, A., Amede, T., & Ojiewo, C. O. (2018). Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) growing in Ethiopia are nodulated by diverse rhizobia. *African Journal of Microbiology Research*, 12(9), 200-217.
- Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Menna, P., Bangel, E. V., & Hungria, M. (2012). Multilocus sequence analysis (MLSA) of Bradyrhizobium strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 698-710.
- Delaux, P. M., Radhakrishnan, G., & Oldroyd, G. (2015). Tracing the evolutionary path to nitrogen-fixing crops. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 95-99.
- Delgado, M. J., Garrido, J. M., Ligerio, 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.
- Delgado, M. J., Ligerio, F., & Lluch, C. L. (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.
- Den Herder, G., & Parniske, M. (2009). The unbearable naivety of legumes in symbiosis. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 491-499.
- Deshwal, V. K., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2003). Isolation of plant growth-promoting strains of Bradyrhizobium (*Arachis*) sp. with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. *Current Science*, 443-448.
- Dhingra, O. D., & Sinclair, J. B. (1978). Biology and pathology of *M. phaseolina*. Universidade Federal de Vicosa, Brazil.
- Díaz-Valle, A., López-Calleja, A. C., & Alvarez-Venegas, R. (2019). Enhancement of pathogen resistance in common bean plants by inoculation with *Rhizobium etli*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1317.

- Dita, M. A., Risipail, N., Prats, E., Rubiales, D., & Singh, K. B. (2006). Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica*, 147, 1-24.
- Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 621-631.
- Dodd, I. C., & Perez-Alfocea, F. (2012). Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of experimental botany*, 63(9), 3415-3428.
- 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. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1625.
- Duan, J., Müller, K. M., Charles, T. C., Vesely, S., & Glick, B. R. (2009). 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from southern Saskatchewan. *Microbial ecology*, 57, 423-436.
- Dubey, R. S., & Singh, A. K. (1999). Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolising enzymes in rice plants. *Biologia Plantarum*, 42, 233-239.
- Duhoux, E., & Nicole, M. (2004). Biologie végétale. *Association et interaction chez les plantes*. Ed. dunod, 93, 18-80.
- Eaglesham, A. R. J., & Ayanaba, A. (1984). Tropical stress ecology of rhizobia, root nodulation and legume fixation. *Current developments in biological nitrogen fixation/edited by NS Subba Rao*.
- El-Akhal, M. R., Rincón, A., Arenal, F., Lucas, M. M., El Mourabit, N., Barrijal, S., & Pueyo, J. J. (2008). Genetic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial isolates obtained from nodules of Arachis hypogaea in northwestern Morocco. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2911-2914.
- El-Akhal, M. R., Rincón, A., Coba De La Peña, T., Lucas, M. M., El Mourabit, N., Barrijal, S., et al. (2013). Effects of salt stress and rhizobial inoculation on growth and nitrogen fixation of three peanut cultivars. *Plant Biol.* 15, 415–421. doi: 10.1111/j.1438-8677.2012.00634.x
- El-Akhal, M. R., Rincon, A., Mourabit, N. E., Pueyo, J. J., & Barrijal, S. (2009). Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of peanut (Arachis hypogaea L.) grown in Moroccan soils. *Journal of basic microbiology*, 49(5), 415-425.
- Eliopoulos, G. M., Meka, V. G., & Gold, H. S. (2004). Antimicrobial resistance to linezolid. *Clinical Infectious Diseases*, 39(7), 1010-1015.
- Elowad, H. O., & Hall, A. E. (1987). Influences of early and late nitrogen fertilization on yield and nitrogen fixation of cowpea under well-watered and dry field conditions. *Field Crops Research*, 15(3-4), 229-244.
- Elsheikh, E. A. 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.
- El-Sherbeny, T. M. S., Mousa, A. M., & Zhuran, M. A. (2023). Response of peanut (Arachis hypogaea L.) plant to bio-fertilizer and plant residues in sandy soil. *Environmental Geochemistry and Health*, 45(2), 253-265.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., & Xie, Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The scientific world journal*, 2015.
- Erisman, J. W., Galloway, J. N., Seitzinger, S., Bleeker, A., & Nancy, B. Dise, AM Roxana Petrescu, Allison M. Leach, and Wim de Vries. 2013." Consequences of human modification of the global nitrogen cycle." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 368, 1621.

- Erisman, J. W., Sutton, M. A., Galloway, J., Klimont, Z., & Winiwarter, W. (2008). How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature geoscience*, 1(10), 636-639.
- Erkilic, A., Guven, B. and Akgul, D. S. (2006). Effects of some plant activators and plant materials on stem rot disease of peanut and pepper caused by *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Turkish Phytopathology*, 35(1-3), 15-28.
- Essalmani, H., & Lahlou, H. (2002). Etude in vitro de l'activité antagoniste de quelques microorganismes à l'encontre de *Fusarium oxysporum* f. sp. lentis. *Cryptogamie, Mycol*, 23, 221-234.
- Essalmani, H., & Lahlou, H. (2002). Etude in vitro de l'activité antagoniste de quelques microorganismes à l'encontre de *Fusarium oxysporum* f. sp. lentis. *Cryptogamie, Mycol*, 23, 221-234.
- Estevez de Jensen, C., Percich, J., & Graham, P. (2002). Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. *Field Crops Research*, 74(2-3), 107-115. [https://doi.org/10.1016/s0378-4290\(01\)00200-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4290(01)00200-3).
- Evans, J., Barnet, Y. M., & Vincent, J. M. (1979). Effect of a bacteriophage on colonisation and nodulation of clover roots by paired strains of *Rhizobium trifolii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 25(9), 974-978.
- Faghire, M., Bargaz, A., Farissi, M., Palma, F., Mandri, B., Lluch, C., ... & Ghoulam, C. (2011). Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55, 69-75.
- Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., ... & Huang, J. (2015). Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 4907-4921.
- Fan, D., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2020). Plant endophytes promote growth and alleviate salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific reports*, 10(1), 12740. doi: 10.1038/s41598-020-69713-5
- Fan, Y., Wang, X., Li, H., Liu, S., Jin, L., Lyu, Y., ... & Lyu, S. (2020). Anthocyanin, a novel and user-friendly reporter for convenient, non-destructive, low cost, directly visual selection of transgenic hairy roots in the study of rhizobia-legume symbiosis. *Plant Methods*, 16, 1-8.
- FAO (Food and Agricultural Organization)., Data., 2018 <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed on June 25, 2019
- FAOSTAT, F. (2010). Disponível em:< <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acessado em setembro.
- FAOSTAT, F. (2011). Agricultural Organization of the United Nations. 2009. ResourceSTAT-Land (updated September 2010).Unter: <http://faostat.fao.org>, 5.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. S. M. A., Fujita, D. B. S. M. A., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable agriculture*, 153-188.
- Fenta, B. A., Beebe, S. E., Kunert, K. J., Burrridge, J. D., Barlow, K. M., Lynch, J. P., & Foyer, C. H. (2014). Field phenotyping of soybean roots for drought stress tolerance. *Agronomy*, 4(3), 418-435.
- Ferguson, M. E., Jarvis, A., Stalker, H. T., Williams, D. E., Guarino, L., Valls, J. F., ... & Bramel, P. J. (2005). Biogeography of wild *Arachis* (Leguminosae): distribution and environmental characterisation. *Biodiversity & Conservation*, 14, 1777-1798.
- Fernandes-Júnior, P. I., Aidar, S. D. T., Morgante, C. V., Gava, C. A. T., Zilli, J. É., Souza, L. S. B. D., ... & Martins, L. M. V. (2015). The resurrection plant *Tripogon spicatus* (Poaceae) harbors

a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern Brazilian Caatinga. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 39, 993-1002.

Fernández-López, M., Goormachtig, S., Gao, M., D'Haese, W., Van Montagu, M., & Holsters, M. (1998). Ethylene-mediated phenotypic plasticity in root nodule development on *Sesbania rostrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(21), 12724-12728.

Figueiredo, M. V. B., Burity, H. A., De França, F. P., & Vilar, J. J. (1998). Soil-water stress response in cowpea at different development stages of N₂ fixation. *AGROCHIMICA-PISA*-, 42, 200-207.

Filtenborg, O., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International journal of food microbiology*, 33(1), 85-102.

Florentino, L. A., Sousa, P. M. D., Silva, J. S., Silva, K. B., & Moreira, F. M. D. S. (2010). Diversity and efficiency of Bradyrhizobium strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34, 1113-1123.

Foko, J. (1987). *La mycoflore des plantes vivrières au Cameroun et en particulier contribution à l'étude de leur spermo flore* (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences naturelles. Université de Yaoundé).

Ford, S., Moeskjær, S., Young, P., Santamaría, R. I., & Harrison, E. (2021). Introducing a novel, broad host range temperate phage family infecting *Rhizobium leguminosarum* and beyond. *Frontiers in Microbiology*, 3375.

Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., ... & Voss, M. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130164.

Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants.

Fred, E. B., Baldwin, I. L., & McCoy, E. (2002). *Root nodule bacteria and leguminous plants* (No. 5). UW-Madison Libraries Parallel Press.

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. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 1104-1109.

Fukami, J., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2017). Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*, 7, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>

Furlan, A. L., Bianucci, E., Castro, S., & Dietz, K. J. (2017). Metabolic features involved in drought stress tolerance mechanisms in peanut nodules and their contribution to biological nitrogen fixation. *Plant Science*, 263, 12-22.

Furlan, A. L., Bianucci, E., del Carmen Tordable, M., Castro, S., & Dietz, K. J. (2014). Antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in peanut nodules during a drought and rehydration cycle. *Functional Plant Biology*, 41(7), 704-713.

Furuta Okazaki, S., Tittabutr, P., Teulet, A., Thouin, J., Fardoux, J., Chaintreuil, C., ... & Giraud, E. (2016). Rhizobium-legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *The ISME journal*, 10(1), 64-74.

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.

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.

- Ganesan, S., Ganesh Kuppusamy, R., & Sekar, R. (2007). Integrated Management of Stem Rot Disease (*Sclerotium rolfsii*) of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Using *Rhizobium* and *Trichoderma harzianum* (ITCC - 4572). *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY*, 31(2), 103–108.
- Garland, J. L., & Mills, A. L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and environmental microbiology*, 57(8), 2351-2359.
- Gauthier-Coles, C., White, R. G., and Mathesius, U. (2019). Nodulating legumes are distinguished by a sensitivity to cytokinin in the root cortex leading to pseudonodule development. *Front. Plant Sci.* 9:1901. doi: 10.3389/fpls.2018.01901
- Georgiev, G. I., & Atkins, C. A. (1993). Effects of salinity on N₂ fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules. *Symbiosis*.
- Ghasemi, M., Mousanejad, S., & Mehdipour Moghaddam, M. J. (2017). Efficacy of peanut root nodulating symbiotic bacteria in controlling white stem rot. *Journal of Crop Protection*, 6(2), 191-205.
- Gibson, K. E., Kobayashi, H., & Walker, G. C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual review of genetics*, 42, 413-441.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., ... & Sadowsky, M. (2007). Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*, 316(5829), 1307-1312.
- Glenn, A. R., & Dilworth, M. J. (1994). The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiology Letters*, 123(1-2), 1-9.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications.
- González, E. M., Larrainzar, E., Marino, D., Wienkoop, S., Gil-Quintana, E., & Arrese-Igor, C. (2015). Physiological responses of N₂-fixing legumes to water limitation. *Legume Nitrogen Fixation in a Changing Environment: Achievements and Challenges*, 5-33.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 5, 355-377.
- Gopalkrishnan, S., Srinivas, V., Vemula, A., Samineni, S. & Rathore, A. (2018). Influence of diazotrophic bacteria on nodulation, nitrogen fixation, growth promotion and yield traits in five cultivars of chickpea. *Biocatal. Agric. Biotech.*, 15, 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.bab.2018.05.006>.
- Graham, P. H. (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 475-484.
- Graham, P. H. (2008). Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*, 23-58.
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131(3), 872-877.
- Gregory, W. C., & Gregory, M. P. (1976). Groundnut: *Arachis hypogaea* (Leguminosae-Papilionatae). *Evolution of Crop Plants*. NW Simmonds, ed.
- Gregory, W. C., Krapovickas, A., & Gregory, M. P. (1980). Structure, variation, evolution, and classification in *Arachis*. *Structure, variation, evolution, and classification in Arachis.*, 469-481.
- Grönemeyer, J. L., Hurek, T., Bünger, W., & Reinhold-Hurek, B. (2016). *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(1), 62-69.

- Grönemeyer, J. L., Kulkarni, A., Berkelmann, D., Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. (2014). Rhizobia indigenous to the Okavango region in Sub-Saharan Africa: diversity, adaptations, and host specificity. *Applied and environmental microbiology*, 80(23), 7244-7257.
- Grönemeyer, J.L., Hurek, T., Bünger, W., Reinhold-Hurek, B., 2016. *Bradyrhizobium vignae* sp. nov.: a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 62–69.
- Gualtieri, G., and Bisseling, T. (2000). The evolution of nodulation. *Plant molecular biology* 42,181-194.
- Guha, S., Molla, F., Sarkar, M., Ibañez, F., Fabra, A., & DasGupta, M. (2022). Nod factor-independent ‘crack-entry’ symbiosis in dalbergoid legume *Arachis hypogaea*. *Environmental Microbiology*.
- Guha, S., Sarkar, M., Ganguly, P., Uddin, M. R., Mandal, S., & DasGupta, M. (2016). Segregation of nod-containing and nod-deficient bradyrhizobia as endosymbionts of *Arachis hypogaea* and as endophytes of *Oryza sativa* in intercropped fields of Bengal Basin, India. *Environmental Microbiology*, 18(8), 2575-2590.
- Gururani, M. A., Upadhyaya, C. P., Baskar, V., Venkatesh, J., Nookaraju, A., & Park, S. W. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of plant growth regulation*, 32, 245-258.
- Hafeez, F. Y., Shah, N. H., & Malik, K. A. (2000). Field evaluation of lentil cultivars inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains for nitrogen fixation using nitrogen-15 isotope dilution. *Biology and Fertility of Soils*, 31, 65-69.
- Hall, A. E. (2012). Phenotyping cowpeas for adaptation to drought. *Frontiers in physiology*, 3, 155.
- Haris, C. (1989). Introduction to modern microbiology black wall scientific publication, 179.
- Harrison E., Brockhurst M. A. (2017). Ecological and evolutionary benefits of temperate phage: what does or doesn't kill you makes you stronger. *Bioessays* 39:1700112. 10.1002/bies.201700112
- Hashem, F. M., & Angle, J. S. (1988). Rhizobiophage effects on *Bradyrhizobium japonicum*, nodulation and soybean growth. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(1), 69-73.
- Hekimian Lethève, C., & al. (2009). Les plantes oléagineuses. Dans *Mémento de l'agronome* (p. 879-927). Paris: Ed. Quae ; GRET
- Hellsten, S., Dalgaard, T., Rankinen, K., & Tørseth, K. (2017). *Nordic nitrogen and agriculture: Policy, measures and recommendations to reduce environmental impact*. Nordic Council of Ministers.
- Hellweg, C., Pühler, A., & Weidner, S. (2009). The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti*1021 following a shift to acidic pH. *BMC microbiology*, 9(1), 1-16.
- Herselman, L. (2003). Genetic variation among Southern African cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes as revealed by AFLP analysis. *Euphytica*, 133(3), 319-327.
- Hirich, A., El Omari, H., Jacobsen, S. E., Lamaddalena, N., Hamdy, A., Ragab, R., ... & Choukr-Allah, R. (2014). Chickpea (*Cicer arietinum* L.) physiological, chemical and growth responses to irrigation with saline water. *Australian Journal of Crop Science*, 8(5), 646-654.
- Hirsch, A. M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122(2), 211-237.
- Holloway, J. M., & Dahlgren, R. A. (2002). Nitrogen in rock: occurrences and biogeochemical implications. *Global biogeochemical cycles*, 16(4), 65-1.

- Hoque, S., Sultana, N., Faruq, A. N., Bhuiyan, M. Z. R., & Islam, N. (2015c). In-vitro evaluation of selected bio-control agents against foot and root rot pathogens of lentil. *Scholarly Journal of Agricultural Science*, 5(1), 8–15. <https://scholarly-journals.com>.
- Hoque, S., Sultana, N., Faruq, A. N., Bhuiyan, M. Z. R., & Islam, N. (2015c). In-vitro evaluation of selected bio-control agents against foot and root rot pathogens of lentil. *Scholarly Journal of Agricultural Science*, 5(1), 8–15. <https://scholarly-journals.com>.
- Hossain, A., Gunri, S. K., Barman, M., Sabagh, A. E., & da Silva, J. A. T. (2019). Isolation, characterization and purification of Rhizobium strain to enrich the productivity of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Open Agriculture*, 4(1), 400-409.
- Hossain, Z. Komatsu S (2014b) Soybean proteomics. *Methods Mol Biol*, 1072, 315-331.
- Hossain, Z., & Komatsu, S. (2014a). Potentiality of soybean proteomics in untying the mechanism of flood and drought stress tolerance. *Proteomes*, 2(1), 107-127.
- Houlton, B. Z., Morford, S. L., & Dahlgren, R. A. (2018). Convergent evidence for widespread rock nitrogen sources in Earth's surface environment. *Science*, 360(6384), 58-62.
- Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. (2016). *Working with rhizobia*. Canberra, Australia: Australian centre for international agricultural research.
- Huang, H. C., Lee, C. L., Lai, C. H., Fang, M. D., & Lai, I. C. (2012). Transboundary movement of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Kuroshio Sphere of the western Pacific Ocean. *Atmospheric environment*, 54, 470-479.
- 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)
- Hungria, M., de O Chueire, L. M., Coca, R. G., & Megías, M. (2001). Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(10), 1349-1361.
- Hungria, M., Loureiro, M. F., Mendes, I. C., Campo, R. J., & Graham, P. H. (2005). Inoculant preparation, production and application. *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment*, 223-253.
- Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Asghar, H. N., & Asgher, M. (2014). Can catalase and exopolysaccharides producing rhizobia ameliorate drought stress in wheat. *Int J Agric Biol*, 16(1), 3-13.
- Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Asghar, H. N., & Mahmood, S. (2014). Scrutinizing rhizobia to rescue maize growth under reduced water conditions. *Soil Science Society of America Journal*, 78(2), 538-545.
- Hussain, S., Ghaffar, A., & Aslam, M. (1990). Biological Control of Macrophomina phaseolina Charcoal Rot of Sunflower and Mung Bean. *Journal of Phytopathology*, 130(2), 157–160. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1990.tb01163.x>
- Ibáñez, F., & Fabra, A. (2011). *Rhizobial Nod factors are required for cortical cell division in the nodule morphogenetic programme of the Aeschynomeneae legume Arachis*. *Plant Biology*, 13(5), 794–800. doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00439.x
- Idris, H. A., Labuschagne, N., & Korsten, L. (2007). Screening rhizobacteria for biological control of Fusarium root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control*, 40(1), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.07.017>
- Igiehon, N.O., Babalola, O.O. & Aremu, B.R. (2019). Genomic insights into plant growth promoting rhizobia capable of enhancing soybean germination under drought

- Inam-ul-Haq, M., Javed, N., Ahmad, R., & Rehman, A. (2003). Evaluation of different strains of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. *Plant Pathology Journal*.
- Isaksen, I. S., Granier, C., Myhre, G., Berntsen, T. K., Dalsøren, S. B., Gauss, M., ... & Wuebbles, D. (2009). Atmospheric composition change: Climate–Chemistry interactions. *Atmospheric Environment*, 43(33), 5138-5192.
- Islam, M. S., Fahad, S., Hossain, A., Chowdhury, M. K., Iqbal, M. A., Dubey, A., ... & Sabagh, A. E. (2021). Legumes under drought stress: plant responses, adaptive mechanisms, and management strategies in relation to nitrogen fixation. In *Engineering tolerance in crop plants against abiotic stress* (pp. 179-207). CRC Press.
- Jaiswal, S. K., & Dhar, B. (2011). Identification and assessment of symbiotic effectiveness of phage-typed *Rhizobium leguminosarum* strains on lentil (*Lens culinaris* Medik) cultivars. *Current microbiology*, 62, 1503-1509.
- Jaiswal, S. K., Anand, A., Dhar, B., & Vaishampayan, A. (2012). Genotypic characterization of phage-typed indigenous soybean bradyrhizobia and their host range symbiotic effectiveness. *Microbial ecology*, 63, 116-126.
- Jaiswal, S. K., Mohammed, M., Ibny, F. Y., & Dakora, F. D. (2021). Rhizobia as a source of plant growth-promoting molecules: Potential applications and possible operational mechanisms. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 619676.
- Jaiswal, S. K., Naamala, J., and Dakora, F. D. (2018). Nature and mechanisms of aluminium toxicity, tolerance and amelioration in symbiotic legumes and rhizobia. *Biol. Fertil. Soils* 54, 1–10. doi: 10.1007/s00374-018-1262-0
- Janczarek, M., Rachwał, K., Cieśła, J., Ginalska, G., & Bieganski, A. (2015). Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in bacterial attachment and surface properties. *Plant and soil*, 388, 211-227.
- Jarvis, A., Ferguson, M. E., Williams, D. E., Guarino, L., Jones, P. G., Stalker, H. T., ... & Bramel, P. (2003). Biogeography of wild *Arachis*: assessing conservation status and setting future priorities. *Crop Science*, 43(3), 1100-1108.
- Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., & Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), 895-898.
- Jha, Y., Subramanian, R. B., & Patel, S. (2011). Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oryza sativa* shows higher accumulation of osmoprotectant against saline stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 797-802.
- Ji, X., Shen, Q., Liu, F., Ma, J., Xu, G., Wang, Y., & Wu, M. (2012). Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China. *Journal of hazardous materials*, 235, 178-185.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., & Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 619-633.
- Jordan DC (1984). Family III. Rhizobiaceae Berge's an S st. *Bacteriol.* 1:234-242
- Jordan, D. C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32(1), 136-139.
- Jordan, D. C. (1984). Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1, 234-244.

- Jovino, R. S., da Silva, T. R., Rodrigues, R. T., de Sá Carvalho, J. R., Cunha, J. B. D. A., de Lima, L. M., ... & Fernandes-Júnior, P. I. (2022). Elite Bradyrhizobium strains boost biological nitrogen fixation and peanut yield in tropical drylands. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(3), 1623-1632.
- Junior, M. D. A. L., Lima, A. S. T., Arruda, J. R. F., & Smith, D. L. (2005). Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(2), 235-239.
- Kabir, R., Yeasmin, S., Islam, A. K. M. M., & Sarkar, M. R. (2013). Effect of phosphorus, calcium and boron on the growth and yield of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *International Journal of Bio-science and bio-Technology*, 5(3), 51-60.
- Kannan, K., Shibinaya, N., & Umamaheswari, M. (2019). Control of Fusarium wilt disease in cowpea plant (*Vigna Unguiculata* L.). using secondary metabolites produced in *Bradyrhizobium japonicum*. *Kongunadu Res J*, 6, 28-36.
- Kanouni, L., Larous, L., & Mezaache-Aichour, S. (2018). Inhibitory Effect of Rhizobia Isolated from Several Leguminous against Phytopathogenic Fungi. *Annual Research & Review in Biology*, 22(6), 1–16. <https://doi.org/10.9734/arrb/2018/38161>
- Karanja, N. K., & Wood, M. (1988). Selecting Rhizobium phaseoli strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: tolerance of high temperature and antibiotic resistance. *Plant and Soil*, 112, 15-22.
- Kavamura, V. N., Santos, S. N., da Silva, J. L., Parma, M. M., Ávila, L. A., Visconti, A., ... & de Melo, I. S. (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological research*, 168(4), 183-191.
- Kavi Kishor PB, Venkatesh K, Amareshwari P, Hima Kumari P, Punita DL, Anil Kumar S, et al. 2018. Genetic engineering for salt and drought stress tolerance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Indian J. Plant Physiol.* 23: 647- 652.
- Kaye, J. P., & Hart, S. C. (1997). Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(4), 139-143.
- Keneni, A., Assefa, F., & Prabu, P. C. (2010). Characterization of acid and salt tolerant rhizobial strains isolated from faba bean fields of Wollo, Northern Ethiopia.
- Khaitov, B., Kurbonov, A., Abdiev, A., & Adilov, M. (2016). Effect of chickpea in association with Rhizobium to crop productivity and soil fertility. *Eurasian Journal of Soil Science*, 5(2), 105-112.
- Khalid, R., Zhang, X.X., Hayat, R. & Ahmed, M. (2020). Molecular characteristics of rhizobia isolated from *Arachis hypogaea* grown under stress environment. *Sustainability*, 12(15), 6259. <https://doi.org/10.3390/su12156259>
- Khalifa, M. M. A., Abou-Zeid, M. Y., & Nashwa, A. H. F. (2013). Performance of fungicides application and rhizobium inoculation for controlling peanut soil born diseases and their effects on nodulation status and some enzyme activities. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(4), 2750-2766.
- Khan, A., Khan Khalil, S., Zaman Khan, A., Bahader Marwat, K., & Afzal, A. (2007). The role of seed priming in semi-arid area for mung bean phenology and yield. *Pakistan Journal of Botany*, 40(6), 2471–2480. <http://www.pakbs.org>
- Khan, A., Khan, S., Khan, M. A., Qamar, Z., & Waqas, M. (2015). The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. *Environmental science and pollution research*, 22, 13772-13799.

- Khan, K., Agarwal, P., Shanware, A., & Sane, V. A. (2015). Heterologous expression of two *Jatropha* aquaporins imparts drought and salt tolerance and improves seed viability in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *PloS one*, 10(6), e0128866. doi:10. 1371/journal.pone.0128866
- Khan, M. S. A., Karim, M. A., & Haque, M. M. (2014). Genotypic differences in growth and ions accumulation in soybean under NaCl salinity and water stress conditions. *Bangladesh Agronomy Journal*, 17(1), 47-58.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73-98.
- Khan, N. F., Rasool, A., Mansoor, S., Saleem, S., Baba, T. R., Haq, S. M., ... & Popesc, S. M. (2022). Potential applications of Rhizobacteria as eco-friendly biological control, plant growth promotion and soil metal bioremediation. *Sustainable Crop Production Recent Advances*, 104-170.
- Kishinevsky, B. D., Sen, D., & Weaver, R. W. (1992). Effect of high root temperature on *Bradyrhizobium*-peanut symbiosis. *Plant and soil*, 143, 275-282.
- Kishinevsky, B.D.; Sen, D.; Weaver, R.W. Effect of high root temperature on *Bradyrhizobium*-peanut symbiosis. *Plant Soil* 1992, 143, 275–282.
- Kittiwongwattana, C., & Thawai, C. (2014). *Rhizobium lemnae* sp. nov., a bacterial endophyte of *Lemna aequinoctialis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt_7), 2455-2460.
- Kobayashi, N., Nishino, K., & Yamaguchi, A. (2001). Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 183(19), 5639-5644.
- Kochert, G., Stalker, H. T., Gimenes, M., Galgaro, L., Lopes, C. R., & Moore, K. (1996). RFLP AND CYTOGENETIC EVIDENCE ON THE ORIGIN AND EVOLUTION OF ALLOTETRAPLOID DOMESTICATED peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 83(10), 1282–1291. doi:10.1002/j.1537-2197.1996.tb13912.x
- Kraïmat, M. (2018). Réponses adaptatives de quelques populations d'arachide locales (*Arachis hypogaea* L.) à la déficience en phosphore: Approche agro-morphologique et physiologique. Thèse Doctorat, UKM Ouargla.
- Krapovickas, A., & Gregory, W. C. (1994). TAXONOMIA DEL GENERO" ARACHIS (LEGUMINOSAE)". *Bonplandia*, 1-186.
- Kucho, K. I., Hay, A. E., & Normand, P. (2010). The determinants of the actinorhizal symbiosis. *Microbes and Environments*, 25(4), 241-252.
- Kumar, N. R., Arasu, V. T., & Gunasekaran, P. (2002). Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. *Current Science*, 82(12), 1463–1466. Consulté sur <https://www.jstor.org/stable/24106182>
- Kumbhar, C., & Watve, M. (2013). Why antibiotics: A comparative evaluation of different hypotheses for the natural role of antibiotics and an evolutionary synthesis. *Natural Science*. 5(4A), 26-40
- Landa, B. B., Hervás, A., Bettiol, W., & Jiménez-Díaz, R. M. (1997). Antagonistic activity of Bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium Oxysporum* f. sp.Ciceris. *Phytoparasitica*, 25(4), 305–318. <https://doi.org/10.1007/bf02981094>
- Lanier, J. E., Jordan, D. L., Spears, J. F., Wells, R., & Johnson, P. D. (2005). Peanut response to inoculation and nitrogen fertilizer. *Agronomy journal*, 97(1), 79-84.
- Laurette, N. N., Maxémilienne, N. B., Henri, F., Souleymanou, A., Kamdem, K., Albert, N., ... & François-Xavier, E. (2015). Isolation and screening of indigenous Bambara groundnut (*Vigna*

- Subterranea) nodulating bacteria for their tolerance to some environmental stresses. *American Journal of Microbiological Research*, 3(2), 65-75.
- Lazali, M. (2009). *Etude de la symbiose à rhizobium chez l'arachide (Arachis hypogaea L.) cultivée sous contrainte hydrique—aspects morpho-physiologiques et agronomiques* Magister
- Lazali, M., Ounane, S. M., Chaker-Haddadj, A., Al Kama, N., & Nouar, S. (2013). Réponses Morpho-Physiologiques et Biochimiques de la Symbiose Rhizobia-Archide au Stress Hydrique. *Algerian Journal of Arid Environment*, 258(1624), 1-25.
- Lazali, M., Zaman-Allah, M., Amenc, L., Ounane, G., Abadie, J., & Drevon, J. J. (2013). A phytase gene is overexpressed in root nodules cortex of Phaseolus vulgaris–rhizobia symbiosis under phosphorus deficiency. *Planta*, 238, 317-324.
- Le, C. N., Mendes, R., Kruijt, M., & Raaijmakers, J. M. (2012). Genetic and Phenotypic Diversity of Sclerotium rolfsii in Groundnut Fields in Central Vietnam. *Plant Disease*, 96(3), 389–397. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-11-0468>
- Lebrazi, S., and Fikri-Benbrahim, K. (2018). “Rhizobium-legume symbioses: heavy metal effects and principal approaches for bioremediation of contaminated soil,” in *Legumes for Soil Health and Sustainable Management*, eds R. S. Meena, A. D. G. S. Yadav, and R. Lal (Singapore: Springer), 539. doi: 10.1007/978-981-13-0253-4
- Leigh, J. A., & Coplin, D. L. (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual review of microbiology*, 46(1), 307-346.
- Limpens, E., & Bisseling, T. (2003). Signaling in symbiosis. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 343-350.
- Lindström, K., Amsalu Aserse, A., & Mousavi, S. A. (2015). Evolution and taxonomy of nitrogen-fixing organisms with emphasis on rhizobia. *Biological nitrogen fixation*, 21-38.
- 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.
- Lipsanen, P., & Lindström, K. (1989). Lipopolysaccharide and protein patterns of Rhizobium sp.(Galega). *FEMS microbiology letters*, 58(2-3), 323-328.
- Liu, F., Andersen, M. N., & Jensen, C. R. (2003). Loss of pod set caused by drought stress is associated with water status and ABA content of reproductive structures in soybean. *Functional Plant Biology*, 30(3), 271-280.
- Loi, A., Nutt, B. J., Yates, R., & D'antuono, M. (2012, October). Summer sowing: a new alternative technique to introduce annual pasture legumes into mixed farming systems. In *Proceedings of 16th Australian Agronomy Conference* (pp. 14-18).
- Long, X., Huang, Z., Zhang, Z., Li, Q., Zed, R., & Liu, Z. (2010). Seawater stress differentially affects germination, growth, photosynthesis, and ion concentration in genotypes of Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(2), 223-231
- Maatallah, J., Sanjuan, J., & Lluch, C. (2002). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (Cicer arietinum) growing in Moroccan soils. *Agronomie*, 22(3), 321-329.
- MacCracken, M. C. (2008). Prospects for future climate change and the reasons for early action. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 58(6), 735-786.
- Manchanda, G., & Garg, N. (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 595-618.
- Mandou, M. S., Chotangui, A. H., Nkot, L. N., & Nwaga, D. (2017). Effects of rhizobia inoculation and molybdenum application on nodulation, N uptake and yield of peanut (Arachis hypogaea L.). *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 11(1), 103-113.

- Mannai, S., Jabnoun-Khiareddine, H., Nasraoui, B., & Daami-Remadi, M. (2018). Rhizoctonia root rot of pepper (*Capsicum annuum*): Comparative pathogenicity of causal agent and biocontrol attempt using fungal and bacterial agents. *J. Plant Pathol. Microbiol*, 9(2), 431-439.
- Marsha, K. (1968). Interaction between colloidal montmorillonite and cells of rhizobium species with different ionogenic surfaces. *Biochimica et Biophysica Acta*, 156: 179–186.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G. M. L. M., & Mora, M. L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 293-319.
- Masson-Boivin, C., & Sachs, J. L. (2018). Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 7-15.
- Mathu, S., Herrmann, L., Pypers, P., Matiru, V., Mwirichia, R., & Lesueur, D. (2012). Potential of indigenous bradyrhizobia versus commercial inoculants to improve cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp.) and green gram (*Vigna radiata* L. wilczek.) yields in Kenya. *Soil science and plant nutrition*, 58(6), 750-763.
- Matse, D. T., Huang, C. H., Huang, Y. M., & Yen, M. Y. (2020). Effects of coinoculation of Rhizobium with plant growth promoting rhizobacteria on the nitrogen fixation and nutrient uptake of *Trifolium repens* in low phosphorus soil. *Journal of Plant Nutrition*, 43(5), 739-752.
- Mayeux, A. H. (2001). Dossier technique sur les normes de production de stockage et la distribution de semences d'arachide en milieu paysannal. Atelier de Formation-échange, Projet Germplasm Arachide (GAP).
- Mc Dermott, P. F., Walker, R. D., & White, D. G. (2003). Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *International journal of toxicology*, 22(2), 135-143.
- McManus, M. C. (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 54(12), 1420-1433.
- McRose, D. L., Zhang, X., Kraepiel, A. M., & Morel, F. M. (2017). Diversity and activity of alternative nitrogenases in sequenced genomes and coastal environments. *Frontiers in microbiology*, 8, 267.
- Medeot, D. B., Bueno, M. A., Dardanelli, M. S., & de Lema, M. G. (2007). Adaptational changes in lipids of Bradyrhizobium SEMIA 6144 nodulating peanut as a response to growth temperature and salinity. *Current microbiology*, 54, 31-35.
- Meena, H. N., Meena, M., & Yadav, R. S. (2016). Comparative performance of seed types on yield potential of peanut (*Arachis hypogaea* L.) under saline irrigation. *Field Crops Research*, 196, 305-310.
- Meguekam, T. L., Moualeu, D. P., Taffouo, V. D., & Stützel, H. (2021). Changes in plant growth, leaf relative water content and physiological traits in response to salt stress in peanut (*Arachis hypogaea* L.) varieties. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(1), 12049-12049.
- Mendum, T. A., Clark, I. M., & Hirsch, P. R. (2001). Characterization of two novel Rhizobium leguminosarum bacteriophages from a field release site of genetically-modified rhizobia. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 189-197.
- Menendez, E., Perez-Yepe, J., Hernandez, M., Rodriguez-Perez, A., Velazquez, E. & Leon-Barrios, M. (2020). Plant growth promotion abilities of phylogenetically diverse Mesorhizobium strains: Effect in the root colonization and development of tomato seedlings. *Microorganisms*, 8, 412. doi: 10.3390/microorganisms8030412.
- Meriem, B. B., Beddiar, A., & Bouzeraa, H. (2015). Effect of abiotic factors on the Sinozhizobium sp growth isolated from Medicago sativa cultivated on northeastern Algeria soils

- and the selection of the highly tolerant strains. *Advances in Environmental Biology*, 9(8), 103-115.
- Mhadhbi, H., Jebara, M., Zitoun, A., Limam, F., & Aouani, M. E. (2008). Symbiotic effectiveness and response to mannitol-mediated osmotic stress of various chickpea–rhizobia associations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1027-1035.
- Michiels, J., Verreth, C., & Vanderleyden, J. (1994). Effects of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains. *Applied and environmental microbiology*, 60(4), 1206-1212.
- Mirza, B.S.; Mirza, M.S.; Bano, A.; Malik, K.A. Coinoculation of chickpea with *Rhizobium* isolates from
- 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.
- Mohammad, D., & Hossain, I. (2003). Seed Treatment with Biofertilizer in Controlling Foot and Root Rot of Mungbean. *Plant Pathology Journal*, 2(2), 91–96.
<https://doi.org/10.3923/ppj.2003.91.96>
- Mohammadipanah, F., & Zamanzadeh, M. (2019). Bacterial mechanisms promoting the tolerance to drought stress in plants. *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and Applications*, 185-224.
- Mönchgesang, S., Strehmel, N., Schmidt, S., Westphal, L., Taruttis, F., Müller, E., ... & Scheel, D. (2016). Natural variation of root exudates in *Arabidopsis thaliana*-linking metabolomic and genomic data. *Scientific Reports*, 6(1), 29033.
- Montange, D., & Beunard, P. (1984). Croissance des rhizobiums dans le fermenteur IRAT. Survie dans les inoculums. *L'Agronomie tropicale* (1975), 39(2), 145-148.
- Montealegre, C. and J. Kipe-Nolt (1994). Ability of selected accessions of *Phaseolus vulgaris* L. to restrict nodulation by particular rhizobia. *Arch. Microbiol.* 162: 352-356.
- Morgante, C., Castro, S., & Fabra, A. (2007). Role of rhizobial EPS in the evasion of peanut defense response during the crack-entry infection process. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(5), 1222-1225.
- Moussaid, S., Dominguez-Ferreras, A., Munoz, S., Aurag, J., Berraho, E. B., & Sanjuan, J. (2015). Increased trehalose biosynthesis improves *Mesorhizobium ciceri* growth and symbiosis establishment in saline conditions. *Symbiosis*, 67, 103-111.
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., & Latorre, A. (2008). Learning how to live together: genomic insights into prokaryote–animal symbioses. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), 218-229.
- Mpepereki, S., Makonese, F., & Wollum, A. G. (1997). Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis*, 22(3), 275–292.
- Mpepereki, S., Wollum, A. G., & Makonese, F. (1996). Diversity in symbiotic specificity of cowpea rhizobia indigenous to Zimbabwean soils. *Plant and soil*, 186, 167-171.
- Msimbira L. A., Jaiswal S. K., Dakora F. D. (2016). Identification and characterization of phages parasitic on bradyrhizobia nodulating groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in South Africa. *Appl. Soil Ecol.* 108 334–340. [10.1016/j.apsoil.2016.09.010](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.09.010)
- Müller, C., & Clough, T. J. (2014). Advances in understanding nitrogen flows and transformations: gaps and research pathways. *The Journal of Agricultural Science*, 152(S1), 34-44.

- Munevar, F., & Wollum, A. G. (1981). Effect of high root temperature and Rhizobium strain on nodulation, nitrogen fixation, and growth of soybeans. *Soil Science Society of America Journal*, 45(6), 1113-1120.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
- Munoz, V., Ibanez, F., Tonelli, M. L., Valetti, L., Anzuay, M. S., & Fabra, A. (2011). Phenotypic and phylogenetic characterization of native peanut Bradyrhizobium isolates obtained from Córdoba, Argentina. *Systematic and applied microbiology*, 34(6), 446-452.
- Muriel, R. C. (1978). Some Observations on Infection of *Arachis hypogaea* L. by Rhizobium. *Journal of Experimental Botany*, 29(3), 749-755.
- Naamala, J., Jaiswal, S. K., & Dakora, F. D. (2016). Antibiotics resistance in Rhizobium: type, process, mechanism and benefit for agriculture. *Current microbiology*, 72, 804-816.
- Naresh, R. K., Purushottam, S. P., Dwivedi, A., & Kumar, V. (2013). Effects of water stress on physiological processes and yield attributes of different mungbean (L.) varieties. *African Journal of Biochemistry Research*, 7(5), 55-62.
- Naseer, I., Ahmad, M., Nadeem, S. M., Ahmad, I., & Zahir, Z. A. (2019). Rhizobial inoculants for sustainable agriculture: prospects and applications. *Biofertilizers for sustainable agriculture and environment*, 245-283.
- Naveed, M., Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Mitter, B., & Sessitsch, A. (2014). Drought stress amelioration in wheat through inoculation with Burkholderia phytofirmans strain PsJN. *Plant Growth Regulation*, 73, 121-131.
- Naveed, M., Mitter, B., Reichenauer, T. G., Wieczorek, K., & Sessitsch, A. (2014 a). Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by Burkholderia phytofirmans PsJN and Enterobacter sp. FD17. *Environmental and Experimental Botany*, 97, 30-39.
- Neupane, S., Goodwin, L. A., Högberg, N., Kyrpides, N. C., Alström, S., Bruce, D., Quintana, B., Munk, C., Daligault, H., Teshima, H., Davenport, K., Reitenga, K., Green, L., Chain, P., Erkkila, T., Gu, W., Zhang, X., Xu, Y., Kunde, Y., Chertkov, O., Han, J., Han, C., Detter, J. C., Ivanova, N., Pati, A., Chen, A., Szeto, E., Mavromatis, K., Huntemann, M., Nolan, M., Pitluck, S., Deshpande, S., Markowitz, V., Pagani, I., Klenk, H. P., Woyke, T., & Finlay, R. D. (2013). Non-contiguous finished genome sequence of plant-growth promoting Serratia proteamaculans S4. *Standards in Genomic Sciences*, 8(3), 441-449. <https://doi.org/10.4056/sigs.4027757>
- Laurette, N. N., Maxémilienne, N. B., Henri, F., Souleymanou, A., Kamdem, K., Albert, N., ... & François-Xavier, E. (2015). Isolation and screening of indigenous Bambara groundnut (*Vigna Subterranea*) nodulating bacteria for their tolerance to some environmental stresses. *American Journal of Microbiological Research*, 3(2), 65-75.
- Ngumbi, E., & Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, 105, 109-125.
- Nkot, L. N., Krasova-Wade, T., Etoa, F. X., Sylla, S. N., & Nwaga, D. (2008). Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in diverse land use systems of humid forest zone in Cameroon. *applied soil ecology*, 40(3), 411-416.
- Nkot, L. N., Nwaga, D., Ngakou, A., Fankem, H., & Etoa, F. X. (2011). Variation in nodulation and growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) on oxisols from land use systems of the humid forest zone in southern Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 10(20), 3996-4004.
- Noisangiam, R., Teamtison, K., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Toshiki, U., Minamisawa, K., & Teamroong, N. (2012). Genetic diversity, symbiotic evolution, and proposed infection process

- of Bradyrhizobium strains isolated from root nodules of *Aeschynomene americana* L. in Thailand. *Applied and environmental microbiology*, 78(17), 6236-6250..
- Nour, S. M., Fernandez, M. P., Normand, P., & Cleyet-Marel, J. C. (1994). *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(3), 511-522.
- Nushair, A. M., Saha, A. K., Rahman, A., Mohanta, M. K., & Haque, F. (2017). Genotypic characterization of indigenous *Rhizobium* strain from cultivated Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Bangladesh. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(10), 2493-2502.
- O'Brien, P. A. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46(4), 293-304.
- Ogutcu, H., ALGUR, Ö., Elkoca, E., & Kantar, F. (2008). The determination of symbiotic effectiveness of *Rhizobium* strains isolated from wild chickpeas collected from high altitudes in Erzurum. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32(4).
- Okazaki, S., Tittabutr, P., Teulet, A., Thouin, J., Fardoux, J., Chaintreuil, C., ... & Giraud, E. (2016). *Rhizobium*–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *The ISME journal*, 10(1), 64-74.
- Okito, A., Alves, B. J. R., Urquiaga, S., & Boddey, R. M. (2004). Nitrogen fixation by groundnut and velvet bean and residual benefit to a subsequent maize crop. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39, 1183-1190.
- Okubo, T., Fukushima, S., & Minamisawa, K. (2012). Evolution of *Bradyrhizobium*–*Aeschynomene* mutualism: living testimony of the ancient world or highly evolved state?. *Plant and cell physiology*, 53(12), 2000-2007.
- Oldroyd, G. E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252-263.
- 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, 119-144.
- Ott, T., van Dongen, J. T., Gu, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., ... & Udvardi, M. K. (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current biology*, 15(6), 531-535.
- Palacios, O. A., Bashan, Y., and de-Bashan, L. E. (2014). Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria—an overview. *Biol. Fertil. Soils* 50, 415–432. doi: 10.1007/s00374-013-0894-3
- Pandey, A., & Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405(6788), 837-846.
- Pandey, S., & Chakraborty, D. (2019). Isolation and characterization of *Rhizobium* sp. from a collar rot tolerant groundnut (*Arachis hypogaea* L.) variety. *Plant Science Today*, 6(sp1), 631-634. <https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.sp1.693>
- Parveen, G., Noreen, R., Shafique, H. A., Sultana, V., Ehteshamul-Haque, S., & Athar, M. (2019). Role of rhizobia in suppressing the root diseases of soybean under soil amendment. *Planta daninha*, 37.
- Patel A, Vyas RV, Mankad M, Subhash N (2017) Isolation and biochemical characterization of rhizobia from rice rhizosphere and their effect on rice growth promotion. *Int J Pure App BioSci* 5(4):441–451
- Paudel, D., Liu, F., Wang, L., Crook, M., Maya, S., Peng, Z., ... & Wang, J. (2020). Isolation, characterization, and complete genome sequence of a *Bradyrhizobium* strain Lb8 from nodules of peanut utilizing crack entry infection. *Frontiers in Microbiology*, 11, 93.

- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201.
- Petrović, G., Jovičić, D., Nikolić, Z., Tamindžić, G., Ignjatov, M., Milošević, D., & Milošević, B. (2016). Comparative study of drought and salt stress effects on germination and seedling growth of pea. *Genetika-Belgrade*, 48(1), 373-381.
- Pitt, J.I. (1973). An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *mycologia*, 65,, 1135–1157
- Polania, J. A., Poschenrieder, C., Beebe, S., & Rao, I. M. (2016). Effective use of water and increased dry matter partitioned to grain contribute to yield of common bean improved for drought resistance. *Frontiers in plant science*, 7, 660.
- Prasanna, R., Joshi, M., Rana, A., Shivay, Y. S., & Nain, L. (2012). Influence of co-inoculation of bacteria-cyanobacteria on crop yield and C–N sequestration in soil under rice crop. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1223-1235.
- Pruthvi, V., Narasimhan, R., & Nataraja, K. N. (2014). Simultaneous expression of abiotic stress responsive transcription factors, AtDREB2A, AtHB7 and AtABF3 improves salinity and drought tolerance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *PLoS One*, 9(12), e111152.
- Qin, L., Jiang, H., Tian, J., Zhao, J., & Liao, H. (2011). Rhizobia enhance acquisition of phosphorus from different sources by soybean plants. *Plant and Soil*, 349, 25-36.
- Qu, L., Huang, Y., Zhu, C., Zeng, H., Shen, C., Liu, C., ... & Pi, E. (2016). Rhizobia-inoculation enhances the soybean's tolerance to salt stress. *Plant and Soil*, 400, 209-222.
- Raghuwanshi, R., & Prasad, J. K. (2018). Perspectives of rhizobacteria with ACC deaminase activity in plant growth under abiotic stress. *Root biology*, 303-321.
- Rai, R., Dash, P. K., Mohapatra, T., & Singh, A. (2012). Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. *Indian J. Exp. Biol.* 50: 340-350.
- Rakh, R. R., Saut, L. S., Dalvi, S. M., & Manwar, A. V. (2011). Biological Control of *Sclerotium rolfsii*, Causing Stem Rot of Groundnut by *Pseudomonas* cf. *monteilii* 9 .Recent Research in Science and Technology, 3(3): 26-34.
- Ramírez, C. (1982). Manual and Atlas of the *Penicillia*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press,.874.
- Ramos, M. L. G., Gordon, A. J., Minchin, F. R., Sprent, J. I., & Parsons, R. (1999). Effect of water stress on nodule physiology and biochemistry of a drought tolerant cultivar of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Annals of Botany*, 83(1), 57-63.
- Ramos, M. L. G., Parsons, R., Sprent, J. I., & James, E. K. (2003). Effect of water stress on nitrogen fixation and nodule structure of common bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 339-347.
- Ranawake, A. L., Dahanayaka, N., Amarasingha, U. G. S., Rodrigo, W. D. R. J., & Rodrigo, U. T. D. (2011). Effect of water stress on growth and yield of mung bean (*Vigna radiata* L). *Tropical agricultural research and extension*, 14(4), 76-79.
- Raven, J. A., & Edwards, D. (2001). Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *Journal of experimental botany*, 52(suppl_1), 381-401.
- Rebah, F. B., Prévost, D., Yezza, A., & Tyagi, R. D. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. *Bioresource technology*, 98(18), 3535-3546.

- Mirza, B. S., Mirza, M. S., Bano, A., & Malik, K. A. (2007). Coinoculation of chickpea with Rhizobium isolates from roots and nodules and phytohormone-producing Enterobacter strains. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 47(8), 1008-1015.
- Rubina Noreen, H., Urooj, F., Farhat, H., Shafique, H. A., Rahman, A., & Ehteshamul-Haque, S. (2018). Impact of endo-nodule fluorescent Pseudomonas and Rhizobia on root rotting fungi and growth of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Int. J. Biol. Res*, 6(1), 27-33
- Russell, N. J., & Fukunaga, N. (1990). A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 75(2-3), 171-182.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 1-9.
- Saadallah, K., Drevon, J. J., & Abdelly, C. (2001). Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie*, 21(6-7), 627-634.
- Saikia, J., Sarma, R. K., Dhandia, R., Yadav, A., Bharali, R., Gupta, V. K., & Saikia, R. (2018). Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. *Scientific reports*, 8(1), 3560. doi: 10.1038/s41598-018-21921-w
- Sairam, R. K., & Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current science*, 407-421.
- Salwa, A., Hammad, K. A., and Tantawy, M. (2010). Studies on salinity tolerance of two peanut cultivars in relation to growth, leaf water content. some chemical aspects and yield. *J. Appl. Sci. Res.* 6, 1517–152
- Sana, F. D., Faysal, B. J., Kais, Z., Salah, R., & Ridha, M. (2012). Effet de l'inoculation par une souche osmotolérante de Rhizobium sullae sur la croissance et la production en protéine du sulla (*Sulla coronarium* L.) sous déficit hydrique. *Journal of Applied Biosciences*, 51, 3642-3651.
- Sanders, T. H. (2003). Peanuts. In *Encyclopedia of food sciences and nutrition* (Vol. 2). Academic press NC, USA.
- Santamaría, R. I., Bustos, P., Sepúlveda-Robles, O., Lozano, L., Rodríguez, C., Fernández, J. L., ... & González, V. (2014). Narrow-host-range bacteriophages that infect Rhizobium etli associate with distinct genomic types. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(2), 446-454.
- Sassi Aydi, S., Aydi, S., Gonzalez, E., & Abdelly, C. (2008). Osmotic stress affects water relations, growth, and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 441-449.
- Schmidt, T. M., Thomé, A. H. E., Sperotto, R. A., & Granada, C. E. (2018). Effect of rhizobia inoculation on the development of soil-borne pathogens infecting common bean plants. *European Journal of Plant Pathology*. doi:10.1007/s10658-018-1600-y
- Sennoi, R., Jogloy, S., Saksirirat, W., & Patanothai, A. (2010). Pathogenicity test of Sclerotium rolfsii, a causal agent of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) stem rot. *Asian Journal of Plant Science*, 9 (5): 281-284. DOI: 10.3923/ajps.2010.281.284
- Serraj, R., Bona, S., Purcell, L. C., & Sinclair, T. R. (1997). Nitrogen accumulation and nodule activity of field-grown 'Jackson' soybean in response to water deficits. *Field Crops Research*, 52(1-2), 109-116.
- Serraj, R., Roy, G., & Drevon, J. J. (1994). Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion. *Physiologia Plantarum*, 91(2), 161-168.
- Sgroy V, Cassan F, Masciarelli O, Del Papa MF, Lagares A, Luna V (2009) Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating

- (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:371–381
- Shaban, W. I., & El-Bramawy, M. A. (2011). Impact of dual inoculation with *Rhizobium* and *Trichoderma* on damping off, root rot diseases and plant growth parameters of some legumes field crop under greenhouse conditions. *Int. Res. J. Agric. Sci. Soil Sci*, 1(3), 98-108.
- Shahaby A. F., Alharthi A. A., El-Tarras A. E., and Others. (2014). Molecular characterization of rhizobiophages specific for *Rhizobium* sp. *Sinorhizobium* sp., and *Bradyrhizobium* sp. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3 155–171.
- Shahid, M., Ameen, F., Maheshwari, H. S., Ahmed, B., AlNadhari, S., & Khan, M. S. (2021). Colonization of *Vigna radiata* by a halotolerant bacterium *Kosakonia sacchari* improves the ionic balance, stressor metabolites, antioxidant status and yield under NaCl stress. *Applied Soil Ecology*, 158, 103809.
- Shahid, M., Khan, M.S., Syed, A., Marraiki, N. & Elgorban, A.M. (2021). *Mesorhizobium ciceri* as biological tool for improving physiological, biochemical and antioxidant state of *Cicer arietinum* (L.) under fungicide stress. *Sci. Rep.*, 11, 1-18. doi: 10.1038/s41598-021-89103-9
- Shameer, S., & Prasad, T. N. V. K. V. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84, 603-615. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0365-1>
- Sharif, T., Khalil, S., & Ahmad, S. (2003). Effect of *Rhizobium* sp., on Growth of Pathogenic Fungi under in vitro Conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(18), 1597–1599. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2003.1597.1599>
- Sharma, M. P., Jaisinghani, K., Sharma, S. K., & Bhatia, V. S. (2012). Effect of native soybean rhizobia and AM fungi in the improvement of nodulation, growth, soil enzymes and physiological status of soybean under microcosm conditions. *Agricultural Research*, 1, 346-351.
- Sharma, S., Kulkarni, J., & Jha, B. (2016). Halotolerant rhizobacteria promote growth and enhance salinity tolerance in peanut. *Frontiers in microbiology*, 7, 1600.
- Sharma, S., Upadhyaya, H. D., Varshney, R. K., & Gowda, C. L. L. (2013). Pre-breeding for diversification of primary gene pool and genetic enhancement of grain legumes. *Frontiers in plant science*, 4, 309.
- Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi journal of biological sciences*, 22(2), 123-131.
- Siddiqui, I. A., Ehteshamul-Haque, S., Zaki, M. J., & Ghaffar, A. (2000). Greenhouse evaluation of rhizobia as biocontrol agent of root-infecting fungi in okra. *Acta Agrobotanica*, 53(1), 13–22. <https://doi.org/10.5586/aa.2000.002>
- Sijilmassi, B., Filali-Maltouf, A., Boulahyaoui, H., Kricha, A., Boubekri, K., Udupa, S., ... & Amri, A. (2020). Assessment of genetic diversity and symbiotic efficiency of selected *Rhizobia* strains nodulating lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Plants*, 10(1), 15.
- Silvente, S., Sobolev, A. P., & Lara, M. (2012). Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. *Plos one*, 7(6), e38554.
- Simon T, Kalalova S. (1996). Preparation of antibiotic resistant mutants of rhizobia and their use. Rostlinna Vyroba-UZPI (Czech Republic)
- Sinclair, T. R., Leilah, A. A., & Schreffler, A. K. (1995). Peanut nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) response to soil dehydration. *Peanut Science*, 22(2), 162-166.
- Singh, A. K., Smartt, J., Simpson, C. E., & Raina, S. N. (1998). Genetic variation vis-a-vis molecular polymorphism in groundnut, *Arachis hypogaea* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45, 119-126.

- Singh, A., & Kumar, P. K. R. (1991). *Fusarium oxysporum*: status in bioethanol production. *Critical reviews in biotechnology*, 11(2), 129-147.
- Singh, A., Yadav, V. K., Chundawat, R. S., Soltane, R., Awwad, N. S., Ibrahim, H. A., ... & Vicas, S. I. (2023). Enhancing plant growth promoting rhizobacterial activities through consortium exposure: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1099999>
- Singh, P. K., Singh, M., & Vyas, D. (2010). Biocontrol of fusarium wilt of chickpea using arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosorum* biovar. *Caryologia*, 63(4), 349-353.
- Singleton, P. W., El Swaify, S. A., & Bohlool, B. B. (1982). Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Applied and Environmental microbiology*, 44(4), 884-890.
- Singleton, P., Keyser, H., & Sande, E. (2002). Development and evaluation of liquid inoculants. *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam*, 109, 52-66.
- Sizenando, C. I. T., Ramos, J. P. C., FERNANDES JUNIOR, P. I., de Lima, L. M., Freire, R. M. M., & dos Santos, R. C. (2016). Agronomic efficiency of *Bradyrhizobium* in peanut under different environments in Brazilian Northeast.
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1985). *Methods in legume-Rhizobium technology* (p. 365). Paia, Maui: University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, College of Tropical Agriculture and Human Resources.
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). 383. *Handbook for rhizobia: methods in legume-rhizobium technology*, 450, 454-384. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>
- Somasegaran, P., & Hoben, J. H. (1994). *Handbook for Rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology* Springer. Heidelberg, Berlin, 339.
- Somasegaran, P., Hoben, H. J., Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). Counting rhizobia by a plant infection method. *Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology*, 58-64.
- Soni, M., & Choure, K. (2022). Screening of plant growth-promoting *Rhizobium tarimense* from root nodules of chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of Applied and Natural Science*, 14(2), 550-558.
- Spratt, B. G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*, 264(5157), 388-393.
- Sridevi, M., & Mallaiah, K. (2008). Factors effecting chitinase activity of *Rhizobium* sp. from *Sesbania sesban*. *Biologia*, 63(3), 307–312. <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0070-7>
- Stocker, B. D., Prentice, I. C., Cornell, S. E., Davies-Barnard, T., Finzi, A. C., Franklin, O., ... & Zaehle, S. (2016). Terrestrial nitrogen cycling in Earth system models revisited. *New Phytologist*, 210(4), 1165-1168.
- Stowers, M. D., & Elkan, G. H. (1984). Growth and nutritional characteristics of cowpea rhizobia. *Plant and Soil*, 80, 191-200.
- Igiehon, N. O., Babalola, O. O., & Aremu, B. R. (2019). Genomic insights into plant growth promoting rhizobia capable of enhancing soybean germination under drought stress. *BMC microbiology*, 19(1), 1-22.
- Sun, L., Lei, P., Wang, Q., Ma, J., Zhan, Y., Jiang, K., ... & Xu, H. (2020). The endophyte *Pantoea alhagi* NX-11 alleviates salt stress damage to rice seedlings by secreting exopolysaccharides. *Frontiers in microbiology*, 10, 3112. doi: 10.3389/fmicb.2019.03112

- Sun, Q., Liu, Y., Liu, H., & Dumroese, R. K. (2020). Interaction of biochar type and rhizobia inoculation increases the growth and biological nitrogen fixation of *Robinia pseudoacacia* seedlings. *Forests*, 11(6), 711.
- Szabolcs, I. (1986). Agronomical and ecological impact of irrigation on soil and water salinity. In *Advances in Soil Science: Volume 4* (pp. 189-218). Springer New York.
- Tabuc, C., Taranu, I., & Calin, L. (2011). Survey of mould and mycotoxin contamination of cereals in South-Eastern Romania in 2008–2010. *Archiva Zootechnica*, 14(4), 25-38.
- Tagele, S.B., Kim, S.W., Lee, H.G. & Lee, Y.S. (2019). Potential of novel sequence type of *Burkholderia cenocepacia* for biological control of root rot of maize (*Zea mays* L.) caused by *Fusarium temperatum*. *Int. J. Mol. Sci*, 20 (5), 1005. doi: 10.3390/ijms20051005.
- Tariq, M., Khan, A., Asif, M., Khan, F., Ansari, T., Shariq, M., et al. (2020). Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. *Acta Agricult. Scand. Sect. B Soil Plant Sci*. 70, 507–524. doi: 10.1080/09064710.2020.1784262
- Tate RL. (1995). Soil microbiology (symbiotic nitrogen fixation). Wiley, New York, pp 307–333.
- Taurian, T., Ibanez, F., Fabra, A., & Aguilar, O. M. (2006). Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in central Argentinean soils. *Plant and soil*, 282, 41-52.
- Tavares, M. J., Nascimento, F. X., Glick, B. R., and Rossi, M. J. (2018). The expression of an exogenous ACC deaminase by the endophyte *Serratia grimesii* BXF1 promotes the early nodulation and growth of common bean. *Lett. Appl. Microbiol.* 66, 252–259. doi: 10.1111/lam.12847
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 119(6), S3-S10.
- Thrall, P. H., Laine, A. L., Broadhurst, L. M., Bagnall, D. J., & Brockwell, J. (2011). Symbiotic effectiveness of rhizobial mutualists varies in interactions with native Australian legume genera. *PloS one*, 6(8), e23545.
- Tillard, P., & Drevon, J. J. (1988). Nodulation and nitrogenase activity of chickpea cultivar INRA 199 inoculated with different strains of *Rhizobium ciceri*. *Agronomie*, 8(5), 387-392.
- Tohge, T., de Souza, L. P., & Fernie, A. R. (2017). Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(15), 4013-4028.
- Fiddaman, P. J., & Rossall, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(2), 119-126.
- Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 781–805. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120235>
- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., & Singh, D. P. (2011). Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere*, 21(2), 214-222.
- USDA (2012) Foreign agricultural service: peanut area, yield, and production,. <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx>
- Usha, D., & Archana, S. (2015). Isolation and Physico-chemical Characterization of *Rhizobium* Strains Isolated from *Vigna* Fields of Gird Region of Madhya Bharat. *Journal of Academia and Industrial Research*, 4(5), 155-159.
- Valetti, L., Angelini, J. G., Taurian, T., Ibañez, F. J., Muñoz, V. L., Anzuay, M. S., ... & Fabra, A. (2016). Development and field evaluation of liquid inoculants with native Bradyrhizobial strains for peanut production. *African Crop Science Journal*, 24(1), 1-13.

- Valverde, A., Velazquez, E., Fernandez-Santos, F., Vizcaíno, N., Rivas, R., Mateos, P. F., ... & Willems, A. (2005). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1985-1989.
- Van Kessel, C., & Hartley, C. (2000). Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation?. *Field Crops Research*, 65(2-3), 165-181.
- Van Rhijn, P., Fujishige, N. A., Lim, P. O., & Hirsch, A. M. (2001). Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Plant physiology*, 126(1), 133-144.
- Van Rossum, D. I. M. A. N., Schuurmans, F. P., Gillis, M., Muyotcha, A., Van Verseveld, H. W., Stouthamer, A. H., & Booger, F. C. (1995). Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1599-1609.
- Van Rossum, D., Muyotcha, A., de Hoop, B. M., van Verseveld, H. W., Stouthamer, A. H., & Booger, F. C. (1994). Soil acidity in relation to groundnut-*Bradyrhizobium* symbiotic performance. *Plant and Soil*, 163, 165-175.
- Van Rossum, D., Muyotcha, A., de Hoop, B. M., van Verseveld, H. W., Stouthamer, A. H., & Booger, F. C. (1994). Soil acidity in relation to groundnut-*Bradyrhizobium* symbiotic performance. *Plant and Soil*, 163, 165-175.
- Van Insberghe, D., Maas, K. R., Cardenas, E., Strachan, C. R., Hallam, S. J., & Mohn, W. W. (2015). Non-symbiotic *Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. *The ISME journal*, 9(11), 2435-2441.
- Varshney, R. K., Mohan, S. M., Gaur, P. M., Gangarao, N. V., Pandey, M. K., Bohra, A., ... & Mhase, M. B. (2013). Bharadwaj Ch., Mannur DM, Harer PN, Guo B., Liang X., Nadarajan N., Gowda CL Achievements and prospects of genomics-assisted breeding in three legume crops of the semi-arid tropics. *Biotechnol. Adv*, 31(8), 1120-1134.
- Vega-Hernández, M. C., Pérez-Galdona, R., Dazzo, F. B., Jarabo-Lorenzo, A., Alfayate, M. C., & Leon-Barrios, M. (2001). Novel infection process in the indeterminate root nodule symbiosis between *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste) and *Bradyrhizobium* sp. *New Phytologist*, 150(3), 707-721.
- Vibhuti, C. S., Bargali, K., & Bargali, S. S. (2015). Seed germination and seedling growth parameters of rice (*Oryza sativa* L.) varieties as affected by salt and water stress. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 85(1), 102-108.
- Vicario, J. C., Dardanelli, M. S., & Giordano, W. F. (2015). Swimming and swarming motility properties of peanut-nodulating rhizobia, 362(2), 1-6.
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*.
- Vincent, J. M. (1974). Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. *The biology of nitrogen fixation*. p 265-341. In Quispel A (ed), *Biology of nitrogen fixation*. North-Holland Publishing Co, Amsterdam, Netherlands.
- Vitousek, P. M., Porder, S., Houlton, B. Z., & Chadwick, O. A. (2010). Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. *Ecological applications*, 20(1), 5-15.
- Volpiano, C. G., Lisboa, B. B., Granada, C. E., José, J. F. B. S., de Oliveira, A. M. R., Beneduzi, A., ... & Vargas, L. K. (2019). Rhizobia for biological control of plant diseases. *Microbiome in plant health and disease: challenges and opportunities*, 315-336.

- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, 184, 13-24.
- Wagner, S. C., Skipper, H. D., & Hartel, P. G. (1995). Medium to study carbon utilization by Bradyrhizobium strains. *Canadian journal of microbiology*, 41(7), 633-636.
- Wang, E. T., Tian, C. F., Chen, W. F., Young, J. P. W., and Chen, W. X. (2019a). Ecology and Evolution of Rhizobia: Principles and Applications. Singapore: Springer Nature. doi: 10.1007/978-981-32-9555-1
- Wang, R., Chang, Y. L., Zheng, W. T., Zhang, D., Zhang, X. X., Sui, X. H., ... & Chen, W. X. (2013). Bradyrhizobium arachidis sp. nov., isolated from effective nodules of Arachis hypogaea grown in China. *Systematic and applied microbiology*, 36(2), 101-105.
- Wang, W. X., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2000). Biotechnology of plant osmotic stress tolerance physiological and molecular considerations. In IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560(pp. 285-292).
- Wang, X., Cai, X., Xu, C., Wang, Q., & Dai, S. (2016). Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1706.
- Wang, Y. Y., Hsu, P. K., & Tsay, Y. F. (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in plant science*, 17(8), 458-467.
- Wei, W., Jiang, J., Li, X., Wang, L., & Yang, S. 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.
- Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology*, 26(1), 379-407.
- Werquin, M., Ackermann, H. W., & Levesque, R. C. (1988). A study of 33 bacteriophages of Rhizobium meliloti. *Applied and environmental microbiology*, 54(1), 188-196.
- WHIPPS, J. M. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, 107(1), 127-142. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04887.x>
- Wiener, P. (1996). Experimental studies on the ecological role of antibiotic production in bacteria. *Evolutionary Ecology*, 10, 405-421.
- Williamson, K. E., Corzo, K. A., Drissi, C. L., Buckingham, J. M., Thompson, C. P., & Helton, R. R. (2013). Estimates of viral abundance in soils are strongly influenced by extraction and enumeration methods. *Biology and Fertility of Soils*, 49, 857-869.
- Wisniewski-Dyé, F., & Downie, J. A. (2002). Quorum-sensing in Rhizobium. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81, 397-407.
- World Health Organization. (2020). Regional Overview of Food Security and Nutrition in the Near East and North Africa 2019: Rethinking food systems for healthy diets and improved nutrition. Food & Agriculture Org.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature reviews microbiology*, 5(3), 175-186.
- Xavier, G. R., Martins, L. M. V., Neves, M. C. P., & Rumjanek, N. G. (1998). Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. *Biology and Fertility of Soils*, 27, 386-392.
- Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., & Neves, M. C. P. (2007). Tolerance of rhizobia of cowpea to salinity and temperature in vitro condition. *Caatinga*, 4, 1-9.

- Xiong, W., Sun, Y., Zhang, T., Ding, X., Li, Y., Wang, M., & Zeng, Z. (2015). Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. *Microbial ecology*, 70, 425-432.
- Xu, L. M., C. Ge, Z. Cui, J. Li, and H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 706-711
- Yadav, A. N., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A., Dikilitas, M., et al. (2021). Biodiversity, and biotechnological contribution of beneficial soil microbiomes for nutrient cycling, plant growth improvement and nutrient uptake. *Biocatal. Agricult. Biotechnol.* 33:102009. doi: 10.1016/j.bcab.2021.102009
- Yadav, S., Modi, P., Dave, A., Vijapura, A., Patel, D., & Patel, M. (2020). Effect of Abiotic Stress on Crops. *Sustainable Crop Production*, 3.
- Yang, J. K., & Zhou, J. C. (2008). Diversity, phylogeny and host specificity of soybean and peanut bradyrhizobia. *Biology and Fertility of soils*, 44, 843-851.
- Yang, J. K., Xie, F. L., Zou, J., Zhou, Q., & Zhou, J. C. (2005). Polyphasic characteristics of bradyrhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in China. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(1), 141-153.
- Yaqub, F. & Shahzad, S. (2005). Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different crops and effect of inoculum density on colonization of mungbean and sunflower roots. *Pakistan Journal of Botany*, 37 (1): 175-180.
- Zabaloy, M. C., & Gómez, M. A. (2005). Diversity of rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth. *Biology and fertility of soils*, 42, 83-88.
- Zablotowicz, R. M., & Focht, D. D. (1981). Physiological characteristics of cowpea rhizobia: evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(3), 679-685.
- Zahir, Z. A., Shah, M. K., Naveed, M., & Akhter, M. J. (2010). Substrate-dependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(9), 1288-1294.
- Zahran, H. H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4), 968-989.
- Zahran, H. H., Abdel-Fattah, M., Yasser, M. M., Mahmoud, A. M., & Bedmar, E. (2012). Diversity and environmental stress responses of rhizobial bacteria from Egyptian grain legumes. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(10), 571-583.
- Zapata, N., Vargas, M., Gerding, M., & Chandía, M. (2014). Inoculation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with different *Bradyrhizobium* strains and their effect on crop growth and yield. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences, ex Agro-Ciencia*, 30(1), 57-64.
- Zazou, A. Z., Fonceka, D., Fall, S., Fabra, A., Ibañez, F., Pignoly, S., ... & Svistoonoff, S. (2018). Genetic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial strains isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in Senegal. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 265, 384-391.
- Zhang, J., Wang, N., Li, S., Peng, S., & Andrews, M. (2023). *Bradyrhizobium zhengyangense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* L. in central China. *figshare*.
- Zhang, Y. F., Wang, F. Q., & Chen, W. X. (2006). Numerical taxonomy and 16S rDNA PCR-rFLP analysis of rhizobial strains isolated from root nodules of cowpea and mung bean grown in different regions of China. *Wei Sheng wu xue bao= Acta Microbiologica Sinica*, 46(6), 861-868.
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 6(2), 66-71.

Annexes

Annexe 1

YMB Mannitol Broth (Vincent, 1970)

Mannitol	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extrait de levure	0.5 g
Eau distillé	1.0 litre
PH 6.8	

Autoclave 120°C pendant 20 minutes.

YMA Yeast Mannitol Agar

YMB	1.0 litre
Agar	15 g

Solution nutritive (g /l) (Fähreus, 1957)

-Macro éléments

CaCl ₂	0.10
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.12
KH ₂ PO ₄	0.10
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0.15
Citrate de fer	0.005

stock de Micro éléments 1 ml -Micro éléments (g /l)

H ₃ BO ₃	2.86
MnSO ₄ 4H ₂ O	2.03
ZnSO ₄ 5H ₂ O	0.22
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.08
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.14
Eau distillée	1000m

Annexe 02 :

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 (USSL Staff, 1954 ; Aubert, 1978).

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

Annexe 03 :

PDA (Potato Dextrose Agar)

PDA	39.0 g
Eau distiller	1.0 litre

Lactophénol

Phénol cristal	10 g
Acide lactique	2 ml
Glycérol	10 ml
Eau distillé	28 ml

M.E.A Malt Extract Agar 25°C

Extrait de Malt.	30g
Peptone	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000g

G25N Glycérol Nitrate Agar à 25°C

Sucrose	40g
Extrait de levure	20g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml.

C.Y.A Czapek Yeast Agar à deux températures différentes 5°C et 37°C

KH ₂ PO ₄	1g.
Extrait de levure	5g.
Sucrose	3g.
Agar	15g.
Eau distillée	1000ml.

Czapek concentrate

NaNO ₃	30 g
KCL	5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.1 g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml.

Czapek dox agar

Sucrose	30g
KH ₂ PO ₄	1g
KCL	0.5g
MgSO ₄	0.5g
FeSO ₄	0.5g
NaNO ₃	3g
Agar	15g
Eau distiller	1000 ml

Yeast Extract sucrose

Sucrose	40g
Extrait de levure	20g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml