



UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE
UFR AGROFORESTERIE

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur et
de la Recherche Scientifique

ANNEE : 2019-2020

N° D'ORDRE : 030-2020

THESE DE DOCTORAT

Mention : Agriculture et Foresterie Tropicale

Spécialité : Microbiologie des sols et

Biologie moléculaire

**Caractérisation moléculaire et phénotypique
des bactéries symbiotiques et associatives
isolées des nodules du pois bambara [*Vigna
subterranea* (L.) Verdc.]**

CANDIDAT

Nom : GUEI

Prénom : NASSE KAEDA
RAISSA

Soutenu publiquement
le : 19 Décembre 2020

JURY

Président : M. KONE Tidiani, Professeur Titulaire, Université
Jean Lorougnon Guédé

Directeur : M. KONATE Ibrahim, Maître de Conférences,
Université Jean Lorougnon Guédé

Rapporteur : M. N'GBESSO Mako François De Paul, Maître de
Recherches, Centre National de Recherche
Agronomique

Examineurs : M. AYOLIE Koutoua, Maître de Conférences,
Université Jean Lorougnon Guédé

M. GONNETY Tia Jean, Professeur Titulaire,
Université Nangui Abrogoua

TABLE DES MATIÈRES

DEDICACES	VIII
AVANT-PROPOS	IX
REMERCIEMENTS	X
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	XIV
LISTE DES FIGURES	XVII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIX
LISTE DES ANNEXES.....	XXII
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	
1- POIS BAMBARA [<i>VIGNA SUBTERRANEA</i> (L.) VERDC.].....	6
1.1- Aperçu général	6
1.2- Origine et distribution.....	6
1.3- Taxonomie	7
1.4- Description botanique	7
1.5- Etapes de développement	9
1.6- Composition chimique des graines	9
1.7- Usages	10
1.8- Importance agronomique et écologique.....	10
1.9- Contraintes et limites de production.....	11
1.10- Maladies et ravageurs	11
1.11- Pratique culturale.....	12
1.12- Situation de la culture en Côte d’Ivoire.....	13
2- RHIZOBIA	13
2.1- Aperçu général	13
2.2- Taxonomie	14
2.2.1- α -rhizobia	15
2.2.2- β -rhizobia	17
3- SYMBIOSE RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE.....	18
3.1- Aperçu général	18
3.2- Etablissement de la symbiose rhizobium-légumineuse	19

3.2.1- Pré-infection	20
3.2.2- Infection	21
3.2.2.1- Voie intracellulaire	21
3.2.2.2- Voie intercellulaire ou "Crack Entry"	22
3.2.2.3- Pénétration directe entre les cellules épidermiques	22
3.2.3- Développement du nodule.....	22
3.3- Processus de la fixation symbiotique	23
3.3.1- Leghémoglobine	24
3.3.2- Nitrogénase.....	25
3.3.3- Fonctionnement des nodosités.....	26
3.4- Assimilation de l'ammonium	26
4- ENDOPHYTES NODULAIRES.....	26
4.1- Aperçu général	26
4.2- Infection	27
4.3- Présence d'endophytes dans les nodules	28
4.4- Diversité des endophytes nodulaires	29
4.5- Rôle des endophytes nodulaires dans la croissance des plantes.....	30
5- ACTIVITES PROMOTRICES DE CROISSANCE DES PLANTES	30
5.1-Activité de biofertilisant	31
5.1.1- Fixation de l'azote	32
5.1.2 - Solubilisation du phosphate.....	32
5.1.3- Solubilisation du potassium.....	33
5.1.4- Production des phytohormones	34
5.1.4.1- Acide indole-3-acétique	34
5.1.4.2- Gibbérellines et Cytokinines	35
5.1.5- Production des sidérophores.....	35
5.2- Activité de biopesticides	35
5.2.1- Antibiose	36
5.2.2- Enzymes lytiques	36
5.2.3- Résistance systémique induite (RSI)	36
5.2.4- Production d'exo polysaccharides ou formation de biofilm	37
5.2.5- Activité ACC désaminase et régulation du niveau d'éthylène dans les plantes..	37
6- FACTEURS LIMITANT LES ACTIVITES PROMOTRICES DE CROISSANCE	38

6.1- Facteurs environnementaux.....	38
6.1.1. Salinité.....	38
6.1.2. Température.....	39
6.1.3- pH.....	39
6.2- Facteurs anthropiques.....	40
6.2.1- Fertilisants chimiques (engrais).....	40
6.2.2- Pesticides.....	41
7-TAXONOMIE BACTERIENNE	42
8- PHYLOGENETIQUE MOLECULAIRE	43
8.1- Avantages de la phylogénie moléculaire	44
8.2- Phylogénie bactérienne et rhizobienne	44
8.3- Principales étapes de l'analyse phylogénétique.....	46
8.3.1- Sélection des marqueurs moléculaires	46
8.3.2- Séquençage moléculaire.....	46
8.3.3- Alignement et l'analyse des séquences multiples.....	47
8.3.4- Reconstruction des arbres phylogénétiques	48
8.3.4.1- Méthodes basées sur la distance génétique	48
8.3.4.2- Méthodes basées sur les caractères génétiques	48
8.4- Analyse de la robustesse par bootstrap.....	49
8.5- Analyse des Séquences Multi-locus	50
8.6- Gènes de nodulation et leur rôle dans l'analyse phylogénétique	50
 DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES	
1- ZONE D'ETUDE	53
1.1- Présentation de la zone de l'étude.....	53
1.2- Justification du choix de la zone d'étude.....	55
2- MATERIEL	56
2.1- Matériel biologique.....	56
2.1.1- Matériel végétal	56
2.1.2- Matériel bactérien	57
2.2. Matériel technique.....	57
3- METHODES.....	58
3.1- Constitution d'une collection de bactéries nodulaires autochtones du pois bambara.....	58

2.3.1.1. Collecte des échantillons de sols.....	58
2.3.1.2- Piégeage des bactéries du sol.....	59
3.1.3- Collecte et conservation des nodules	60
3.1.4 - Isolement et purification des bactéries	60
3.1.5- Caractérisation morphologique et biochimique des bactéries	60
2.3.1.6- Sélection, nomenclature et conservation des isolats bactériens	61
3.2- Caractérisation moléculaire des isolats bactériens.....	61
3.2.1- Extraction de l'ADN génomique	61
3.2.2- Evaluation de la quantité et de la qualité de l'ADN	62
3.2.3- Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S par PCR.....	63
3.2.4- Identification moléculaire	63
3.2.4.1- Purification et séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S	63
3.2.4.2- Traitement des séquences	64
3.2.4.3- Construction d'arbres phylogéniques	64
3.3- Caractérisation phénotypique des bactéries associées au pois bambara.....	65
3.3.1- Caractérisation physiologique et symbiotique des rhizobia	65
3.3.1.1- Vitesse de croissance des souches rhizobiales sur YEMA + Bleu de bromothymol.....	65
3.3.1.2- Assimilation des substrats carbonés par les souches rhizobiales	65
3.3.1.3- Authentification.....	66
3.3.1.4- Evaluation de la performance symbiotique des rhizobia authentiques du pois bambara.....	67
3.3.2- Evaluation in vitro de l'impact des facteurs abiotiques sur la croissance des bactéries associées au pois bambara	68
3.3.2.1- Effet de la salinité	69
3.3.2.2- Effet du pH	69
3.3.2.3- Effet de la température	69
3.3.2.4- Effet des facteurs engrais de synthèse et pesticides	70
3.3.3- Evaluation in vitro des activités promotrices de croissance des plantes.....	71
3.3.3.1- Production d'acide indol-acétique (AIA)	71
3.3.3.2- Solubilisation du phosphate	72
3.3.3.3- Production de siderophores.....	72

3.4- Evaluation de l'efficacité agronomique des bactéries nodulaires du pois bambara	73
3.4.1- Dispositif expérimental	73
3.4.2- Préparation des solutions mères d'engrais	743
3.4.2- Semis des graines et traitement des plantules.....	74
3.4.4- Evaluation de l'effet des souches autochtones, des souches de références et des engrais de synthèse sur les paramètres de croissance et de rendement des plantes.....	74
3.5- Analyses statistiques des données	75

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1 : CONSTITUTION D'UNE COLLECTION DE SOUCHES

BACTERIENNES ISOLEES DES NODULES DU POIS BAMBARA	76
1.1- Bactéries nodulaires et natives du pois bambara piégées dans les différents sols	76
1.2- Caractéristiques morphologiques et biochimiques des isolats bactériens	78
1.3- Discussion	87
1.4- Conclusion partielle.....	88

CHAPITRE 2 : CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES DES BACTERIES

ISOLEES DES NODULES DU POIS BAMBARA.....	89
2.1- Résultats de l'amplification du gène codant pour l' ARNr par PCR	89
2.2- Identification moléculaire des isolats bactériens du pois bambara	89
2.2.1- Caractéristiques moléculaires des rhizobia	92
2.2.2- Caractéristiques moléculaires des endophytes	94
2.3- Discussion	98
2.4- Conclusion partielle.....	99

CHAPITRE 3: CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DES BACTERIES

NODULAIRES POIS BAMBARA	100
3.1- Caractéristiques physiologiques et symbiotiques des rhizobia isolés des nodules du pois bambra	100
3.1.1- Caractéristiques physiologiques	100
3.1.1.1- Croissance sur milieu YEMA au bleu de bromothymol.....	100
3.1.1.2- Assimilation de la source de carbone	100
3.1.2- Caractéristiques symbiotiques	102
3.1.2.1- Authentification des rhizobia	102

3.1.2.2- Performance symbiotique des rhizobia authentifiés.....	104
3.1.2.2.1- Effet des rhizobia sur les caractéristiques agro-morphologiques des plantes	104
3.1.2.2.2- Infectivité symbiotique.....	106
3.1.2.2.3- Effet des souches sur la biomasse et leur efficacité symbiotique	107
3.2- Effets des facteurs abiotiques <i>in vitro</i> sur la viabilité des bactéries nodulaires du pois bambara	111
3.2.1- Effet du NaCl sur les bactéries nodulaires du pois bambara.....	111
3.2.1.1- Effet du NaCl sur les rhizobia.....	111
3.2.1.2- Effet du NaCl sur les endophytes	116
3.2.2- Effet du pH sur les bactéries nodulaires du pois bambara	127
3.2.2.1- Effet du pH sur les rhizobia	127
3.2.2.2- Effet du pH sur les endophytes	133
3.2.3- Effet de la température sur les bactéries nodulaires du pois bambara	144
3.2.3.1- Effet de la température sur les rhizobia	144
3.2.3.2- Effet de la température sur les endophytes	145
3.2.4- Effet des engrais sur les bactéries nodulaires du pois bambara.....	147
3.2.4.1- Effet des engrais sur les rhizobia.....	147
3.2.4.2- Effet des engrais sur les endophytes.....	148
3.2.5- Effet des pesticides sur les bactéries nodulaires du pois bambara.....	151
3.2.5.1- Effet des pesticides sur les rhizobia.....	151
3.2.5.2- Effet des pesticides sur les endophytes.....	153
3.3- Caractéristiques promotrices de croissance des plantes des bactéries isolées des nodules du pois bambara	156
3.3.1- Capacité productrice d'AIA des bactéries nodulaires du pois bambara	156
3.3.1.1- Capacité productrice d'AIA des rhizobia	156
3.3.1.2- Capacité productrice d'AIA des endophytes	157
3.3.2- Capacité solubilisatrice du phosphate des bactéries nodulaires du pois bambara	159
3.3.2.1- Capacité solubilisatrice du phosphate des rhizobia.....	159
3.3.2.2- Capacité solubilisatrice du phosphate des endophytes	160
3.3.3- Capacité productrice de sidérophores des bactéries nodulaires du pois bambara	162

3.3.3.1- Capacité productrice de sidérophores des rhizobia	162
3.3.3.2- Capacité productrice de sidérophores des endophytes	163
3.4- Discussion	165
3.5- Conclusion partielle.....	176
CHAPITRE 4: EFFETS DE QUELQUES SOUCHES BACTERIENNES ET	
ENGRAIS CHIMIQUES SUR LE DEVELOPPEMENT ET LA PRODUCTION DES	
PLANTES DU POIS BAMBARA	179
4.1- Effets quelques souches bactériennes et engrais chimiques sur le développement des plantes du pois bambara	179
4.2- Effets de quelques souches bactériennes et engrais chimiques sur le rendement en gousses des plantes du pois bambara	184
4.3- Discussion	187
4.4- Conclusion partielle.....	189
CONCLUSIONS GENERALE ET PERSPECTIVES	189
REFERENCES	194
ANNEXES	A

DEDICACES

Je dédie le fruit de ces années de travail à mon précieux défunt père feu Remy GUEI pour m'avoir donné le goût du travail et des études et ma défunte mère adoptive Patricia TAHI, j'ai envie de vous dire que j'y suis arrivée !!! Vous pouvez reposer en paix !

À ma mère Madeleine TAHA, ta bienveillance, ton amour et tes sacrifices m'ont toujours entourée et guidée.

À mes frères Fora MONNIN, Cedrick SELA, Yohann GUEI et mes sœurs Esther MONNIN, Marie Landry MONNIN, Nelly GUEI et Ariane GUEI qui m'ont acceptée, aimée et encouragée.

AVANT-PROPOS

Le travail présenté ici a été réalisé en partie dans le laboratoire de l'Unité de Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire (URGEM) en collaboration avec le Laboratoire d'Agrovalorisation à l'Université Jean Lorougnon Guédé (UJLoG) de (Côte d'Ivoire). L'autre partie a été réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire de la Faculté des Sciences de l'Université Mohammed V - Agdal à Rabat (Maroc).

Ce travail a bénéficié du soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique de Côte d'Ivoire dans le cadre d'une bourse d'études hors Côte d'Ivoire.

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail a été la résultante des efforts conjugués de plusieurs personnes morales et physiques. Ainsi, voudrais-je à travers cette lucarne dire merci à toutes ces personnes qui ont permis en grande partie la réalisation du travail présenté dans cette Thèse.

Cette thèse de l'Université Jean Lorougnon Guédé (UJLoG) a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (LMBM) de la Faculté des Sciences de Rabat-Université Mohammed V du Maroc dont je voudrais remercier les responsables institutionnels.

Je remercie Mme TIDOU Abiba Sanogo épouse KONE, Professeur Titulaire, Présidente de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa pour avoir autorisé l'exécution de ce travail.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de :

- M. KONE Tidiani, Professeur Titulaire, Vice-Président de l'Université Jean Lorougnon Guédé, Chargé de la Pédagogie, de la Vie universitaire, de la Recherche et de l'Innovation pour avoir été toujours attentif à nos préoccupations.
- M. AKAFFOU Doffou Sélastique, Maître de Conférences, Vice-Président de l'Université Jean Lorougnon Guédé, Chargé de la Programmation, de la Planification et des Relations Extérieures pour ses encouragements et l'intérêt particulier qu'il a accordé à ce travail.
- Mme TONESSIA Dolou Charlotte, Maître de Conférences, Directrice de l'UFR Agroforesterie de l'Université Jean Lorougnon Guédé et M. BEUGRE Avit Grah Maxwell, Maître de Conférences, Directeur du Laboratoire d'Agrovalorisation, pour leurs disponibilités chaque fois que j'ai eu à les solliciter pour des questions administratives.
- M. AURAG Jamal, Professeur de l'Enseignement Supérieur (PES), Directeur du Centre BIOBIO de la Faculté des Sciences de Rabat-Université Mohammed V (Maroc) pour toutes les formations acquises et pour les colloques scientifiques auxquels j'ai participé durant mon stage au Maroc.
- M. FILALI-MALTOUF Abdelkarim, Professeur de l'Enseignement Supérieur (PES), Directeur du Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (LMBM) de la Faculté des Sciences de Rabat-Université Mohammed V (Maroc), pour mon accueil au sein de son équipe et pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée. Je n'oublierai jamais les encouragements et l'aide qu'il m'a apportés. Grâce à ses bons conseils, il m'a appris à affronter les situations les plus délicates et m'a guidé avec grand cœur et générosité. Il a été un père pour moi durant ce stage au Maroc, il est et le restera à jamais!

La réalisation du présent mémoire n'aurait pu être effective sans le soutien moral, matériel et la disponibilité de deux personnes de bonnes volontés :

- M. KONATE Ibrahim, Maître de Conférences à l'Université Jean Lorougnon Guédé et Directeur de cette thèse ; Je voudrais lui dire merci pour tous les efforts et sacrifices inestimables qu'il a consentis pour la réalisation de ces travaux. Il a cru en moi dès mes premières années à la faculté et m'a mise sur les rails de la recherche depuis le Master. Je suis à la fois touchée et reconnaissante pour tout ce qu'il m'a appris et apporté, aussi bien sur le plan professionnel que personnel, il a toujours veillé à ce que cette thèse se déroule dans les meilleures conditions. Il m'a accompagnée avec beaucoup de patience et de pédagogie ; du champ au laboratoire, de l'échantillonnage du premier rhizobium et de la préparation de mon premier milieu de culture à la concrétisation de ce mémoire. Je ne saurais jamais assez le remercier pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Les mots ne sont certainement pas assez forts pour lui exprimer ma gratitude et ma reconnaissance mais qu'il sache qu'il a semé dans de la « terre fertile ».

- Mme TAHA Kaoutar, Assistante à la Faculté des Sciences de Rabat-Université Mohammed V, membre de l'équipe du Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (LMBM) et l'Encadreur scientifique du stage effectué au Maroc. Merci pour son coaching, sa disponibilité, sa patience, ses conseils avisés et son engagement personnel pour la réalisation des travaux. Les moments de travail ont été très enrichissants et très formateurs. Son soutien, sa présence et sa générosité ne m'ont jamais fait défaut dans mes moments de solitude, d'angoisse, de doute. Elle a été une grande sœur pour moi, elle est et le restera à jamais!

J'adresse un remerciement particulier à M. KOFFI N'Goran Mathurin, Maître de Conférences à l'Université Jean Lorougnon Guédé, pour m'avoir permis de travailler dans un environnement agréable au sein de l'Unité Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire (URGEM). Qu'il sache qu'il est un modèle pour moi dans le domaine de la recherche scientifique. Je tiens à lui témoigner toute ma gratitude et tout mon respect.

Je ne saurai oublier mes cousins FAE Valérie et FAE Emerse, mes oncles KELA Bernard et MAHE Jean Baptiste, pour tout leur soutien à mon égard.

J'ai eu la chance de côtoyer d'autres personnes très avisées qui n'ont cessé de m'encourager et de me prodiguer de sages conseils. Ainsi, je voudrais remercier :

- M. BAKAYOKO Sidiky, KOFFI Bene, SORO Dogniméton, AYOLIE Koutoua, DJAHA Kouamé, tous Maîtres de Conférences à l'UJLoG et M. ADOU Yao Constant, Professeur Titulaire à l'Université Felix Houphouët Boigny pour leur soutien moral et leurs conseils avisés.

- les enseignants-Chercheurs du Département Biochimie-Microbiologie (UJLoG) qui m'ont adoptée. Un merci particulier à M. AKRE Sosthène, EHOUMAN Serge, OUATTARA Abou, NIABA Valery, KRA Athanase, KOUASSI Clément, tous Maître-Assistants.
- Mmes SBABOU Laila, MEDRAOUI Leila et TALBI Chouhra, toutes Professeurs Habilités (PH) à la Faculté des Sciences de Rabat-Université Mohammed V et membres de l'équipe du Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (LMBM) pour leurs conseils avisés.
- les membres de l'Unité de Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire (URGEM) pour la très bonne ambiance qui a prévalu pendant notre période de travail. Je suis très reconnaissante à M. AHOUTY Ahouty Bernadin, SIMARO Siriki, N'DJETCHI Martial, ABE Aleppo Innocent et KONAN Thomas.
- mes compagnons de tous les jours, AMANI Kouadio et OUATTARA Adama pour la convivialité, la fraternité et la solidarité entre nous. Ensemble, nous avons commencé cette aventure !!!
- mes compagnons du Maroc : CHAMKHI Imane, MEGHAZLI Najoua, BENIS Meryem, RABEH Karim, HNINI Mohamed, OUAKRIM Houcine, ZOUAGUI Rahma, ELFAIK salma, BOUHNIK Omar, ALAMI Sofiane, LAMIN Hanane, OBTEL Morad qui ont permis mon intégration, m'ont soutenu tout le long de mon stage et avec qui j'ai partagé le laboratoire, la salle d'étude, les plats de couscous les vendredis, avec une mention spéciale à OUAKRIM Houcine. A nous revoir bientôt !!!
- les instructeurs de cette Thèse : M. KOFFI N'Goran Mathurin, Maître de conférences à l'Université Jean Lorougnon Guédé et M. N'GBESSO Mako François De Paul, Maître de Recherche au Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), pour le travail minutieux et de qualité qu'ils ont fait lors de l'instruction qui a amélioré fortement la qualité de ce document.
- les membres du jury : M. KONE Tidiani, Professeur Titulaire à l'Université Jean Lorougnon Guédé, M. KONATE Ibrahim, Maître de Conférences à l'Université Jean Lorougnon Guédé, M. N'GBESSO Mako François De Paul, Maître de Recherche au Centre National de Recherche Agronomique, M. AYOLIE Koutoua, Maître de Conférences à l'Université Jean Lorougnon Guédé et M. GONNETY Tia, Jean, Professeur Titulaire à l'Université Nangui Abrogoua (UNA), pour leur compréhension et leur disponibilité.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide précieuse de certaines personnes qui m'ont donné de « bons coups de mains » dans l'échantillonnage des sols à l'expérimentation au champ. Ainsi, je dis merci à KONAN Bertin, KOFFI Christelle, KONAN Cédric, AKOTO Rosine, ASSOH Bernadette, ATSE Marie Paule, KOUAKOU Eugène, KOUADIO Gédéon, OUATTARA Gaoussou et COULIBALY Aly.

Je ne peux terminer sans dire merci à tous mes amis en particulier KOUADIO Jeannette, BOUA Raymond, N'DRI Achille, SORO Waletchien, GUIRIGA Franck et N'GORAN Nadette pour être de très bons amis et pour avoir été là à chaque fois que j'avais besoin d'eux.

Enfin, je n'oublie pas tous ceux qui ont consenti pour moi temps et efforts pour que ce travail puisse voir le jour. Qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ACC	: 1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNr	: Acide désoxyribonucléique ribosomique
AIA	: Acide indole-3-acétique
ANOVA	: Analysis Of Variance
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomique
ASM	: Société Américaine de Microbiologie
BET	: Bromure d'ethidium
BCI1	: Bactérie isolée de CI1 cultivé sur le sol de Bribouo
BCI2	: Bactérie isolée de CI2 cultivé sur le sol de Bribouo
BCI3	: Bactérie isolée de CI3 cultivé sur le sol de Bribouo
BCI5	: Bactérie isolée de CI5 cultivé sur le sol de Bribouo
BCI6	: Bactérie isolée de CI6 cultivé sur le sol de Bribouo
BTB	: Bleu de bromotymol
CAS	: Chrome Azuro1 S
DO	: Densité optique
EDTA	: Acide éthylène diamine tétra acétique
ESR	: Efficience symbiotique relative
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
HDTMA	: Hexa-decyl tri-methyl ammonium bromide
IE	: Indice d'efficacité
IJSEM	: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
IR	: Index relatif

LB	: Luria Broth
LMBM	: Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire
M	: Monsieur
MF /S	: Matière fraîche/ Sèche
ML	: Maximum Likelihood
MLSA	: Multi-Locus Sequence Analysis
MLST	: Multi-Locus Sequence Typing
Mme	: Madame
NJ	: Neighbor-Joining
Pb	: paire de bases
PCP	: Promoteurs de Croissance des Plantes
PCR	: Polymerase chain reaction
PF /S	: Poids Frais/ Sec
PGP	: Plant Growth Promoting
PGPR	: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PVK	: PikovsKaya
RPCP	: Rhizobctéries promotrices de croissance
REP	: Repetitive Extragenic Palindromic
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RVC	: Rhizobactéries associées à <i>Vigna subterranea</i> Côte d'Ivoire
TAE	: Tris-Acétate EDTA
TE	: Tris EDTA
TCI1	: Bactéeie isolée de CI1 cultivé sur le sol de Toroguhé
TCI2	: Bactéeie isolée de CI2 cultivé sur le sol de Toroguhé

TCI3	: Bactérie isolée de CI3 cultivé sur le sol de Toroguhé
TCI5	: Bactérie isolée de CI5 cultivé sur le sol de Toroguhé
TCI6	: Bactérie isolée de CI6 cultivé sur le sol de Toroguhé
UCI1	: Bactérie isolée de CI1 cultivé sur le sol de l'UJLoG
UCI2	: Bactérie isolée de CI2 cultivé sur le sol de l'UJLoG
UCI3	: Bactérie isolée de CI3 cultivé sur le sol de l'UJLoG
UCI5	: Bactérie isolée de CI5 cultivé sur le sol de l'UJLoG
UCI6	: Bactérie isolée de CI6 cultivé sur le sol de l'UJLoG
UFC	: Unité Formant Colonie
UJLoG	: Université Jean Lorougnon Guédé
URGEM	: Unité Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire
UV	: Ultra Violet
YEM	: Yeast extract mannitol
YEMA	: Yeast extract mannitol Agar
Z _G CI1	: Bactérie isolée de CI1 cultivé sur le sol de Zepréguhé
Z _G CI2	: Bactérie isolée de CI2 cultivé sur le sol de Zepréguhé
Z _G CI3	: Bactérie isolée de CI3 cultivé sur le sol de Zepréguhé
Z _G CI5	: Bactérie isolée de CI5 cultivé sur le sol de Zepréguhé
Z _G CI6	: Bactérie isolée de CI6 cultivé sur le sol de Zepréguhé
Z _K CI1	: Bactérie isolée de CI1 cultivé sur le sol de Zakoua
Z _K CI2	: Bactérie isolée de CI2 cultivé sur le sol de Zakoua
Z _K CI3	: Bactérie isolée de CI3 cultivé sur le sol de Zakoua
Z _K CI5	: Bactérie isolée de CI5 cultivé sur le sol de Zakoua
Z _K CI6	: Bactérie isolée de CI6 cultivé sur le sol de Zakoua

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Quelques aspects morphologiques du pois bambara	8
Figure 2 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ADNr 16S des Protéobacteries	15
Figure 3 : Echange de signaux dans l'interaction légumineuse-rhizobium	21
Figure 4 : Systèmes racinaires de légumineuses portant des nodules indéterminés (A) et nodules déterminés (B).....	23
Figure 5 : Mécanisme moléculaire de réduction de N ₂ en NH ₃ par la Nitrogénase	25
Figure 6 : Diagramme schématique montrant les mécanismes des RPCP	31
Figure 7: Présentation de la zone d'étude.....	54
Figure 8 : Graines de différents cultivars du pois bambara	56
Figure 9 : Dispositif de piégeage des rhizobactéries natives sur des sols de 5 provenances ..	59
Figure 10 : Traitement du substrat	66
Figure 11: Nodules du cultivar Ci3 du pois bambara en fonction des sols échantillonnés	77
Figure 12 : Aspect macroscopique des isolats sur milieu YEMA+ RC	79
Figure 13 : Aspect microscopique des isolats après coloration de Gram (G×100) au microscope électronique	79
Figure 14 : Gel d'agarose 1 % montrant l'amplification de l'ADNr 16S	89
Figure 15 : Séquences d'ADN de la souche RVC12 (A) et de RVC62 (B) sous format fasta .	90
Figure 16: séquences alignées entre 400 et 800 pb de quelques <i>Bacillus</i> du pois bambara et des souches de références des <i>Bacillus</i>	91
Figure 17 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ADNr 16S montrant les positions phylogénétiques des rhizobia locaux isolés du pois bambara.....	93
Figure 18: Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ADNr 16S montrant les positions phylogénétiques des endophytes isolés des nodules du pois bambara	97
Figure 19 : Réactions des rhizobia nodulant le pois bambara sur YEM + BTB.....	100
Figure 20 : Comportement des souches rhizobiales en présence des hydrates de carbone testés	101
Figure 21 : Systèmes racinaires des plantes des cultivars Ci3 et Ci5 du pois bambara	103
Figure 22 : Aspect des plantes du cultivar Ci3 en fonction des traitements	106
Figure 23 : Index relatif des rhizobia nodulant le pois bambara.....	110
Figure 24 : Efficience symbiotique relative des rhizobia nodulant le pois bambara	110
Figure 53 : Production de l'AIA par les bactéries nodulaires de <i>Vigna subterranea</i>	156

Figure 54: Solubilisation du phosphate par les bactéries nodulaires de <i>Vigna subterranea</i> ..	159
Figure 55 : Production de sidérophores par les bactéries nodulaires de <i>Vigna subterranea</i> sur LB solide + CAS	162
Figure 56 : Efficacité des inocula bactériens et des engrais sur la croissance des plantes du cultivar Ci3 du pois bambara	182
Figure 57 : Croissance des plantes inoculées et des plantes fertilisées du cultivar Ci3 du pois bambara 28 jours après inoculation	183
Figure 58 : Rendement en gousses des plantes inoculées et des plantes fertilisées du cultivar Ci3 du pois bambara	186

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Evolution du nombre des espèces décrites et validées dans le manuel de Bergey's entre 1980 et Mai 2020	17
Tableau II : Caractéristiques de cinq cultivars du pois bambara (<i>Vigna subterranea</i>)	57
Tableau III : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S	63
Tableau IV : Caractéristiques des produits agrochimiques utilisés.....	70
Tableau V : Nombre de nodules en fonction des cultivars de pois bambara et des sols échantillonnés.....	77
Tableau VI: Caractères morphologiques et biochimiques des bactéries associées au pois bambara piégées sur le sol de Bribouo	80
Tableau VII: Caractères morphologiques et biochimiques des bactéries associées au pois bambara piégées sur le sol de Toroguhé.....	81
Tableau VIII: Caractères morphologiques et biochimiques des bactéries associées au pois bambara piégées sur le sol de l'UJLoG	83
Tableau IX: Caractères morphologiques et biochimiques des bactéries associées au pois bambara piégées sur le sol de Zépréguhé	84
Tableau X: Caractères morphologiques et biochimiques des bactéries associées au pois bambara piégées sur le sol de Zakoua	85
Tableau XI: Caractéristiques des séquences de l'ADNr 16S des rhizobia du pois bambara....	92
Tableau XII: Caractéristiques des séquences de l'ADNr 16S des endophytes du pois bambara	96
Tableau XIII : Croissance des rhizobia en présence de différents hydrates de carbone et leurs réactions sur YEMA + BTB	101
Tableau XIV : Nombre et poids sec des nodules en fonction des souches rhizobiales.....	102
Tableau XV : Caractéristiques morpho-agronomiques des plantes en fonction du traitement	105
Tableau XVI : Nombre et poids sec des nodules en fonction du traitement	107
Tableau XVII : Biomasses des plantes en fonction du traitement	109
Tableau XVIII: Croissance des rhizobia à différentes concentrations de NaCl sur YEM solide	111
Tableau XIX : Croissance des rhizobia exprimée en DO à 0,01 % du NaCl (Témoin) sur YEM liquide	112
Tableau XX : Croissance des rhizobia exprimée en DO à 5 % du NaCl sur YEM liquide....	113

Tableau XXI: Croissance des rhizobia exprimée en DO à 6 % du NaCl sur YEM liquide ...	113
Tableau XXII: Croissance des rhizobia exprimée en DO à 7 % du NaCl sur YEM liquide ..	114
Tableau XXIII: Croissance des rhizobia exprimée en DO à 8 % du NaCl sur YEM liquide .	115
Tableau XXIV: Croissance des rhizobia exprimée en DO à 9 % du NaCl sur YEM liquide .	115
Tableau XXV: Croissance des rhizobia exprimée en DO à 7 % du NaCl sur YEM liquide ..	116
Tableau XXVI: Croissance des endophytes à différentes concentrations de NaCl sur YEM solide.....	117
Tableau XXVII: Croissance des endophytes exprimée en DO à 0,01 % du NaCl (Témoin) sur YEM liquide.....	119
Tableau XXVIII: Croissance des endophytes exprimée en DO à 5 % du NaCl sur YEM liquide	120
Tableau XXIX: Croissance des endophytes exprimée en DO à 6 % du NaCl sur YEM liquide	121
Tableau XXX: Croissance des endophytes exprimée en DO à 7 % du NaCl sur YEM liquide	122
Tableau XXXI: Croissance des endophytes exprimée en DO à 8 % du NaCl sur YEM liquide	124
Tableau XXXII: Croissance des endophytes exprimée en DO à 9 % du NaCl sur YEM liquide	125
Tableau XXXIII: Croissance des endophytes exprimée en DO à 10 % du NaCl sur YEM liquide	126
Tableau XXXIV: Croissance des rhizobia à différents pH sur milieu solide	127
Tableau XXXV : Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 3,5, sur YEM liquide	128
Tableau XXXVI : Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 4, sur YEM liquide	128
Tableau XXXVII : Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 5 sur YEM liquide	129
Tableau XXXVIII: Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 6,8 (Témoin) sur YEM liquide	130
Tableau XXXIX: Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 9 sur YEM liquide	131
Tableau XL: Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 10 sur YEM liquide	131
Tableau XLI: Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 11 sur YEM liquide	132
Tableau XLII : Croissance des endophytes nodulaires à différents pH sur milieu solide	134
Tableau XLIII: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 3,5 sur YEM liquide.....	136
Tableau XLIV: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 4 sur YEM liquide	137

Tableau XLV: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 5 sur YEM liquide.....	138
Tableau XLVI: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 6,8 (Témoin) sur YEM liquide	139
Tableau XLVII: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 9 sur YEM liquide	140
Tableau XLVIII: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 10 sur YEM liquide ..	142
Tableau XLIX: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 11 sur YEM liquide	143
Tableau L : Croissance des rhizobia à différentes températures sur milieu solide	144
Tableau LI : Croissance des endophytes à différentes températures sur milieu solide	146
Tableau LII : Croissance des rhizobia à la dose normale et à la ½ dose des engrais testés...	148
Tableau LIII : Croissance des endophytes à la dose normale et à la ½ dose des engrais testés	150
Tableau LIV : Croissance des rhizobia à la dose normale et à la ½ dose des pesticides testés	152
Tableau LV : Croissance des endophytes à la dose normale et à la ½ dose des pesticides testés	155
Tableau LVI: Capacité des rhizobia isolés du pois bambara à produire l'AIA	157
Tableau LVII : Capacité des endophytes isolés du pois bambara à produire l'AIA	158
Tableau LVIII : Capacité solubilisatrice de phosphate des rhizobia isolés du pois bambara .	160
Tableau LIX : Capacité solubilisatrice de phosphate des endophytes isolés du pois bambara	161
Tableau LX : Capacité productrice de sidérophore des rhizobia isolés du pois bambara	163
Tableau LXI : Capacité productrice de sidérophore des endophytes isolés du pois bambara	164
Tableau LXII : Paramètres de croissance des plantes inoculées et des plantes fertilisées du cultivar Ci3 du pois bambara	181
Tableau LXIII : Paramètres du rendement en gousses des plantes inoculées et des plantes fertilisées du cultivar Ci3 du pois bambara	185

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Milieu YEM	A
Annexe 2 : Marqueur de taille HyperLadder™ (I) 1kb Bioline.....	A
Annexe 3 : Préparation de la solution du BTB	B
Annexe 4 : Composition de la solution nutritive de Broughton & Dilworth sans azote des plantes	B
Annexe 5 : Réactif de Salkowsky	B
Annexe 6: Les valeurs de la gamme étalon D0 à 540nm en fonction de la concentration d'auxine	C
Annexe 7 : Composition du Milieu PVK	C
Annexe 8 : Réactif Vanadate-Molybdate	C
Annexe 9 : Les valeurs de la gamme étalon D0 à 405 nm en fonction de la concentration du phosphate	D
Annexe 10 : Réactif de CAS	E
Annexe 11: Liste des isolats constituant la collection des bactéries nodulaires du pois bamabra	F
Annexe 12: Test de tolérance des souches bactériennes à différentes concentrations de NaCl sur YEM solide	G
Annexe 13: Test de tolérance des souches bactériennes à différents pH sur YEM solide	H
Annexe 14: test de tolérance des souches bactériennes à différentes températures sur YEM solide.....	I

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La forte croissance démographique de ces dernières années est accompagnée d'une augmentation du cheptel d'animaux herbivores engendrant une forte demande en produits végétaux utiles à l'homme et à l'animal. La satisfaction de ces besoins nutritionnels a entraîné une forte pression sur les ressources en terres cultivables. Cette pression sur le couvert végétal influence la capacité des sols à produire la biomasse nécessaire aux besoins d'une population de plus en plus nombreuse (Bado, 2002).

Le manque de vision à long terme et la mauvaise gestion des territoires agricoles menacent la sécurité alimentaire (Djè *et al.*, 2005). Dans ce contexte, l'Afrique de l'Ouest s'est fixée comme objectifs prioritaires de la politique agricole, la fertilité des sols et l'amélioration de la productivité agricole (CORAF / WECARD, 2008). Alors qu'il apparaît nécessaire de maintenir une production agricole suffisante pour répondre aux besoins futurs, il est maintenant admis que le modèle proposé jusqu'à présent reposant sur l'utilisation massive de fertilisants chimiques, menace l'équilibre du cycle des nutriments et n'est pas une stratégie durable. Cette situation a fait émerger un nouveau paradigme correspondant à l'intensification de la production agricole tout en diminuant l'apport de fertilisants chimique (Griffon, 2006).

L'un des défis majeurs de l'agriculture ouest-africaine, notamment en Côte d'Ivoire, est de pouvoir assurer une productivité agricole élevée tout en préservant l'environnement. Ainsi, le changement de techniques culturales avec une politique agricole basée sur la bio-fertilisation et la lutte biologique sous diverses formes s'avère nécessaire pour un développement durable. Cette intensification écologique implique une augmentation durable de la production en substituant les facteurs industriels de production par des procédés biologiques ou en améliorant l'intégration des composants des systèmes de production comme la culture des légumineuses. Ces dernières souvent appelées «engrais vert» ont une contribution potentielle nette à la fertilité des sols et à la productivité des plantes (Bationo & Ntare, 2000 ; Fening *et al.*, 2011). Pour ces raisons, les légumineuses sont de plus en plus intégrées dans les systèmes de culture en raison de leurs multiples avantages (Stagnari *et al.*, 2017).

Les légumineuses constituent une source majeure de protéines pour l'alimentation humaine et animale (Terefework *et al.*, 2001). Elles contribuent à la fertilisation du sol grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec certaines bactéries du sol appelées rhizobium (Graham & Vance, 2003). Le résultat de cette symbiose spécifique est la formation d'un nouvel organe appelé « nodule » sur les racines ou les tiges, à l'intérieur duquel les rhizobia s'installent et se différencient en bactéroïdes. Ces derniers réduisent l'azote de l'air en ammoniac (NH_3)

INTRODUCTION

puis en ammonium (NH_4^+) assimilable par la plante et profitent des métabolites fournis par celle-ci afin d'assurer leur multiplication et l'énergie nécessaire à cette fixation symbiotique.

Les légumineuses peuvent établir d'autres associations avec d'autres types de microorganismes bénéfiques tels que les endophytes. Ces microorganismes colonisent les tissus internes de la plante sans présenter aucun signe externe d'infection ou d'effet négatif sur leur hôte (Holliday 1989, Schulz & Boyle, 2006). A côté des bactéries nodulantes, les nodules de légumineuses abritent d'autres bactéries non nodulantes appelées endophytes (Peix *et al.*, 2015). Malgré la haute spécificité de l'interaction légumineuse – rhizobium et l'environnement sélectif des nodules, les rhizobactéries nodulaires non rhizobiennes ont été rapportées (Li *et al.*, 2012). Les nodules racinaires qui étaient traditionnellement considérés comme la niche exclusive des rhizobia sont en cours de réexamen pour explorer la colonisation par plusieurs bactéries libres sans rapport avec la fixation symbiotique de l'azote (Bai *et al.*, 2002; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004). Les bactéries endophytes procurent beaucoup d'avantages à la plante et contribuent à l'amélioration de sa croissance (effet PGP : Plant Growth Promoting) *via* différents mécanismes : la production de phytohormones, l'amélioration de la disponibilité des minéraux, la production de sidérophores et la lutte biologique contre les phytopathogènes (Santoyo *et al.*, 2016).

Pourtant, les légumineuses occupent une place assez modeste parmi l'ensemble des productions vivrières à cause du niveau faible et instable de leur rendement et des difficultés de conservation des récoltes. Aussi, beaucoup d'espèces ou de variétés sont-elles sous-exploitées et en voie de disparition tel que le pois bambara qui est une légumineuse riche en protéine mais très peu connu (Klu *et al.*, 2001 ; Basu *et al.*, 2007).

Le pois bambara (*Vigna subterranea* L.) est une légumineuse alimentaire indigène africaine (Begemann, 1988). C'est une plante hautement calorique (387 kcal/100 g), riche en vitamines et en éléments minéraux et très équilibrée en protéines (Ucciani *et al.*, 1963). Les graines sèches du pois bambara renferment 18 à 25 % de protéines, 6 à 8 % de lipides, 50 à 57 % de glucides, 3 à 6 % de celluloses et 3 à 4 % de sels minéraux (Brough *et al.* 1993). Le pois bambara figure parmi les légumineuses cultivées les plus tolérantes à la sécheresse, à la salinité, et au sol infertile (Suwanprasert *et al.*, 2006 ; Taffouo *et al.*, 2010). La plante est capable de fixer, en plantation, jusqu'à 106 kg d'azote par hectare. Elle améliore donc la fertilité du sol à travers la fixation symbiotique de l'azote (Mukurumbira, 1985). Malheureusement, peu d'études concernant cette plante ont été effectuées. Pourtant une technologie d'inoculation utilisant des rhizobactéries associées au pois bambara pourrait être initiée en Côte d'Ivoire et constituer une

INTRODUCTION

alternative à l'utilisation des produits agrochimiques pour accroître sa production et revaloriser sa culture.

Les études sur la diversité des bactéries associées au pois bambara sont rares (Onyango *et al.*, 2015). Très peu d'études ont été menées sur l'identification des bactéries associées au pois bambara dans les sols africains, à l'exception de quelques études qui ont montré que le pois bambara est nodulé par des espèces du genre *Bradyrhizobium* (Grönemeyer *et al.*, 2014; Puoza *et al.*, 2017; Ibny *et al.*, 2019). En Côte d'Ivoire, les travaux effectués sur le pois bambara (*Vigna subterranea*) ont concerné essentiellement la caractérisation des différents morphotypes (Djè *et al.*, 2005). Seuls Gnanoui *et al.* (2019) ont rapporté que des espèces de *Rhizobium pusense* nodulent le pois bambara dans le sol de Côte d'Ivoire.

Les nombreux intérêts nutritionnels et agronomiques du pois bambara et la possibilité d'utiliser les bactéries qui lui sont associées comme bio-fertilisants ont motivé cette étude.

Ainsi, l'objectif général de cette étude est de contribuer à l'amélioration de la productivité du pois bambara (*Vigna subterranea* L.) et à la promotion de sa culture par l'utilisation d'inocula à base de bactéries autochtones et efficaces.

De façon spécifique, il s'agira de :

- (1) Constituer une collection hétérogène de bactéries nodulaires du pois bambara;
- (2) Identifier et décrire la diversité génétique des bactéries qui colonisent les nodules du pois bambara ;
- (3) Analyser les variations phénotypiques entre les souches bactériennes et sélectionner de candidats efficaces pouvant booster la productivité du pois bambara et la fertilité du sol ;
- (4) Déterminer l'efficacité des souches bactériennes (engrais biologiques) par rapport aux engrais azotés de synthèse sur le développement et le rendement du pois bambara.

Le présent manuscrit est composé de trois parties. La première fait une synthèse de la littérature sur le pois bambara, les rhizobia, la symbiose rhizobia-légumineuse, les endophytes nodulaires, les activités promotrices de croissance des plantes, la taxonomie bactérienne, la phylogénétique moléculaire, les facteurs limitant les activités promotrices de croissance des plantes. La deuxième renferme la présentation de la zone de l'étude, le matériel utilisé et de la méthodologie adoptée pour la mise en œuvre de ce travail. La troisième fait mention des résultats obtenus et de la discussion de ces résultats. Une conclusion générale accompagnée de recommandations

INTRODUCTION

et perspectives de recherches, ainsi que la liste des références consultées mettent fin au document.

Première Partie : GENERALITES

1- Pois Bambara [*Vigna subterranea* (L.) Verdc.]

1.1- Aperçu général

Le pois bambara (*Vigna subterranea*) est aussi appelé voandzou, pois de terre, pistache malgache ou pois souterrain en français et est désigné par bambara groundnut ou earth pea en anglais (Borget, 1989). C'est une légumineuse alimentaire sous-utilisée dont la culture se fait dans les zones localisées dans différents pays de l'Afrique de l'Ouest (Klu *et al.*, 2001). Le pois bambara est cultivé principalement par les femmes pour lesquelles il assure une source de revenus pour le ménage (Djè *et al.*, 2005). Cette légumineuse mineure d'Afrique Sub-saharienne est adaptée à diverses conditions climatiques et écologiques (Djè *et al.*, 2005). Le pois bambara est capable de croître sur des sols pauvres et un rendement optimal peut être atteint sur des sols fertiles avec une pluviométrie autour de 900-1200 mm d'eau (Kishinevsky *et al.*, 1996). Les fermiers l'utilisent dans les rotations culturales comme source d'azote résiduel pour les cultures suivantes et ses graines contiennent une teneur élevée en acide aminé comme la lysine (Ntundu *et al.*, 2006). En dépit de ses nombreux avantages, le voandzou a été peu étudié et est très peu représenté dans les collections mondiales des ressources phytogénétiques (Eyzaguirre *et al.*, 1997). Le potentiel génétique de l'écotype ou variété de voandzou est mal connu et les quelques travaux déjà réalisés ne sont disponibles que dans les anciennes publications ou de langues peu connues (Heller *et al.*, 1995).

1.2- Origine et distribution

Le pois bambara a été découvert en Afrique, précisément au Mali, dans une tribu appelée "Bambara" d'où son nom "bambara groundnut" (Begemann, 1988). Cependant, selon Dalziel (1935) et Brink *et al.* (2006), son bassin d'origine s'étend du plateau de Jos (Nord-Est du Nigeria) à Garoua (Nord du Cameroun). Son utilisation en tant que légume sec en Afrique de l'Ouest a été rapportée par des voyageurs arabes au XIV^e siècle. La culture a d'abord été introduite en Afrique de l'Est puis en Madagascar, ensuite au Sud et Sud-Est de l'Asie, puis au Suriname et au Brésil avec la traite des esclaves (Hanelt, 2001). Son importance a diminué suite à l'introduction de l'arachide en provenance des tropiques du "Nouveau Monde" (Duteurtre, 2010). Cette légumineuse est principalement cultivée dans les régions tropicales au Sud du Sahara mais il est maintenant très cultivé à Madagascar. Les principaux pays producteurs sont le Nigéria, le Niger, le Mali, le Ghana, le Burkina Faso et la Côte d'Ivoire. En Asie, la culture est pratiquée en Inde, en Indonésie, en Malaisie, aux Philippines et en Australie dans la partie Nord (Touré, 2007).

1.3- Taxonomie

Le voandzou a été mentionné pour la première fois dans la littérature au XVII^e siècle sous le nom de "mandubi d'Angola" (Goli, 1997). La plante a été nommée *Glycine subterranea* par Linné en 1763. Par la suite en 1806, *Voandzeia subterranea* (L) a été proposé par Dupetit après la découverte de la plante à Madagascar. Maréchal *et al.* (1978), ont trouvé une similarité entre la plante et les espèces du genre *Vigna*. Cette étude a été confirmée par Verdcourt (1980) d'où l'appellation actuelle, *Vigna subterranea* (L).

Règne	: Végétal
Embranchement	: spermaphytes
Sous-embranchement	: Angiospermes
Classe	: Magnoliopsida
Sous-classe	: Rosidea
Ordre	: Fabales
Superfamille	: Leguminoaseae
Famille	: Fabaceae
Sous-famille	: Faboideae
Genre	: <i>Vigna</i>
Espèce	: <i>Vigna subterranea</i>

1.4- Description botanique

Le pois bambara est une Dicotylédone appartenant à la famille des Fabaceae (Touré, 2007). La racine est pivotante et porte des nodules caractéristiques des légumineuses. La plante a une hauteur variant de 20 à 30 cm (Djè *et al.*, 2005). Les feuilles sont alternes et trifoliolées, à faible pilosité (Figure 1 A). Les fleurs de couleurs variables allant du blanc jaunâtre, jaune franc au rose-rougeâtre. Elles sont formées de carèmes droits, tronqués d'un style courbé, d'un stigmate latéral court et petit. Les gousses possèdent une paroi dure de couleur jaunâtre à la maturité, et renferment une à deux graines rarement trois (Figure 1 B). Les graines de couleurs variables allant du blanc, rouge, beige, noir, etc, ont un tégument épais et dur. Elles ont une forme sphérique ou ovoïde. Leur diamètre varie de 8 à 14 mm et l'on peut dénombrer 1200 à 1700 graines par kilogramme de graines sèches (Figure 1 C) (Linnemann, 1987).

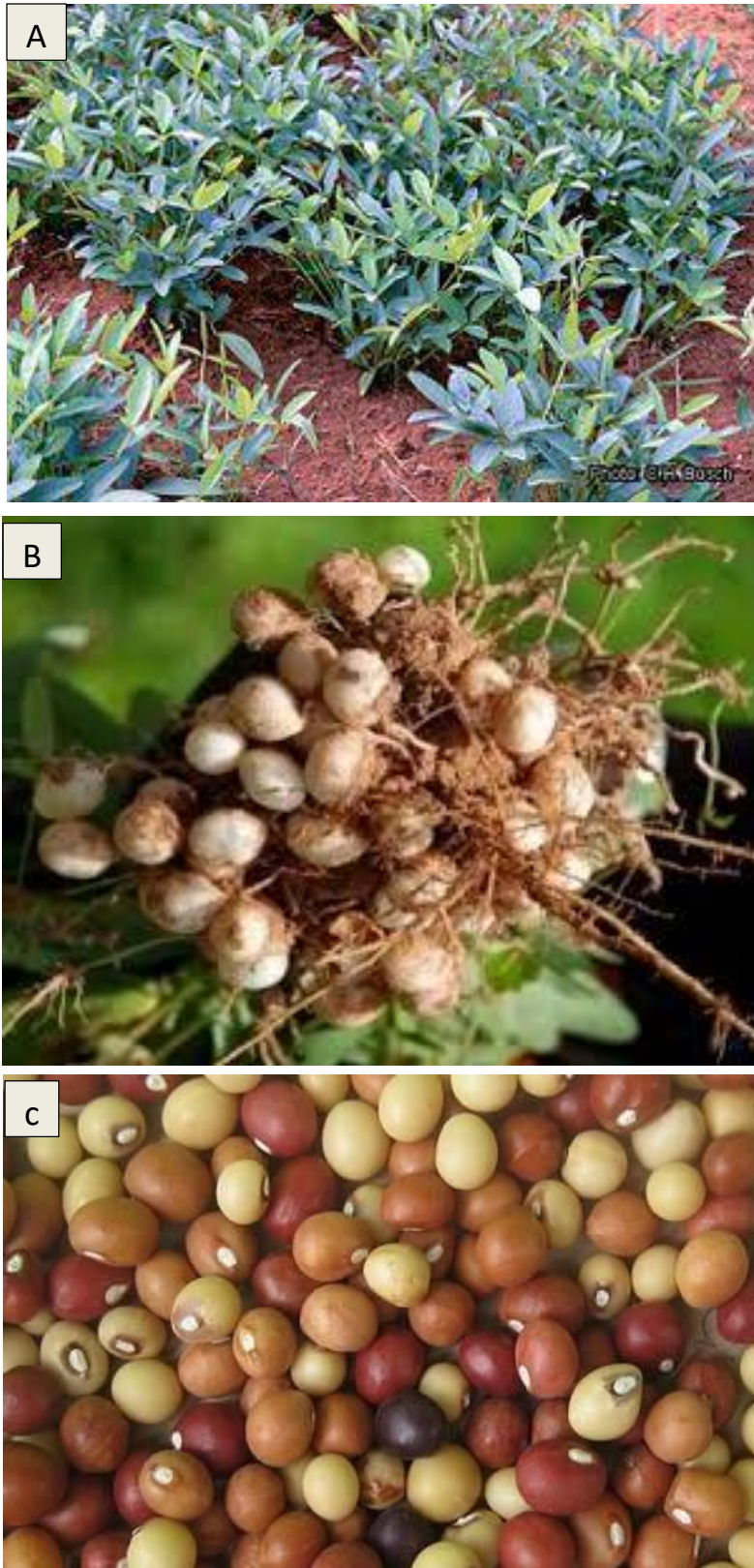


Figure 1: Quelques aspects morphologiques du pois bambara (Brink *et al.*, 2006)

(A): Plante, (B): Gousses, (C): Graines

1.5- Etappes de développement

Le voandzou est préférentiellement annuel, autogame mais des fécondations croisées sont observées entre certaines variétés. La période de fécondation est marquée par l'intervention de deux espèces de *Formicidae* (*Pheidole megacephala* Fabricius et *Monomorium pharaonis* Linnaeus) qui facilitent la nouaison et la pénétration des gousses dans le sol. La principale voie de reproduction de la culture est celle de la multiplication par graines. La germination du voandzou est de type hypogé. Le taux de germination dépend de la quantité d'eau disponible, de la température, de la variabilité génétique, de la taille et de l'âge des graines (Massawe *et al.*, 2005). Les plantules émergent entre 6 à 15 jours après semis (Djè *et al.*, 2005). La floraison intervient entre 35 et 45 jours après semis. La formation des gousses se fait pendant les 30 premiers jours après la fécondation. Celle des graines commence dès que la gousse a atteint sa forme définitive et dure 10 jours. L'apparition des taches brunes à la surface des gousses et le jaunissement du feuillage sont quelques signes qui indiquent la maturité physiologique des gousses. Selon les écotypes, le cycle de culture varie de 3 à 9 mois au maximum (Karikari, 2000). Il peut croître sur des sols pauvres, sablonneux avec une pluviométrie de 600 à 700 mm, aussi bien sur des sols limoneux ou des sols limoneux argileux (Linnemann, 1987). Les sols à pH variant entre 5 et 6,5 sont les plus propices (Haq, 1983).

1.6- Composition chimique des graines

Les graines pois bambara est une plante hautement calorique (387 kcal/100 g), riche en vitamines et en éléments minéraux et très équilibrée en protéines (Ucciani *et al.*, 1963). Sa composition chimique est intermédiaire entre le soja et le haricot. Les graines sèches du pois bambara renferment 18 à 25 % de protéines, 6 à 8 % de lipides, 50 à 57 % de glucides, 3 à 6 % de celluloses et 3 à 4 % de sels minéraux (Brough *et al.* 1993). Ces graines contiennent aussi des vitamines telles que les vitamines B1, B2, PP, des traces de vitamines A et C, riches en méthionine, et renferment également différents types d'acides gras tels que l'acide palmitique (24,1 %), l'acide vaccénique (1,7 %), l'acide linoléique (40,4 %) etc. Elles renferment aussi 25 à 30 % d'acide gras insaturées (Duke *et al.*, 1977). Les protéines contenues dans les graines de voandzou ont une teneur élevée en lysine et leur association avec les céréales dans l'alimentation, constitue un complément nutritionnel pour de nombreuses populations locales qui ne peuvent faire face aux coûts élevés des protéines animales (Massawe *et al.*, 2005).

1.7- Usages

Les graines du pois bambara sont utilisées pour la consommation humaine. Les graines non mures sont bouillies et consommées après avoir ajouté du sel et du poivre. Les graines mures et sèches sont grillées et transformées en farine qui peut être mélangée avec celles des céréales telles que le maïs (*Zea mays*), le mil (*Pennisetum glaucum L.*) pour la confection de gâteaux (Jacquat, 1990). Selon Anyika *et al.* (2009), lorsque les graines sont convenablement combinées aux céréales, la qualité des protéines obtenues peut être aussi bonne que la caséine ou d'autres sources animales de protéine sinon meilleure. En Afrique subsaharienne, les extraits des graines sont utilisés dans la fabrication des produits cosmétiques tels que les lotions, les shampooings et les crèmes (McGown, 2006). Le voandzou sert également de nourriture au bétail, de fourrage et d'engrais vert. L'imbibition des graines avant la cuisson entraîne la diminution de la quantité de certains minéraux tels que le potassium, le zinc, le cuivre et la perte totale du manganèse. Cependant, certains minéraux tels que le sodium, le calcium, le magnésium, le fer et le phosphore ne sont pas affectés par ces traitements (Abdulsalami & Sheriff, 2010). Les feuilles, les fleurs, les racines et même les graines sont utilisées en médecine traditionnelle. Elles servent à traiter de nombreuses maladies telles que la bilharziose, l'épilepsie, la tuberculose et l'impuissance sexuelle (Ouedraogo, 1996). En Côte d'Ivoire, les graines sont aussi utilisées dans les traitements de l'anémie (Koné *et al.*, 2011). Le voandzou peut être utilisé en association ou en rotation culturale pour améliorer la fertilité des sols (Murukumbira, 1985).

1.8- Importance agronomique et écologique

La culture du pois bambara contribue à la fertilisation du sol à travers la fixation symbiotique de l'azote en association avec les bactéries du genre *Rhizobium* (Murukumbira, 1985). L'azote fixé par le pois bambara peut être utilisé d'abord par la plante elle-même, puis par les cultures suivantes. Utilisé en rotation ou en association comme engrais vert dans les systèmes de culture, le pois bambara apporte une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique dans le système (Peoples & Craswell, 1992). Les résidus du pois bambara sont plus riches en azote et contribuent à enrichir le sol en cet élément (Ndiaye, 1996). Les cultures succédant au pois bambara peuvent bénéficier indirectement de l'azote fixé par l'entremise des résidus laissés par la légumineuse, ce qui contribue à augmenter généralement les rendements des cultures non fixatrices d'azote (Peoples & Craswell, 1992). Le voandzou figure parmi les légumineuses cultivées les plus tolérantes à la sécheresse, à la salinité, et au sol infertile (Suwanprasert *et al.*, 2006 ; Taffouo *et al.*, 2010). Ces observations indiquent la

potentialité du *Vigna subterranea* à augmenter sa production via l'optimisation de la fixation symbiotique de l'azote et que la nodulation de *Vigna subterranea* est principalement dépendant de l'azote atmosphérique même en milieu riche en NO_3^- (Dakora & Muofhe, 1997).

1.9- Contraintes et limites de production

L'ensoleillement est nécessaire pour une bonne production de graines ; sous ombrage excessif, la production est médiocre. Le rendement du voandzou est réduit par une trop forte humidité du sol au cours de son développement (Ameyaw & Doku, 1983). Il y a aussi la sécheresse, le faible niveau de fertilité et d'acidité des sols qui sont à la base des chloroses, flétrissements et des chutes des feuilles. Les dégâts dus aux bio-agresseurs entraînent une baisse de la production voire une perte totale de la récolte si aucune mesure n'est prise (Ngamo & Hance, 2007); Bien que plus résistant aux maladies que les autres légumineuses, le voandzou montre des baisses de rendement à la suite des attaques par les insectes (Dike, 1997). *Vigna subterranea* résiste aux maladies et aux insectes nuisibles, mais dans certaines conditions, peut être soumis aux attaques de certains champignons, nématodes, insectes et virus. La conséquence directe de ces attaques est l'apparition de maladies et d'importantes baisses de rendements (Toure, 2016).

1.10- Maladies et ravageurs

Il existe au sein de la microflore tellurique, des populations phytopathogènes responsables de maladies graves telles que les fontes de semis, les nécroses et galles racinaires, les pourritures et les maladies vasculaires. Cependant, le pois bambara, en champ, est attaqué par des ravageurs dont les plus importants sont les pucerons (*Aphis craccivora* Koch), les foreurs de gousses (*Maruca* sp.) et les thrips des fleurs (*Megalurothrips sjostedti trybom*) (Ezedinma & Maneke, 1985; Goli, 1997). On a les maladies comme les taches foliaires (Leafspot) provoquées par *Cercospora canescens* et *Phyllosticta voandzeia* ; la fanaison et le jaunissement du pois bambara sont causés par *Fusarium* sp. qui peut apparaître 50 jours après l'ensemencement. Le mildiou poudreux (Powdery mildew) causé par *Erysiphepisi*, se caractérise par l'apparition de poudre blanchâtre sur les deux côtés des feuillettes (Cook, 1978). Les insectes sont les principaux ravageurs qui dégradent qualitativement et quantitativement les graines du pois bambara au cours du stockage (Costa *et al.*, 2006). L'attaque des ravageurs et en particulier les bruches débute en champ et s'intensifie dans les modules de stockage où ces derniers perforent les grains en laissant plusieurs orifices (Singh *et al.*, 1997). Trois catégories d'insectes attaquent le voandzou au cours du stockage. *Callosobruchus maculatus* et *Callosobruchus subinnotatus* sont des ravageurs primaires, capables de s'attaquer aux graines saines, alors que *Tribolium*

castaneum, *Coleoptera* : *Tenebrionidae* est un ravageur secondaire parce qu'il ne s'attaque qu'aux graines déjà dépréciées. La troisième catégorie est celle des parasitoïdes. Deux ptéromalides (*Hymenoptera* : *Pteromalidae*) ont été extraits des graines : *Anisopteromalus calandrae* et *Dinarmus basalis*. Le traitement des graines par des huiles essentielles permet de réduire les dégâts causés par les ravageurs de denrées stockées (Ajayi & Lale, 2001).

1.11- Pratique culturale

La plante est généralement cultivée par les femmes en association avec le maïs (*Zea mays*), le mil (*Pennisetum gfaucum*), le sorgho (*Sorghum bicolor* L.), le manioc (*Manihot esculenta* Kranz), l'igname (*Dioscorea spp*), l'arachide (*Arachis hypogaea*) et le niébé (*Vigna unguiculata*) (Goli, 1997; Karikari *et al.* 1997). Les sols de faibles pentes ou plats sont recommandés pour la culture du voandzou. Les semis se font sur des buttes, des billons, des planches ou directement sur des surfaces planes (Linnemann, 1987). Le recouvrement des gousses par de la terre 30 à 60 jours après semis permet d'améliorer le rendement de 32,3 à 61,9 % par rapport au témoin (Mhungu & Chiteka, 2010). La date de semis joue également un rôle important dans la pratique culturale. La formation des gousses et leur maturité peuvent être affectées par le semis précoce ou tardif. Généralement, les semis réalisés en début de saison des pluies permettent d'obtenir des rendements élevés. Les semis sont directs et se font en poquets de 2,5 cm de profondeur sur des sols lourds ou 5 à 7,5 cm sur des sols sableux (Linnemann, 1987). Au niveau des billons sur une ligne de semis, l'écartement minimum est de 20 à 25 cm. La distance entre les lignes est de 45 cm au maximum pour les morphotypes érigés et semis-érigés et de 2,5 m pour les types rampants. En parcelle expérimentale, la densité recommandée varie de 6 à 29 plantes/m² (Rassel, 1960). La densité de semis dépend du type de ports des morphotypes (Kouassi & Zoro Bi, 2011). Généralement, les paysans n'utilisent pas de fertilisants pour améliorer le rendement du voandzou. Jusqu'en 1999, l'apport d'engrais pour l'amélioration du rendement n'avait toujours pas été confirmé (Gaebewe, 1999). Mais, récemment, les études menées par Ellah & Singh (2008) ont montré que l'apport de 30 kg/ha de phosphore pendant la phase de croissance a permis d'améliorer le rendement de certains écotypes. Ces rendements sont passés de 491 à 543 kg/ha. La récolte se fait à la maturité des gousses. Cette maturité se reconnaît par le jaunissement des parties aériennes de la plante, à la chute des feuilles et à l'apparition de taches brunes sur les gousses (Linnemann, 1987). La récolte se fait en arrachant la plante et en récupérant les gousses enfouies dans le sol. Après la récolte, les graines sont séchées et conservées de façon traditionnelle dans des pots en présence de cendre (Drabo *et al.*, 1997) ou dans du sable mélangé avec la poudre de tabac (*Nicoïiana*

tabacum L.) ou de piment (*Capstcum frutescens* L.).

1.12- Situation de la culture en Côte d'Ivoire

En Côte d'Ivoire, la culture du pois bambara est localisée à l'Ouest et dans la partie Nord du pays. Ces zones sont caractérisées par des conditions agro-écologiques contrastées incluant la forêt tropicale humide et la savane plus sèche. Dans ces zones, le voandzou joue un rôle important dans l'alimentation et la culture de ces populations (Djè *et al.*, 2005). Sa production dépasse la demande locale et l'excédent est acheminé dans la capitale par les grossistes où il est vendu sur les marchés par des détaillantes. L'espèce *Vigna subterranea* L. est cultivée dans toute son aire de distribution sous forme de variétés traditionnelles. Les classifications traditionnelles des variétés dans les différentes régions sont établies principalement sur la base des couleurs du tégument des graines et secondairement selon la croissance de la plante et la durée du cycle (Linnemann & Azam-Ali, 1993). On parle alors de types morphologiques ou morphotypes. Certains morphotypes sont spécifiques de régions données alors que d'autres sont distribués dans l'ensemble des régions de production (Djè *et al.*, 2005).

2- Rhizobia

2.1- Aperçu général

L'azote est un élément essentiel pour tous les organismes vivants, nécessaire pour les différentes cultures aussi bien pour leur qualité que pour le rendement agricole. Il est abondant dans la nature sous forme de diazote (N_2) non assimilable par les plantes. Les procaryotes en général, et spécialement les rhizobia (Frank, 1889), ont la capacité de former des nodules sur les racines des légumineuses (occasionnellement sur les tiges) et possèdent un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote atmosphérique N_2 en ammoniac NH_3 . Ce processus permet de satisfaire complètement ou partiellement les besoins en azote de la plante hôte. La fixation biologique de l'azote par différents membres des procaryotes, en particulier les diazotrophes, contribue à environ 16 % de l'apport total d'azote dans les terres cultivées (Ollivier *et al.*, 2011).

Le terme «rhizobia» est dérivé du nom du genre *Rhizobium*, qui signifie « ce qui vit dans les racines » (Zakhia *et al.*, 2004). À l'origine, le terme «rhizobia» a été utilisé pour désigner les bactéries appartenant au genre *Rhizobium*. De nos jours, le terme général de rhizobium recouvre une grande diversité bactérienne, avec 14 genres et 50 espèces décrits (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001). Rhizobium est le nom communément attribué aux bactéries capables de former des nodules et de fixer l'azote en symbiose avec les légumineuses, alors que

“*Rhizobium*” est un genre bactérien. Seule une partie de ces rhizobia appartient à ce genre et de nouveaux genres ont été identifiés, tels que *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988) et *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997). Selon la classe des symbiotes, le groupe formé par les rhizobia n'est pas monophylétique, il est classé en α et β -rhizobia (Moulin *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003).

Du point de vu évolutif, Deschodt & Strijdom (1976) ont supposé que la fixation de l'azote est une fonction largement répandue et ancestrale chez les eubactéries et les archées. Cependant, la nodulation est apparue au cours de l'évolution, depuis 70 à 130 millions d'années, avec l'apparition des légumineuses sur terre. À cette époque, les α et β -protéobactéries et les différentes lignées rhizobiales avaient déjà divergé. Ainsi les gènes responsables de la nodulation des légumineuses étaient acquis par transfert latéral à partir d'une source indéfinie, convertissant les saprophytes du sol en symbiotes (Sullivan & Ronson, 1998; Galibert *et al.*, 2001; Hirsch *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003).

2.2- Taxonomie

Dans la classification initiale des bactéries selon la Société Américaine de Microbiologie (ASM) les rhizobia sont décrits comme étant des bacilles Gram négatif (-), aérobies, non-sporulés et le principal critère était leur capacité à noduler la plante hôte (Bergey & Breed, 1957). Ces dernières années, la classification des rhizobia a connu un changement substantiel, en raison de l'ajout de plusieurs nouveaux genres et espèces à ce groupe bactérien (Figure 2). Une grande diversité des bactéries fixatrices d'azote a été isolée de différentes légumineuses. Ainsi, 98 espèces réparties sur 13 genres de α et β protéobactéries (Weir, 2016), constituent l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes des légumineuses. Il est important de noter qu'il existe d'autres espèces non-classées *Rhizobium*, comme le cas de *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) incapable de former des nodosités efficaces, sauf dans le cas où il contient un plasmide symbiotique (Velázquez *et al.*, 2005).

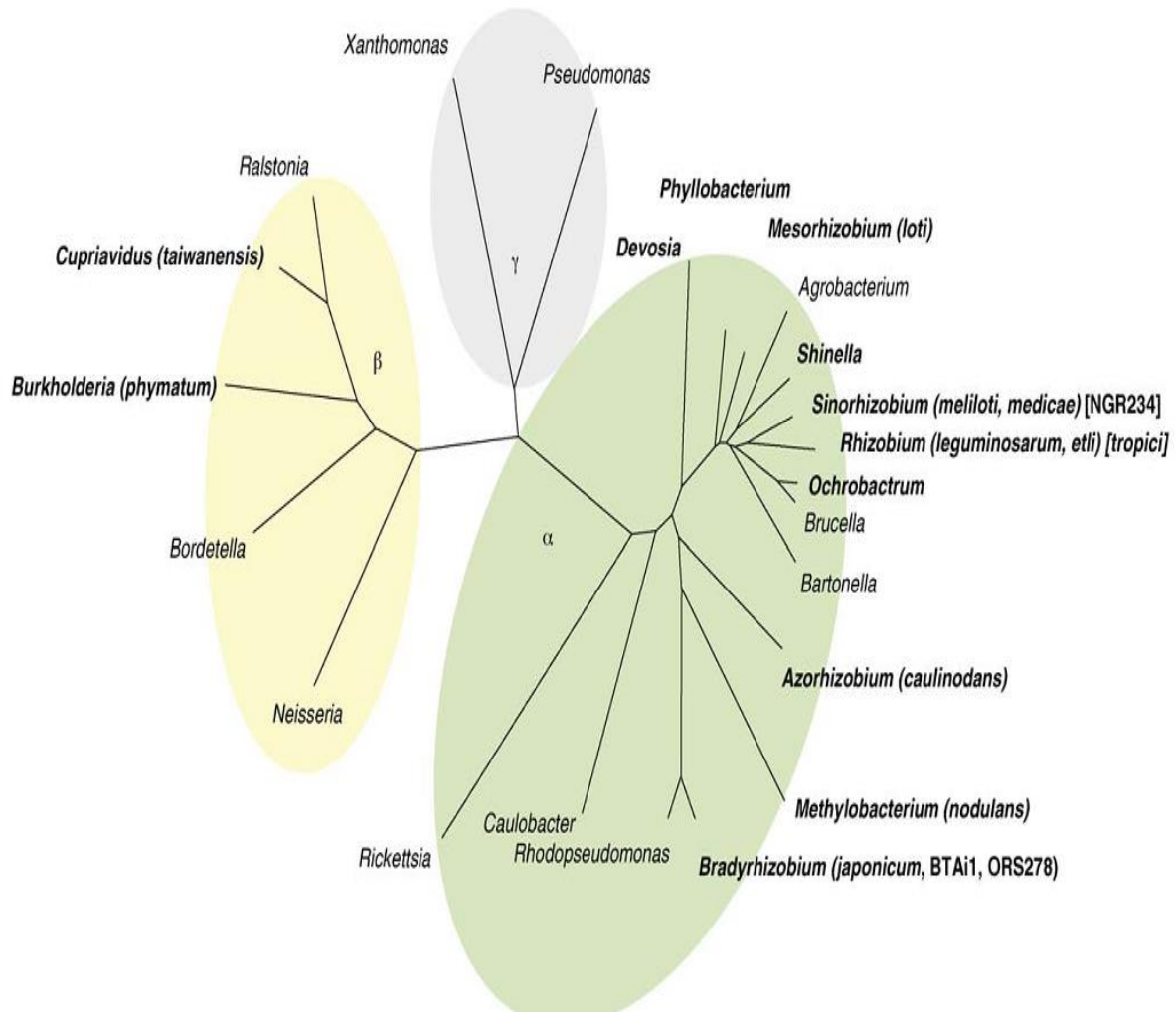


Figure 2 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ADNr 16S des Protéobacteries (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

Cet arbre phylogénétique montre la distribution des genres bactériens nodulants (en caractère gras) dans les classes α -protéobactéries et β -protéobactéries.

2.2.1- α -rhizobia

Selon le manuel de Bergey, la capacité à noduler la plante hôte est le principal critère de classification des rhizobia, cependant les bactéries ayant les mêmes caractères morphologiques excepté la nodulation ne faisaient pas partie de ce genre. Par la suite, la gamme d'hôte de nodulation et le comportement de la souche dans les milieux de culture ont également été pris en considération. Fred *et al.* (1932) ont utilisé comme critère de classification la croissance bactérienne dans différents milieux pour classer les rhizobia à croissance rapide et les rhizobia à croissance lente (Young *et al.*, 1996).

Skerman *et al.* (1989) s'est basé sur le nom de la plante hôte pour nommer et introduire quatre nouvelles espèces *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. trifoli* et *R. meliloti*. Tandis que Jordan

Première partie : GENERALITES

(1984) a utilisé la taxonomie numérique (Sneath & Sokal, 1973), le contenu de l'ADN en GC (GC%), la composition extracellulaire, le type de métabolisme, les bactériophages, la sensibilité aux antibiotiques, la composition en protéines et d'autres critères pour proposer le nouveau genre *Bradyrhizobium* dans la famille des *Rhizobiaceae* et réorganiser les espèces décrites précédemment. *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. trifoli* ont été regroupées dans une seule espèce « *R. leguminosarum* » alors que *R. meliloti* et *R. loti* sont restés dans le genre *Rhizobium*, et tous les rhizobia à croissance lente ont été classés dans le genre *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984). Huit genres de α -rhizobia nodulants différentes légumineuses ont été décrits : *Agrobacterium* (Conn, 1942), *Allorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1998), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Bradyrhizobium* (Jordan *et al.*, 1982; 1984), *Ensifer* (*Syn. Sinorhizobium*) (Chen *et al.*, 1988) et *Rhizobium* (Frank, 1889), et récemment les genres reclassifiés : *Neorhizobium* et *Pararhizobium* (Mousavi *et al.*, 2014,2015).

D'après la liste validée et publiée de Skerman *et al.* (1980), il est devenu nécessaire de valider toutes les espèces bactériennes nouvellement décrites par une publication dans le journal IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology). Le nouveau genre *Bradyrhizobium* proposé par Jordan (1984) a bien été publié dans le manuel de Bergey, mais non validée par le journal IJSEM. Toutefois, cette classification est restée valide jusqu'à 2008, lorsque Ramírez-Bahena *et al.* (2008) ont utilisé les caractères moléculaires et phénotypiques pour réviser le statut taxonomique de *R. trifoli*, *R. phaseoli* et *R. leguminosarum*. Il a été démontré que *R. leguminosarum* DSM 30132 est une espèce distincte nommée *Rhizobium pisi*. Willems (2006) a inclus les genres *Methylobacterium* et *Devosia* dans le groupe des α -rhizobia. Récemment en 2015, l'espèce *R. lupini* décrite en 1980, a aussi été reclassifiée grâce à l'analyse moléculaire et renommée *Bradyrhizobium lupini*. Il s'est avéré que le gène ADNr 16S de *R. lupini* est identique à celui de *Bradyrhizobium japonicum* mais différent du genre *Rhizobium* (Mousavi *et al.*, 2015). Ainsi, les analyses moléculaires ont permis d'identifier de nouveaux genres et espèces, permettant d'alimenter de manière exponentielle le Manuel de Bergey's (Tableau I).

Première partie : GENERALITES

Tableau I : Evolution du nombre des espèces décrites et validées dans le manuel de Bergey's entre 1980 et Mai 2020

Familles	Genres	Le nombre des espèces							
		1980	81-85	86-90	91-95	96-00	01-06	07-15	16-20*
Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium</i>	4	4	5	5	5	5	5	17
Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	6	7	7	10	10	16	72	117
Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>		1	1	3	3	7	27	52
Phyllobacteriaceae	<i>Phyllobacterium</i>		2	2	2	2	8	11	13
Rhizobiaceae	<i>Ensifer (syn.)</i>			2	5	8	11	15	21
Hyphomicrobiaceae	<i>Azorhizobium</i>			1	1	1	2	3	3
Phyllobacteriaceae	<i>Aminobacter</i>				3	3	5	6	6
Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium</i>					7	11	30	56
Rhizobiaceae	<i>Allorhizobium</i>					1	1	1	7
Hyphomicrobiaceae	<i>Devosia</i>					1	3	15	27
Rhizobiaceae	<i>Shinella</i>						3	6	8
Rhizobiaceae	<i>Neorhizobium</i>							3	3
Rhizobiaceae	<i>Pararhizobium</i>								6

Source : www.bacterio.net (* espèces validées)

2.2.2- β -rhizobia

Les β -rhizobia ont été décrits pour la première fois comme nodulants des légumineuses par Chen *et al.* (2001) et Moulin *et al.* (2001), chose qui n'a pas été universellement acceptée immédiatement (van Berkum *et al.*, 2003). Moulin et ses collaborateurs ont conclu que deux *Burkholderia* (STM678 et STM815) possédant le gène *nodA* avaient été respectivement isolées à partir des nodosités d'*Aspalathus carnosa* en Afrique du Sud et *Machaerium lunatum* en Guyane française. Parallèlement à cette étude, Chen et ses collaborateurs ont isolés *Cupriavidus taiwanensis* à partir des nodosités de *Mimosa pudica* et *Mimosa diplotricha* au Taiwan. Cependant la preuve concluante du pouvoir infectif et de la fixation de l'azote par les β -rhizobia provient de Chen *et al.* (2003). Ces auteurs ont marqué la souche *Cupriavidus taiwanensis* par une protéine fluorescente (GFP) dans le but d'effectuer une analyse microscopique détaillée du processus de nodulation chez ses hôtes Mimosa. Par la suite plusieurs études ont confirmé la

nodulation efficace des β -protéobactéries. Parmi ces études, *Burkholderia* nodulante de Mimosa au Brésil (Chen *et al.*, 2005), *Burkholderia* et *Cupriavidus taiwanensis* nodulantes de *Mimosa pigra*, ont été confirmées par le séquençage des gènes *nodA* et *nifH* (Gyaneshwar *et al.*, 2011). Plusieurs β -rhizobia ont été décrits par la suite comme symbiotes des légumineuses ; *Burkholderia tuberum* associé aux légumineuses tropicales (Vandamme *et al.*, 2002), différentes espèces de la tribu des *Mimoseae* natives du Brésil nodulées par *Burkholderia phymatum* (Bournaud *et al.*, 2013). Aussi, en Afrique du sud, des espèces de *Burkholderia* associées aux *Papilionoideae* endémiques (Beukes *et al.*, 2013), au Maroc, *Burkholderia* a été isolée à partir des nodosités de *Phaseolus vulgaris* et a montré un pouvoir fixateur d'azote chez des espèces de *Mimosa*, *Acacia* et *Prosopis* (Talbi *et al.*, 2010). En comparant les gènes symbiotiques (*nodABCD*, *nifH*), il s'est avéré qu'un pourcentage de similarité très élevé est présent entre β et les α -rhizobia. Ainsi Rivas *et al.* (2009) ont supposé que les β -rhizobia ont acquis les gènes symbiotiques par transfert horizontal.

3- Symbiose rhizobium-légumineuse

3.1- Aperçu général

Les légumineuses sont réparties sur trois sous-familles : Caesalpinioideae, Mimosoideae et Faboideae ou Papilionoideae. Cette dernière est extrêmement diversifiée avec des caractères spécifiques et d'autres communs entre les espèces. La nodulation est l'un des caractères les plus communs chez la plupart des Papilionoidea et chez environ 90% des Mimosoideae. Ces deux sous familles autorisent une symbiose durable avec les α -protéobactéries de l'ordre des Rhizobiales et la classe des β -protéobactérie formant ainsi les nodules et fixent l'azote atmosphérique.

Etymologiquement, le terme symbiose signifie vivre avec. Au sens large, une symbiose implique au minimum deux organismes vivants dont l'association stable dans le temps existe sous trois aspects suivant les bénéfices retirés par l'un ou l'autre des partenaires. Le parasitisme profitera à l'un des partenaires au détriment de l'autre. Le commensalisme définit une symbiose où l'un des partenaires tire profit de son association à l'autre sans lui nuire. Enfin le mutualisme représente une association à bénéfice réciproque. Il devient alors possible pour les deux partenaires de pouvoir se développer ensemble dans un environnement hostile ou peu adapté (Haynes, 1986). La symbiose au sens strict, est la relation étroite bénéfique et réciproque entre deux organismes différents qui vivent ensemble. Dans cette relation, le partenaire de plus

grande taille est appelé hôte (ou macro-symbiote), et partenaire de plus petite taille est nommé symbiote ou micro-symbiote (Faghire *et al.*, 2011).

La symbiose se traduit chez la plante hôte par la formation de structures différenciées et spécialisées, appelées nodules ou nodosités, localisées le plus souvent au niveau des racines et dans certains cas au niveau des tiges (Dreyfus *et al.*, 1988). Ces nodules représentent de véritables organes d'échanges métaboliques entre les bactéries et la plante. A l'intérieur du nodule, les rhizobia (endosymbiotes) se différencient en bactéroïdes, forme sous laquelle ils fixent l'Azote de l'air et le transforment *via* le complexe nitrogénase en ammonium, qu'ils échangent avec la plante contre les substances carbonées issues de la photosynthèse (Domergues & Bosco, 1998).

Plusieurs études ont montré que le *Rhizobium* est le seul symbiote des espèces de la tribu des fabacées (*Lathyrus*, *Lens culinaris*, *Pisum sativum*, *Vicia* spp. et *Trifolium alexandrinum*), principalement *R. leguminosarum* qui est le symbiote le plus commun (Andrews & Andrews 2017). Mais il ne s'agit pas d'une relation exclusive, puisque *R. fabae* (Tian *et al.*, 2008), *R. multihospitium* (Han *et al.*, 2008), *R. anhuiense* (Zhang *et al.*, 2015), *R. pisi* (Santillana *et al.* 2008), *R. laguerreae* (Saïdi *et al.*, 2014), *R. lentis*, *R. binae*, *R. bangladeshense* (Harun-or *et al.* 2015), *R. aegyptiacum* (Shamseldin *et al.*, 2016), *R. leguminosarum* *bv. trifolii*, *Ensifer numidicus* et *Mesorhizobium amorphae symbiovar ciceri* (Sami *et al.*, 2016) sont aussi des espèces associées aux *Fabaceae*. Cependant, les analyses des gènes *nifH* et *nodC* de tous ces rhizobia ont montré une forte similitude, indiquant leur spécificité *vis-à-vis* des *Fabaceae*. Cette similitude est expliquée par un transfert latéral de gène qui s'est produit entre les différents *Rhizobium* (Zhang *et al.*, 2015; Remigi *et al.*, 2016). Dans la tribu des *Phaseoleae*, *Phaseolus vulgaris* dispose d'un large spectre d'hôte avec *R. gardinii*, *Sinorhizobium fredii*, *R. gallicum* *bv. phaseoli*, *R. tropicii*, *R. leguminosarum* *bv. trifolii*, *R. leguminosarum* *bv. viciae*, *R. leguminosarum* *bv. phaseoli*, *R. leucaenae*, *R. pisi*, *R. lusitanum* et *R. etli* (van Berkum *et al.*, 1998; Herrera-Cervera *et al.*, 1999; Martínez-Romero, 2003; Silva *et al.*, 2003; Mulas *et al.*, 2011; Dall'Agnol *et al.*, 2013). Cependant, la caractérisation moléculaire des rhizobia associés à la sous-famille des *Caesalpinioideae* a révélé que *Bradyrhizobium* est l'exclusive symbiote de *Dimorphandra* (Fonseca *et al.*, 2012) et de *Erythrophleum* (Yao *et al.*, 2014).

3.2- Etablissement de la symbiose rhizobium-légumineuse

La nodulation est un processus d'interactions complexes entre les deux partenaires. Les mécanismes moléculaires de reconnaissance entre la plante hôte et les bactéries sont considérés

comme une forme de communication entre les cellules. Un échange précis de signaux moléculaires entre la plante hôte et les rhizobia est essentiel pour le développement de nodules (Begum & Gafur, 2001). L'établissement de la symbiose entre une légumineuse et son rhizobium spécifique se manifeste par la formation de nodules sur le site de fixation symbiotique. Le nodule se forme en trois étapes majeures : la pré-infection, qui correspond au dialogue moléculaire se mettant en place entre les deux partenaires symbiotiques ; l'infection, correspondant à l'entrée des bactéries libres dans la légumineuse, et enfin le développement du nodule (Brencic & Winans, 2005).

3.2.1- Pré-infection

L'interaction entre le partenaire végétal et les rhizobia débute par un échange de signaux moléculaires (Long, 1996) ; lorsque l'azote présent dans le sol est rare, ce premier contact entre les racines de la plante hôte et le rhizobium commence par la sécrétion de divers composés déterminants une chimiotaxie positive entre les deux symbiotes, parmi lesquelles les flavonoïdes et les isoflavonoïdes (Perret *et al.*, 2000; Clúa *et al.*, 2018). Ces composés phénoliques, principalement des flavonoïdes tels que l'apigénine-7-O-glucoside (5, 7,4' - trihydroxyflavone-7-O-glucoside) chez le pois (*Pisum sativum*) et 7,4' -dihydroxyflavone (DHF) chez le trèfle (*Trifolium repens*) sont capables d'activer la transcription des gènes Nod chez les *Rhizobia*. Le produit du gène NodD, synthétisé de façon constitutive est impliqué dans la reconnaissance de ce signal et dans l'activation de la transcription des autres gènes Nod (gènes nod, noe et nol). Cette reconnaissance représente un premier niveau de spécificité de la symbiose. La transcription des autres gènes Nod a pour effet la synthèse des facteurs Nod qui sont les molécules bactériennes reconnues à leur tour par la plante (Miklashevichs *et al.*, 2001). Cette reconnaissance du facteur Nod par la plante représente un second niveau de spécificité de la symbiose (Figure 3).

Différents flavonoïdes sont sécrétés par différentes espèces de plantes afin de piéger le rhizobium approprié et établir une symbiose efficace. Il a été suggéré que la production des flavonoïdes est fortement localisée sur les sites d'infection. En outre, certains flavonoïdes produits sur les sites d'infection sont des phytoalexines et peuvent jouer un rôle dans la sélection des symbiotes compatibles pendant l'infection et participent au renforcement des parois des cellules végétales. Jusqu'à présent il a été démontré que la disponibilité de l'azote joue un rôle important dans la production des flavonoïdes, mais les détails moléculaires du mécanisme n'ont pas encore été clarifiés (Clériveret *et al.*, 1996; Liu & Murray 2016).

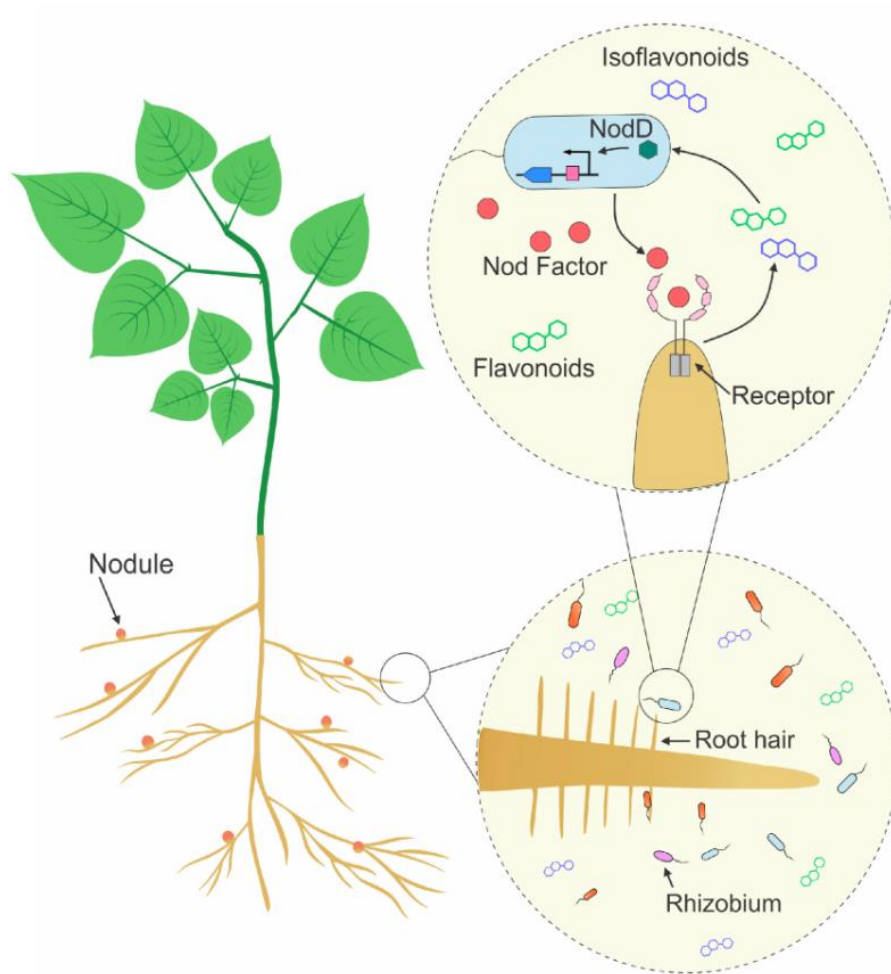


Figure 3 : Echange de signaux dans l'interaction légumineuse-rhizobium (Clúa *et al.* 2018)

3.2.2- Infection

Il existe une variabilité de type d'infection et de morphologie des nodules chez les légumineuses. Les racines des légumineuses peuvent être infectées par les rhizobia *via* trois mécanismes distincts selon Bouchiba (2018).

3.2.2.1- Voie intracellulaire

Ce processus concerne la majorité des légumineuses tempérées. Il est le plus étudié et le mieux connu. Dans ce cas, l'infection fait intervenir les poils absorbants, les rhizobia pénètrent dans la cellule végétale par la formation d'un cordon d'infection qui traverse d'abord le poil absorbant et se ramifie ensuite dans les cellules corticales guidant ainsi les bactéries (Gage, 2004). Simultanément à l'infection des poils absorbants, certaines cellules du cortex interne se différencient et se divisent à plusieurs reprises, formant un primordium nodulaire. Quand les

cordons d'infection atteignent le primordium, certaines cellules cessent de se diviser et entrent dans des cycles répétés d'endoréduplication. Elles sont alors envahies par des *Rhizobia* qui sont relâchés des cordons d'infection (Brewin, 2004). Ensuite, la pénétration de la bactérie est faite par endocytose. Finalement, les cellules végétales infectées et les bactéries infectantes se différencient en cellules capables de fixer et d'assimiler l'azote. La structure néoformée, qui se compose des bactéries qui se différencient en des bactéroïdes enfermés dans une membrane de cellules de la plante, est un symbiosome.

3.2.2.2- Voie intercellulaire ou "Crack Entry"

Ce mécanisme est connu chez de nombreuses légumineuses d'origine essentiellement tropicale ou sub-tropicale notamment les espèces tolérantes à l'immersion. Dans ce mode d'infection, existe une variabilité selon la plante hôte. Ainsi, l'infection se fait généralement au niveau de passages libérés par l'émergence des racines latérales ou adventives, par des blessures ou parfois directement à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme (Pawlowski & Bisseling, 1996). Lors de l'infection par crack entry, les bactéries pénètrent directement dans le cortex externe au niveau des émergences de racines latérales et forment des poches d'infection dans ces cellules, présentant des signes de mort cellulaire. Puis, des cordons d'infection se développent à partir de ces poches pour infecter les primordia nodulaires formés au niveau du cortex interne moyen (Goormachtig *et al.*, 2004).

3.2.2.3- Pénétration directe entre les cellules épidermiques

Le troisième mode d'infection est observé chez *Mimosa scabrella*, *Lupinus* spp et *Listia* spp, Les rhizobia pénètrent directement entre les cellules épidermiques non endommagées en dissolvant la lamelle moyenne des parois cellulaires radiales et envahissent les cellules hôtes à travers des structures semblables à des cordons d'infection (De Faria *et al.*, 1988 ; Ardley *et al.*, 2013 ; Czernic *et al.*, 2015).

3.2.3- Développement du nodule

En parallèle et simultanément à l'infection de la racine par les bactéries, se développe un nouvel organe qui formera une niche pour les bactéries : le nodule ou nodosité. On distingue généralement deux types de nodules : les nodules « indéterminés » et « déterminés ».

Le type de nodule dépend de la plante hôte et non de son symbiote. Généralement les légumineuses tempérées (pois, luzerne, trèfle...) forment des nodules indéterminés (Figure 4 A), alors que les légumineuses tropicales (soja, haricot...) forment habituellement des nodules déterminés (Figure 4 B)). Cependant, certaines plantes comme *Sesbania rostrata* peuvent

former des nodules des deux types selon les conditions environnementales (Fernandez-Lopez *et al.*, 1998). C'est notamment selon le site d'initiation des divisions cellulaires du cortex que les deux types de nodules se distinguent. Les nodules indéterminés se développent à partir des cellules du cortex interne alors que les nodules déterminés se développent à partir des cellules du cortex externe.

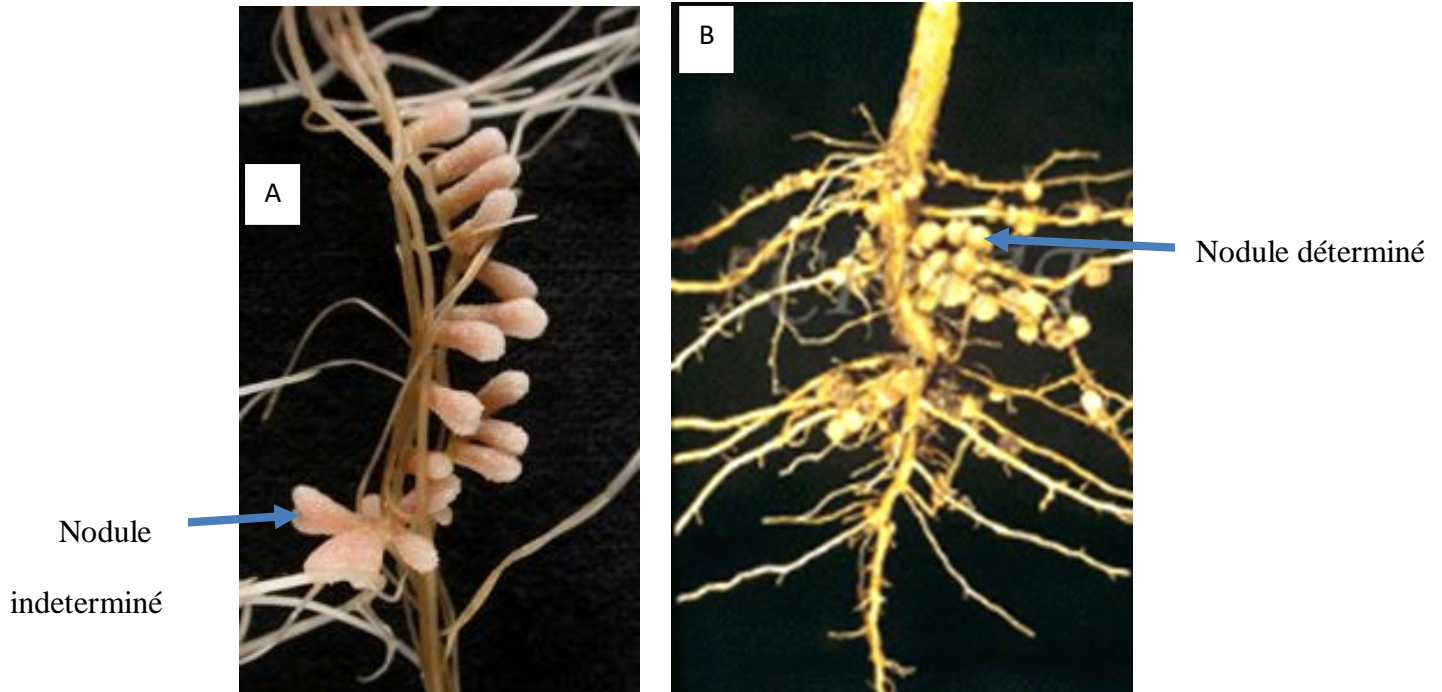


Figure 4 : Systèmes racinaires de légumineuses portant des nodules indéterminés (A) et nodules déterminés (B) (Hirsch, 1992)

3.3- Processus de la fixation symbiotique

Les légumineuses ont développé une relation symbiotique avec les rhizobia afin de fixer et de convertir l'azote atmosphérique (N_2) en une forme assimilable par les plantes. Ce processus est appelé fixation biologique de l'azote (Zahran, 2001). Il comporte trois particularités:

- ✓ une sensibilité élevée de la nitrogénase vis-à-vis de l'oxygène;
- ✓ une grande consommation d'énergie par utilisation de 16 ATP, au moins, par molécule de N_2 fixée. Cette dépense énergétique est prise en charge par la plante hôte ;
- ✓ une production simultanée d'hydrogène moléculaire qui est transformé par certains rhizobia en énergie supplémentaire pour la nitrogénase ;

Ces trois caractéristiques sont peut-être les raisons qui expliquent pourquoi la fixation de l'azote est réalisée chez si peu d'organismes au cours de l'évolution (Richter, 1993).

La réaction chimique connue sous le nom de fixation biologique de l'azote prend place dans les nodules. Bien que le processus implique un grand nombre de réactions biochimiques, il peut être résumé en une simple réaction. L'équation indique qu'une molécule d'azote atmosphérique N_2 se combine avec des protons H^+ pour former deux (2) molécules d'ammoniaque ($2 NH_3$) et deux molécules d'Hydrogène en gaz ($2H_2$). Cette réaction est menée par une enzyme, la nitrogénase. Les 16 molécules d'ATP représentent l'énergie minimale demandée afin que la réaction prenne place (Sprent, 1984). La conversion biologique de l'azote moléculaire en ammonium est catalysée par un complexe enzymatique, la nitrogénase, que l'on trouve chez les bactéries fixatrices d'azote. Ce n'est que lorsque la symbiose est mise en place que la nitrogénase apparaît dans les bactéroïdes et la leghémoglobine dans les nodosités (Rees *et al.*, 1993).

3.3.1- Leghémoglobine

La leghémoglobine est la noduline la plus abondante. Elle a pour fonction de transporter l'oxygène facilitant ainsi sa diffusion aux bactéroïdes et de maintenir ce taux d'oxygène élevé dans les nodules (Sanchez *et al.*, 1991). En effet, le problème majeur des nodules est de disposer d'assez d'oxygène afin d'approvisionner les bactéroïdes sans provoquer une inactivation de la nitrogénase qui est très sensible aux concentrations élevées d'oxygène (Sprent., 1984). Le site actif contenant le molybdène du complexe nitrogénase est spécifiquement conçu pour réduire l'azote moléculaire (N_2), mais peut être aisément empoisonné par l'oxygène moléculaire libre (O_2 libre) (Brewin *et al.*, 1992). Il est donc demandé un flux élevé d'oxygène à une basse concentration. Ainsi, la leghémoglobine constituée de deux parties (polypeptide et un hème) abaisse considérablement la concentration d' O_2 libre dans les nodules de la plante en le fixant ; l'oxygène fixé par la leghémoglobine n'est plus libre dans les nodules et ne peut donc plus interagir avec la nitrogénase pour l'inhiber (Brewin *et al.*, 1992). Cependant, les bactéroïdes ont besoin comme la plante hôte, d'un ravitaillement régulier en oxygène pour leur métabolisme. La plante hôte, répond à ces exigences en synthétisant de grandes quantités de leghémoglobine, qui va porter l'oxygène libre à un niveau suffisamment faible pour ne pas endommager la nitrogénase. La propriété de lier l'oxygène propre à la leghémoglobine, permet de réunir cette condition (Sprent., 1984). Bien que la plante synthétise le polypeptide de la leghémoglobine, le cofacteur constitué par l'Hème est fourni par les bactéries elles-mêmes (Brewin *et al.*, 1992).

3.3.2- Nitrogénase

Les nodosités sont des composantes nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase.

La nitrogénase est constituée de deux protéines : la Fe-protéine et la Fe-Mo-protéine, qui, ensemble, véhiculent l'ATP et les électrons nécessaires à la fixation et réduction du N_2 en NH_3^+ (Rees *et al.*, 1993). La protéine-Fe joue un rôle dans le transfert d'électrons à la dinitrogénase, nécessaire à la réduction du substrat (N_2) (Yamamoto *et al.*, 2008). L'activité de la nitrogénase se fait selon un cycle précis qui comporte quatre étapes essentielles. En premier lieu, on a la formation de complexe entre la protéine-Fe, deux molécules d'ATP et la protéine-MoFe, suivie du transfert d'électrons entre les deux protéines avec hydrolyse de l'ATP. Ensuite, une dissociation de la protéine-Fe du complexe aura lieu avec une réduction du centre (4Fe-4S) et une transformation de l'ATP en ADP (Figure 5). Ce cycle se répète plusieurs fois jusqu'à l'accumulation d'un nombre suffisant d'électrons apte à réduire le substrat, ce processus de réduction nécessite un environnement anaérobie vu la sensibilité de la nitrogénase à l'oxygène (Pope *et al.*, 1986).

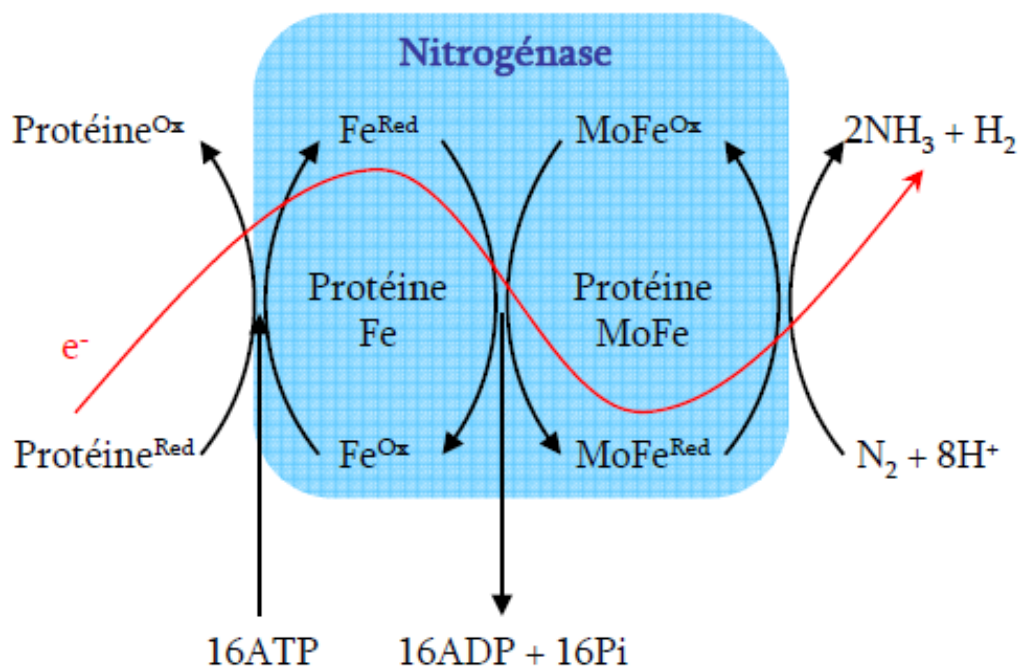


Figure 5 : Mécanisme moléculaire de réduction de N_2 en NH_3 par la Nitrogénase (Vernier, 2008)

3.3.3- Fonctionnement des nodosités

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

3.4- Assimilation de l'ammonium

Quel que soit l'origine du NH_4^+ celui-ci va être pris en charge, à l'intérieur de la plante, par un système enzymatique, GS-GOGAT. Sous ce nom barbare se cache deux enzymes travaillant à la chaîne. La première (GS pour Glutamine Synthase) rajoute un NH_3 à une molécule de glutamate. La glutamine ainsi formée, transfère un de ses groupements azotés à un acide céto-glutamate, grâce à la seconde enzyme GOGAT (Glutamine OxoGlutamate Amino Transférase). On obtient alors deux molécules de glutamate et les réactions peuvent alors s'enchaîner en boucle (Brewin *et al.*, 1992). Le glutamate sert également de matrice aux différents acides aminés. Grâce à une transaminase, il transfère un de ses groupements azotés à une autre molécule pour former un acide aminé et un cétoacide. Les plantes symbiotiques fixent ainsi de 300 à 400 kg de diazote par hectare et par an (Brewin *et al.*, 1992).

4- Endophytes nodulaires

4.1- Aperçu général

Les bactéries endophytes peuvent être définies comme les bactéries qui colonisent le tissu interne de la plante, ne montrant aucun signe externe d'infection ou d'effet négatif immédiat sur leur plante hôte (Schulz & Boyle, 2006 ; Reinhold-Hurek & Hurek, 2011). La plupart des endophytes semblent provenir de la rhizosphère ou de la phyllosphère. Cependant, certains peuvent être transmis par la semence qui est le transfert horizontal (Hallmann *et al.*, 1997). Ces bactéries ont la capacité de se fixer à la surface des racines (rhizoplane), mais sont plus spécialisées, car ils possèdent la capacité de pénétrer à l'intérieur des tissus racinaires et ont un accès direct aux composés organiques présents dans l'apoplaste. En occupant cet emplacement endophytique privilégié, ces bactéries n'ont pas à faire face à la concurrence de leurs homologues comme celles rencontrées dans la rhizosphère ou dans le sol (Kanchana *et al.*, 2013a, b). Elles interagissent étroitement avec leur plante hôte pour obtenir des nutriments facilement disponibles et sécurisent également un habitat amical à l'intérieur de l'espace intercellulaire apoplastique (Weyens *et al.*, 2009). Ces bactéries colonisent activement divers

tissus végétaux tels que les fleurs, les fruits, les feuilles, les tiges, les racines et les graines (Azevedo *et al.*, 2000 ; Kobayashi & Palumbo, 2000) tout en établissant des liens à long terme avec la plante (Hardoim *et al.*, 2008). Il a été rapporté par Muresu *et al.* (2008) que les tiges et les racines de la majorité des espèces végétales étudiées contiennent environ 10^3 à 10^6 de bactéries endophytes par gramme de tissu végétal, dont les plus fortes densités sont observées dans les racines et diminuent de la tige aux feuilles. Strobel & Daisy (2003) estiment que parmi les 300.000 espèces de plantes qui existent sur terre, chaque plante est l'hôte d'un ou plusieurs endophytes appartenant à différents genres et espèces. Il semble que les bactéries qui s'adaptent le mieux à vivre à l'intérieur des plantes sont naturellement choisies et sélectionnées sur un grand nombre d'espèces vivant dans le sol ou la rhizosphère par la plante hôte. Cependant, le mécanisme par lequel les plantes sélectionnent leurs populations endophytes n'est pas encore compris (Ibáñez *et al.*, 2009). La densité de population des endophytes est très variable et dépend principalement des espèces bactériennes, le génotype de la plante hôte et de son stade de développement ainsi que les conditions environnementales (Tan *et al.*, 2003 ; Dudeja & Nidhi, 2014). Différents tissus végétaux peuvent abriter des communautés endophytes distinctes (Chi *et al.*, 2005 ; Johnston-Monje & Raizada, 2011). En effet, après la colonisation initiale, certains endophytes peuvent se déplacer vers d'autres zones de la plante en entrant dans les tissus vasculaires (Compant *et al.*, 2005; Johnston-Monje & Raizada, 2011). Selon Gaiero *et al.* (2013), la distribution des endophytes dans les plantes dépend d'une combinaison de la capacité des endophytes à coloniser les tissus végétaux et de l'allocation des ressources végétales.

4.2- Infection

Pour entrer à l'intérieur du système racinaire, le processus de pénétration d'endophytes ne nécessite pas automatiquement de mécanisme actif, et presque toutes les bactéries de la rhizosphère peuvent être en effet endophytiques à n'importe quel stade de leur vie (Hardoim *et al.*, 2008). La pénétration peut avoir lieu à des fissures, comme celles qui se produisent sur les sites d'émergence des racines ou créé par les microorganismes nuisibles, des extrémités des racines (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011), des stomates (Roos & Hattingh, 1987), des lenticelles (Scott *et al.*, 1996), des radicules de germination (Gagne *et al.*, 1987) et à des poils absorbants (Huang, 1986). Lorsque les bactéries colonisent les racines, elles peuvent envahir les cellules par voie inter et / ou intracellulaire et peuvent pénétrer dans les tissus central. De cette façon, elles pourraient atteindre les couches centrales avant la différenciation de l'endoderme bien que l'endoderme est également accessible via la sécrétion des enzymes dégradant la paroi cellulaire

(Compant *et al.*, 2010a). Une autre voie d'entrée par la sécrétion des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire peuvent être impliqués dans la propagation et la pénétration bactérienne à l'intérieur de la plante. La production d'enzymes de dégradation de la paroi cellulaire a été détectée chez les rhizobactéries promotrices de croissance des plantes (RPCP) de et / ou bactéries endophytes pénétrant à l'intérieur de cellules via la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (Hallmann *et al.*, 1997). Les endoglucanase, cellulases et pectinases sont des enzymes produites par de nombreuses bactéries endophytes tels qu'*Azoarcus* sp. BH72 (Hurek *et al.*, 1994), *Azospirillum irakense* KBC1 (Khammas & Kaiser, 1991), et *Pseudomonas fluorescens* 89B-61 (Benhamou *et al.*, 1996; Quadt- Hallmann *et al.*, 1997) ont été effectivement corrélée à l'entrée de endophytes dans le système racinaire. La dégradation enzymatique des parois cellulaires végétales par ces bactéries a cependant été observée seulement quand ils ont colonisé l'épiderme racinaire mais jamais après la colonisation des espaces intercellulaires du cortex de la racine, ce qui suggère que l'endophyte peut induire la production de cellulases et de pectinases que pour la pénétration dans la plante hôte. Certains des PGPR peuvent coloniser non seulement le cortex racinaire interne mais certains sont également en mesure de franchir la barrière de l'endoderme (Compant *et al.*, 2010a). Ce processus de colonisation du système vasculaire a été mis en évidence et expliqué pourquoi l'endophytes pourrait se trouver dans les parties aériennes de la plante. Il a en effet été démontré que des endophytes bactériens pourraient être trouvés dans différentes parties végétatives de plantes, comme les racines, tubercules, mais aussi à l'intérieur des tiges et / ou feuilles (Hallmann, 2001; Compant *et al.*, 2005b; Gray & Smith, 2005).

4.3- Présence d'endophytes dans les nodules

Depuis le premier isolement des rhizobia à partir des nodules de *Vicia faba* par Beijerinck (1888), l'isolement des cellules de type *Bacillus* de couleur jaune a été aussi signalé, mais négligé. D'autres observations non prises en considération sur des bactéries isolées à partir de nodules et de racines de trèfle et de soja ont été rapportés par Phillipson & Blair (1957) et Manninger & Antal (1970). Il a été longtemps supposé que l'intérieur des nodules racinaires était exclusivement colonisé par des souches de rhizobia (Leite *et al.*, 2017) et pendant de nombreuses années, des cultures bactériennes différentes en apparence ou en caractéristiques de croissance des espèces des rhizobia ont été rejetées et considérées comme contaminants. Ce n'est que ces dernières années que la présence d'autres bactéries en plus des rhizobia à l'intérieur du nodule a été reconnue (Martinez-Hidalgo & Hirsch, 2017).

A côté des bactéries nodulantes, les nodules de légumineuses abritent d'autres bactéries non nodulantes appelées endophytes (Peix *et al.*, 2015). Malgré la haute spécificité de l'interaction légumineuse – Rhizobium et l'environnement sélectif des nodules, les rhizobactéries nodulaires non rhizobiennes ont été rapportées. Les nodules racinaires qui étaient traditionnellement considérés comme la niche exclusive des rhizobia sont en cours de réexamen pour examiner la colonisation par plusieurs bactéries libres sans rapport avec la fixation symbiotique de l'azote. La preuve que l'intérieur sain des nodules peut contenir des endophytes pas nécessairement liés au contexte symbiotique ou diazotrophique a été documentée : *Bacillus* pour le soja (Bai *et al.*, 2002), *Klebsiella* pour l'arachide, le trèfle, le haricot (Ozawa *et al.*, 2003) et *Pseudomonas* pour l'acacia, le soja (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004, Hoque *et al.*, 2011). Sturz *et al.*, (1997) ont récupéré simultanément $4,3 \cdot 10^9$ UFC de rhizobiums et $3 \cdot 10^5$ UFC d'endophytes non rhizobiaux de 12 genres bactériens par gramme de poids frais de tissu de nodules de trèfle rouge. Des preuves ont également été rapportées que des intérieurs de nodules sains de légumineuses sauvages peuvent contenir des bactéries non liées aux rhizobiums (Zakhia *et al.*, 2006 ; Deng *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2012).

Ils les nommèrent «les bactéries nodulaires» appellation qui les confondait avec le rhizobium fixant l'azote. Pour les distinguer des rhizobia, ces bactéries sont maintenant connus sous différents noms : « des bactéries associées aux nodules» (Rajendran *et al.*, 2012); «des endophytes nodulaires» (Velázquez *et al.*, 2013) et aussi «les endophytes non-rhizobiens» (Non Rhizobia Endophytes, NRE) (De Meyer *et al.*, 2015). L'ensemble des espèces endophytes et symbiotiques logées dans les nodules sont appelés le microbiome nodulaire.

4.4- Diversité des endophytes nodulaires

Au cours des années, un grand nombre de bactéries autres que les bactéries nodulant les légumineuses (BNL) ont été trouvées dans les nodules de différentes espèces de légumineuses. Ils appartiennent à de nombreux genres différents, notamment *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bosea*, *Enterobacter*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* et *Stenotrophomonas* (Zakhia *et al.*, 2006 ; Velázquez *et al.*, 2013 ; De Mayer *et al.*, 2015). Martinez-Hidalgo & Hirsch (2017) ont regroupé tous les genres d'endophytes bactériens hébergés dans les nodules des légumineuses retrouvés à ce jour et une large diversité est révélée. En effet, ils sont classés dans des genres lointains voire des classes différentes: Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria, et phylum différents: Actinobacteria, Bacteroidetes et Firmicutes.

4.5- Rôle des endophytes nodulaires dans la croissance des plantes

L'association mutuelle entre les bactéries endophytes et les plantes apporte des effets bénéfiques grâce à une interaction métabolique modifiée entre les partenaires, avec une augmentation de l'acquisition des nutriments, une performance symbiotique supérieure et une atténuation des stress biotiques et abiotiques (Egamberdieva *et al.*, 2017). L'intérêt pour les bactéries endophytes plutôt que pour les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), a été accru. Ces bactéries peuvent être impliquées dans le processus d'infection et de colonisation de l'association Rhizobium-hôte et sont associées de manière à coordonner une meilleure adaptation des légumineuses dans des conditions environnementales changeantes (Hashem *et al.*, 2016). Divers groupes de bactéries endophytes atteignant un contact plus intime avec les tissus des légumineuses entraînent des bénéfices pour les plantes grâce à diverses activités métaboliques, à savoir : la synthèse de phyto-hormones (Beneduzi *et al.*, 2012; Kumawat *et al.*, 2019), la solubilisation P & Zn (Ramesh *et al.*, 2014 ; Costerousse *et al.*, 2018), la production de sidérophore (Kotasthane *et al.*, 2017), de l'ACC désaminase (Saikia *et al.*, 2018), de biofilms et d'exo-polysaccharides (Berg *et al.*, 2013; Santiago *et al.*, 2017) et la modulation de constituants physio- biochimiques des plantes (Hashem *et al.*, 2016). Les bactéries endophytes qui colonisent efficacement les tissus végétaux des légumineuses pourraient être plus bénéfiques dans une co- inoculation avec des rhizobiums pour protéger leur hôte contre les phyto-pathogènes et améliorer la croissance des plantes (Rybakova *et al.*, 2016 ; Egamberdieva *et al.*, 2016). Ainsi certains endophytes peuvent favoriser la croissance des plantes et ils sont considérés comme Les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Saïdi *et al.*, 2013a).

5- Activités promotrices de croissance des plantes

Les RPCP (Rhizobactéries promotrices de croissance des plantes) connues en anglais sous le nom de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) favorisent généralement la croissance des plantes par deux mécanismes (Figure 6). Ces bactéries agissent directement en facilitant divers processus dont : la disponibilité et l'acquisition des nutriments via la fixation de l'azote (Ahemad & Kibret, 2014 ; Naureen *et al.*, 2017), la solubilisation du phosphore (Zaidi *et al.*, 2009; Alori *et al.*, 2017) et la minéralisation des composés organiques (Bhardwaj *et al.*, 2014; Arora *et al.*, 2012) ou en modulant la croissance des plantes par la fourniture ou la régulation de diverses hormones végétales (AIA, abscissique acide, acide gibbérellique et cytokinine) (Panwar *et al.*, 2014 ; Naureen *et al.*, 2017). Par ailleurs, elles induisent indirectement la croissance des plantes en diminuant les effets inhibiteurs de divers agents pathogènes sur la croissance des plantes via la production d'antibiotiques (Labuschagne *et al.*, 2009), de

sidérophores (Glick, 2012; Naureen *et al.*, 2017), de cyanure d'hydrogène (HCN) (Nandi *et al.*, 2017) et la résistance systémique induite (Ramamoorthy *et al.*, 2001). Les RPCPP améliorent également les mécanismes de défense des plantes dans des conditions de stress en produisant l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, en facilitant la croissance des plantes en diminuant les niveaux d'éthylène, en induisant une tolérance au sel et en réduisant le stress de sécheresse chez les plantes (Zahir *et al.*, 2009)

Les RPCP peuvent servir de biofertilisants et de biopesticides dans les cultures agricoles (Ferchichi *et al.*, 2019) .



Figure 6 : Diagramme schématisant les mécanismes des RPCP (Gupta, 2015)

5.1-Activité de biofertilisant (Promotion directe de la croissance des plantes)

L'amélioration directe de la croissance des plantes se produit lorsqu'une bactérie facilite l'acquisition de nutriments essentiels ou des modulations de taux d'hormones au sein d'une plante par la production de phytohormones (bouchiba, 2018).

5.1.1- Fixation de l'azote

Parmi les éléments nécessaires au développement des plantes, l'azote demeure l'élément essentiel pour toutes les formes de vie et le nutriment le plus vital pour la croissance et la productivité des plantes (Ahemad & Kibret, 2014; Gopalakrishnan *et al.* 2015). Bien que l'azote représente 78 % de l'atmosphère, il reste indisponible pour les plantes. Malheureusement, aucune espèce végétale n'est capable de fixer le diazote atmosphérique et de le dépenser directement pour sa croissance. Ainsi, l'azote atmosphérique est converti en formes utilisables par la plante par fixation biologique de l'azote qui transforme l'azote en ammoniac par des micro-organismes fixant l'azote en utilisant un système enzymatique complexe appelé nitrogénase (Gaby & Buckley, 2012).

Les RPCP ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique et de le fournir aux plantes par deux mécanismes: symbiotique et non symbiotique. La fixation symbiotique de l'Azote est réalisée par des RPCP largement, présentées comme des symbiotes qui sont *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* avec des légumineuses, *Frankia* avec des arbres et arbustes non légumineux (Zahran *et al.*, 2001), tandis que la fixation non symbiotique de l'Azote se fait par des RPCP appartenant à des genres comprenant *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Diazotrophicus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* et *cyanobacteria* (Vessey *et al.*, 2003 ; Bhattacharyya *et al.*, 2012). Cependant le mécanisme symbiotique est le plus étudié et le plus important avec 300 à 400 kg de diazote par hectare et par an (Brewin. *et al.*, 1992).

5.1.2 - Solubilisation du phosphate

Le phosphore (P) est le nutriment le plus limitant pour la croissance et le développement des plantes (Saharan & Nehra, 2011). Il joue un rôle important dans pratiquement tous les principaux processus métaboliques de la plante, y compris la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse des macromolécules et la respiration (Gupta *et al.* 2015). Dans le sol, cet élément est abondamment disponible sous deux formes principales : les formes minérales et les formes organiques. Le phosphore minéral provient de l'altération des roches représentant 35 à 70 % du P total dans le sol (Harrison, 1987). Le phosphore organique résulte de la dégradation des végétaux par la faune et la flore du sol. Il représente généralement 30 à 65 % du P total du sol (Harrison, 1987). Cependant, ces formes de phosphore ne sont pas immédiatement disponibles pour les plantes (Gupta *et al.*, 2015; Goswami *et al.* 2016). Elles sont pour la plupart localisées sur la phase solide du sol où elles sont associées à des cations, à des oxydes et hydroxydes métalliques, aux argiles, au carbone, ou à l'intérieur

d'organismes morts ou vivants (Shen *et al.*, 2011). Ces formes de P présentent différents niveaux de disponibilité pour les plantes. Certaines formes se retrouvent très peu en solution dans le sol, d'autres formes ne vont migrer que très lentement de la phase solide vers la solution du sol ; alors que d'autres ne peuvent être libérées que suite à l'activité d'organismes vivants (minéralisation, solubilisation). Seul le phosphore en solution dans l'eau du sol peut être prélevé par les racines des plantes sous ses formes solubles de type monobasique et dibasique (Gopalakrishnan *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2015).

Par ailleurs, l'assimilation du phosphore par la plante est contrôlée par ses besoins, par l'activité et la morphologie de son système racinaire, par la disponibilité du P dans le sol et aussi par la présence de micro-organismes symbiotiques dans ses racines. Ces derniers étant capables de mobiliser le phosphore peu mobile et non disponible du sol, leur exploitation dans le but de minimiser l'utilisation des engrais phosphatés est très considérée par la communauté scientifique. Dans ce sens, les recherches scientifiques se sont dirigées vers l'exploitation des bactéries appelées Bactéries Solubilisatrices de Phosphate (BSP). Ces bactéries sont capables de convertir le phosphore insoluble en une forme accessible et facilement assimilable par les plantes (Ahemad & Kibret, 2014; Gupta *et al.* 2015). Diverses bactéries ont la capacité de solubiliser le phosphore organique par l'action de phosphatase, ou le phosphore inorganique par la libération d'acides organiques résultant du métabolisme des sucres provenant des exsudats racinaires. Les processus de solubilisation sont hautement influencés par l'humidité, la température, les propriétés chimiques et surtout par le pH du sol qui est un paramètre jouant un rôle clé dans la disponibilité du phosphore dans le sol (Shen *et al.*, 2011). Les plus performantes de ces bactéries appartiennent aux genres *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas* (Lugtenberg *et al.*, 2013; Goswami *et al.*, 2016). Tandis que Rivas *et al.* (2006) ont trouvé que les bactéries les plus efficaces appartiennent aux genres *Bacillus*, *Rhizobium* et *Pseudomonas*.

5.1.3- Solubilisation du potassium

Le potassium (K) est le troisième macronutriment essentiel majeur pour la croissance des plantes. Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90% du potassium dans le sol existe sous forme de roches insolubles et de minéraux silicatés (Parma & Sindhu, 2013). De plus, en raison d'une application d'engrais déséquilibrée, la carence en potassium devient l'une des principales contraintes de la production agricole. Sans potassium adéquat, les plantes auront des racines peu développées, se développeront lentement, produiront de petites graines et auront des rendements faibles. Cela a mis l'accent sur la recherche d'une autre source indigène de potassium pour l'absorption des plantes et de maintenir

le statut du potassium dans les sols pour soutenir la production agricole organique (Kumar & Dubey, 2012). Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes sont capables de solubiliser la roche potassique par la production et la sécrétion d'acides organiques (Kumar & Dubey, 2012). Les RPCP telles qu'*Acidothiobacillus ferrooxidans*, *Bacillus edaphicus*, *Bacillus mucilaginosus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus sp.* et *Pseudomonas* auraient libéré du potassium sous une forme accessible à partir de minéraux porteurs de potassium dans les sols (Liu *et al.*, 2012). Ainsi, l'application de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes solubilisant le potassium comme biofertilisant pour l'amélioration de l'agriculture peut réduire l'utilisation de produits agrochimiques et soutenir la production de cultures respectueuses de l'environnement.

5.1.4- Production des phytohormones

Les phytohormones sont des composés organiques, très efficaces à très faibles concentrations qui jouent un rôle fondamental comme régulateurs de croissance et de développement des plantes (Anjum *et al.*, 2011; Goswami *et al.* 2016; Othman & Tamimi 2016). La production de phytohormones par les PGPR est considérée comme l'un des mécanismes les plus importants par lequel de nombreuses PGPR favorisent la croissance des plantes. Les rhizobactéries ont la capacité de produire des auxines mais aussi des gibbérellines et des cytokinines (Podile & Kishore 2007; Gopalakrishnan *et al.* 2015).

5.1.4.1- Acide indole-3-acétique (AIA)

Parmi les régulateurs de croissance des plantes, l'acide indole acétique (AIA) est l'auxine naturelle la plus courante trouvée dans les plantes. Il a un effet positif sur la croissance des racines (Miransari & Smith. 2014). Jusqu'à 80 % des RPCP peuvent synthétiser de l'AIA qui peut être assimilée par les tissus de la plante hôte et constitue une source d'hormone exogène dont l'effet s'ajoute à celui de l'AIA endogène dans les plantes. Ceci a effet de stimuler la prolifération cellulaire et améliorer l'absorption par l'hôte des minéraux et nutriments du sol (Vessey *et al.* , 2003; Martínez-Viveros *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2015). L'acide indole acétique affecte la division, l'extension et la différenciation des cellules végétales. Il stimule la germination des graines et des tubercules; augmente le taux de développement du xylème et des racines; contrôle les processus de croissance végétative. Il initie aussi la formation de racines latérales et adventices; module les réponses à la lumière, à la gravité et à la fluorescence. Il affecte la photosynthèse, la formation de pigments, la biosynthèse de divers métabolites et la résistance aux conditions stressantes (Spaepen & Vanderleyden, 2011) . Le tryptophane est le précurseur principal de la biosynthèse d'AIA par les RPCP comme chez certains *Azospirillum*,

Rhizobium (Goswami *et al.* 2016), *Pseudomonas* (Spaepen & Vanderleyden, 2011) et *Bacillus* (Qureshi *et al.*, 2009).

5.1.4.2- Gibbérellines et Cytokinines

Les cytokinines et les gibbérellines font partie des phytohormones produits par les plantes et par les RPCP et jouent un rôle dans l'amélioration de la croissance végétale (Kang *et al.* 2009; Gupta *et al.*, 2015). Cependant, les mécanismes utilisés par les cytokinines et les gibbérellines synthétisées par les RPCP pour favoriser la croissance des plantes sont encore mal connus. Plusieurs RPCP tels que *Azospirillum* et *Pseudomonas* ont montré leur forte capacité à produire des cytokinines et des gibberellines (Gupta *et al.*, 2015).

5.1.5- Production des sidérophores

Le fer est un nutriment essentiel pour les plantes et leurs métabolismes. Il agit en tant que cofacteur dans un certain nombre d'enzymes essentielles aux processus physiologiques importants tels que la respiration, la photosynthèse et la fixation d'azote. Il est dans la nature sous la forme ferrique (Fe^{3+}) insoluble (Gupta *et al.*, 2015; Jha & Saraf, 2015; Goswami *et al.*, 2016). Pour satisfaire les besoins nutritionnels en fer, les RPCP ont développé des mécanismes appropriés pour l'assimilation du fer y compris la production de composés chélateurs de fer de bas poids moléculaire connus sous le nom de sidérophores. Ce sont de petites molécules peptidiques qui peuvent fournir un ensemble de ligands à haute affinité pour coordonner les ions ferriques. Les sidérophores sont divisés en trois familles principales selon le groupe fonctionnel caractéristique, les hydroxamates, les catécholates et les carboxylates (Gupta *et al.*, 2015; Vejan *et al.*, 2016).

Les sidérophores ont été impliqués dans l'amélioration directe (Sujatha & Ammani, 2013) et indirecte (Mehnaz, 2013) de la croissance des plantes par des RPCP. Diverses études ont montré l'isolement des bactéries productrices de sidérophore appartenant aux genres *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Streptomyces* de la rhizosphère (Kuffner *et al.*, 2008).

5.2- Activité de biopesticides (Promotion indirecte de la croissance des plantes)

Les micro-organismes phytopathogènes constituent une menace majeure et chronique pour l'agriculture durable et la stabilité des écosystèmes dans le monde entier. Ils subvertissent l'écologie des sols, perturbent l'environnement, dégradent la fertilité des sols. Ils présentent par conséquent des effets nocifs sur la santé humaine en contaminant les eaux souterraines. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes sont une approche prometteuse durable et respectueuse de l'environnement pour obtenir indirectement une fertilité durable du sol et une

croissance des plantes. Cette approche s'inspire d'un large éventail d'exploitation des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, ce qui a permis de réduire le besoin de produits agrochimiques (engrais et pesticides) pour améliorer la fertilité des sols (; Lugtenberg & Kamilova, 2009 ; Tariq *et al.*, 2014).

5.2.1- Antibiose

La production d'antibiotiques est considérée comme l'un des mécanismes de lutte biologique les plus puissants et les plus étudiés pour la croissance des plantes. Cette production est favorisée par l'action des rhizobactéries contre les phytopathogènes devenu de mieux en mieux compris au cours des deux dernières décennies (Shilev, 2013). Divers antibiotiques ont été identifiés, notamment des composés tels que l'amphisine, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), l'oomycine A, la phénazine, la pyolutérine, la pyrrolnitrine, la tensine, la tropolone et les lipopeptides cycliques produits par les pseudomonades (Loper & Gross, 2007) et l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicine A et la xanthobaccine produites par *Bacillus*, *Streptomyces* et *Stenotrophomonas sp.* pour empêcher la prolifération d'agents phytopathogènes (Compant *et al.*, 2005b).

Outre la production d'antibiotiques, certaines rhizobactéries sont également capables de produire un composé volatil connu sous le nom de cyanure d'hydrogène (HCN) pour la lutte biologique contre la pourriture noire des racines du tabac, causée par *Thielaviopsis basicola* (Sacherer *et al.*, 1994).

5.2.2- Enzymes lytiques

L'augmentation de la croissance par l'activité enzymatique est un autre mécanisme utilisé par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes. Les souches rhizobactériennes favorisant la croissance des plantes peuvent produire certaines enzymes telles que les chitinases, la déshydrogénase, la β -glucanase, les lipases, les phosphatases, les protéases, etc. Grâce à l'activité de ces enzymes, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes jouent un rôle très important dans la promotion de la croissance des plantes, en particulier pour les protéger des stress biotiques et abiotiques en supprimant les champignons notamment *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora sp.* *Rhizoctonia solani* et *Pythium ultimum* (Voisard *et al.*, 1989; Upadyay *et al.*, 2012)

5.2.3- Résistance systémique induite (RSI)

La résistance induite peut être définie comme un état physiologique de capacité défensive renforcée induite en réponse à des stimuli environnementaux spécifiques. Par conséquent, les

défenses innées de la plante sont potentialisées contre les défis biotiques ultérieurs (Avis *et al.*, 2008). Le bioprimage des plantes avec certaines rhizobactéries favorisant la croissance des plantes peut également fournir une résistance systémique contre un large éventail d'agents pathogènes des plantes. Les maladies d'origine fongique, bactérienne et virale et, dans certains cas, même les dommages causés par les insectes et les nématodes peuvent être réduits après l'application de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (Naznin *et al.*, 2012). De plus, la résistance systémique induite implique la signalisation du jasmonate et de l'éthylène dans la plante et ces hormones stimulent les réponses de défense de la plante hôte contre une variété d'agents pathogènes des plantes (Glick, 2012). De nombreux composants bactériens individuels induisent une résistance systémique induite comme les lipopolysaccharides (LPS), les flagelles, les sidérophores, les lipopeptides cycliques, le 2, 4-diacétylphloroglucinol, les lactones homosérines et les substances volatiles comme l'acétoïne et le 2, 3-butanediol (Doornbos *et al.*, 2012).

5.2.4- Production d'exo polysaccharides ou formation de biofilm

Certaines bactéries synthétisent un large spectre de polysaccharides multifonctionnels (intracellulaires et extracellulaires). La production d'exo polysaccharides est généralement importante dans la formation du biofilm. Les exo polysaccharides produits par les RPCP sont très importants pour favoriser la croissance des plantes. En raison de leur fonction de molécule de signal, ils s'activent lors des interactions bénéfiques et fournissent une réponse de défense pendant le processus d'infection (Parada *et al.*, 2006). Certains exo polysaccharides de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes peuvent également se lier aux cations, y compris le Na^+ . Ils jouent un rôle dans l'atténuation du stress de salinité en réduisant la teneur en Na^+ disponible pour l'absorption des plantes (Arora *et al.*, 2013).

5.2.5- Activité ACC désaminase et régulation du niveau d'éthylène dans les plantes

L'éthylène, hormone végétale gazeuse, est l'un des métabolites essentiels pour la croissance et le développement des plantes. Elle est impliquée dans la stimulation de la germination des graines, l'initiation des racines et la maturation des fruits (Ahemad & Kibret, 2014 ; Gupta *et al.*, 2015). Malgré ses rôles bénéfiques sur la croissance des plantes, des concentrations élevées en éthylène peuvent avoir des effets nocifs sur leur développement. En effet, les concentrations élevées en éthylène peuvent empêcher le développement des racines et des tiges ; Ce qui entraîne un retard de la croissance végétale (Martínez-Viveros *et al.*, 2010). Dans les situations de stress biotique ou abiotique, le niveau endogène de l'éthylène augmente significativement,

ce qui affecte négativement la croissance globale des plantes (Ruduś et al., 2013; Ahemad & Kibret, 2014; Booker & DeLong, 2015; Vurukonda et al., 2016). La diminution des taux élevés d'éthylène dans la plante peut être réalisée par la dégradation de son précurseur direct 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) par l'action l'enzyme ACC-désaminase (Noumavo et al., 2016). Cette enzyme est exprimée chez plusieurs RPCP (par exemple: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia* et *Rhizobium*, etc.) (Ahemad & Kibret, 2014; Gupta et al., 2015; Noumavo et al., 2016). Elle est responsable de la dégradation de l'ACC végétal en α -cétobutyrate et en ammonium et donc la réduction des niveaux d'éthylène des plantes (Gupta et al., 2015).

6- Facteurs limitant les activités promotrices de croissance

6.1- Facteurs environnementaux

6.1.1. Salinité

Parmi les facteurs environnementaux, la salinité constitue l'une des contraintes majeures limitant le développement et la productivité des plantes cultivées. La salinisation des sols est le processus d'accumulation de sels à la surface du sol et dans la rhizosphère. Les sols salins se caractérisent par la présence de sels solubles tels que les ions Na^+ et Cl^- en concentration suffisamment élevée dans la rhizosphère (Hu & Schmidhalter, 2001 ; Zhu, 2001). Ils constituent un environnement défavorable à la croissance de la plupart des plantes et des bactéries qui leur sont associées (El Hilali, 2006).

Ces sols sont repartis à travers le globe terrestre. Ils existent dans les zones désertiques, côtières et tropicales. Environ 40 % des surfaces agricoles dans le monde sont caractérisées par la présence d'un problème potentiel de salinité (Zahran, 1999). Chaque minute, le monde perd en moyenne 10 hectares de terres cultivables dont 3 ha à cause de la salinisation. En Afrique, près de 40 millions d'hectares sont affectés par la salinisation, soit près de 2 % de la surface totale (Kovda, 1983 ; Geetanjali & Neera, 2008).

Le stress salin affecte d'une manière délétère la croissance et la persistance des souches rhizobiales dans le sol. Toutefois, la croissance des rhizobia sous des conditions salines varie d'une espèce à l'autre et d'un type de sel à l'autre (El Sheikh & Wood, 1990). Il peut aussi affecter certains processus physiologiques de la symbiose légumineuse-rhizobia et le développement des nodules. En général, les premières étapes de la nodulation sont plus sensibles au stress salin que plus tard. En effet, le sel inhibe l'activité de la nitrogénase et la respiration nodulaire entraînant ainsi, une diminution des teneurs en azote total dans la plante

(Salehi *et al.*, 2008 ; Arrese-Igor *et al.*, 2011 ; Faghire *et al.*, 2011). La réduction de l'activité fixatrice de N₂ par le stress salin est généralement due à la réduction de la respiration nodulaire (Aydi *et al.*, 2008). Cette réduction est liée à une limitation de l'oxygène, de l'azote atmosphérique ou d'une diminution de la production de la légghémoglobine par les nodules (López *et al.*, 2008).

6.1.2. Température

La température joue un rôle important sur les équilibres microbiens du sol. Sous les tropiques, la température peut atteindre 65 à 70 °C à la surface du sol et 50 °C dans les horizons inférieurs. Ces températures élevées inhibent généralement la croissance des microorganismes (Hungria & Vargas, 2000 ; Rahmani *et al.*, 2009). Chez les rhizobia, les hautes températures peuvent empêcher la nodulation et inhiber la fixation de l'azote atmosphérique. En effet, les températures élevées affectent la différenciation des rhizobia en bactéroïdes et le fonctionnement de la nodosité. Elles affectent aussi la production des exopolysaccharides et des lipopolysaccharides (Zahran, 1999 ; Nandal *et al.*, 2005). Les températures élevées engendrent également la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des rhizobia induisant chez ces derniers, des modifications physiologiques, génétiques et biochimiques.

Quant aux basses températures, elles entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes. Zhang *et al.* (1996) ont rapporté que les températures basses extrêmes inhibent l'expression des gènes *nod* empêchant ainsi, l'infection et la nodulation. Cloutier *et al.* (1992) ont observé que lorsque le stress thermique n'est pas extrême, la température induit généralement l'expression de protéines de stress thermique qui assurent la protection des enzymes clefs de la physiologie microbienne.

6.1.3- pH

Le pH du sol joue un rôle prépondérant aussi bien dans la survie et la prolifération des rhizobactéries que dans la croissance de leur plante hôte. Les pH extrêmes affectent considérablement tous les stades de la symbiose légumineuse-rhizobia. Ils occasionnent une perte d'environ 25 % de la production agricole mondiale observée dans les terres cultivables (Coventry & Evans, 1989). La majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides pour s'établir dans le sol.

Pour les rhizobia, l'acidité est généralement plus néfaste que l'alcalinité (Bordeleau & Prévost, 1994). Ces bactéries nécessitent un pH optimal compris entre 6,5 et 7,5 pour leur croissance. Toutefois, d'autres auteurs ont indiqué que les rhizobia présentent des réponses variées face

aux variations du pH (Jordan, 1984 ; Glenn & Dilworth, 1994). Ces auteurs ont observé que les rhizobia ont la capacité de s'adapter à l'acidité des sols présentant des teneurs élevées en aluminium et en manganèse par l'induction d'une réponse tolérante vis-à-vis du pH (Hungria & Vargas, 2000).

6.2- Facteurs anthropiques

6.2.1- Fertilisants chimiques (engrais)

Les engrais sont des substances, le plus souvent des mélanges d'éléments minéraux, destinées à apporter aux plantes des compléments d'éléments nutritifs, de façon à améliorer leur croissance, augmenter le rendement et la qualité des cultures (Mazoyer, 2002). L'action consistant à apporter un engrais s'appelle la fertilisation. Les engrais et les amendements font partie des produits fertilisants. La fertilisation se pratique en agriculture et lors des activités de jardinage. D'après Mazoyer (2002), on distingue plusieurs types d'engrais selon le nombre d'éléments fertilisants qu'ils apportent, leur origine et leur forme.

L'utilisation massive d'engrais chimiques détruit les microorganismes et les insectes non pathogènes qui protègent la plante rendant les récoltes plus susceptibles aux maladies (Mahdi *et al.*, 2010). Elle déséquilibre l'activité enzymatique des microorganismes du sol et provoque une contamination des sols et des bassins d'eau par les nitrates et les phosphates.

Des nutriments comme l'azote et le potassium ont une mobilité relative plus élevée que d'autres nutriments tels le phosphore, le calcium, le magnésium et les micronutriments. Ceci les rend plus disponibles pour les plantes, mais également plus vulnérables au lessivage par les eaux (Miransari, 2011a). Ainsi, dans les champs, il peut arriver que seulement 22 % de l'engrais azoté ajouté soit utilisé par la culture (Schindler & Knightin, 1999). L'azote non utilisé se retrouve dans le sol, infiltre l'écosystème aquatique, se volatilise dans l'atmosphère et se dépose ailleurs (Carpenter *et al.*, 1998). Ceci conduit à divers problèmes de pollution comme la contamination des sols et des eaux souterraines et l'eutrophisation des lacs et rivières (Mehnaz *et al.*, 2010). Une moyenne de seulement 20 % de l'engrais ajouté sera disponible pour la plante dans la première année qui suit la fertilisation avec un nutriment moins mobile tel le phosphore (Miransari & Mackenzie, 2011). Le résiduel précipite et les phosphates (PO₄) en excès se retrouvent aussi dans les cours d'eau, provoquant un déséquilibre des substances nutritives et du taux d'oxygène de l'eau qui se traduit par un développement excessif des algues, un développement d'espèces nuisibles et une déstabilisation de l'écosystème.

L'utilisation de quantité élevée de fertilisants peut donc avoir des effets environnementaux négatifs telle la contamination des sols, de l'eau et des zones naturelles en plus d'une influence

sur l'activité enzymatique des microorganismes du sol, la structure et le pH du sol (Bohme & Bohme, 2006) .

6.2.2- Pesticides

Les pesticides, sont des molécules dont les propriétés toxiques permettent de lutter contre les organismes nuisibles (Fabres *et al.*, 2005). Ils représentent toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, ou le transport des denrées alimentaires et des produits agricoles.

Il existe une grande diversité de pesticides qui diffèrent par leur structure chimique, leur fonction et leur mode d'action. On peut les classer selon leurs caractéristiques chimiques, la nature de l'organisme nuisible sur lequel ils doivent agir, ou leurs modes et période d'action (Anne-Antonella, 2015).

Les herbicides sont appelés parfois désherbants, notamment en horticulture. Ce sont des matières actives ou des produits formulés ayant la propriété de tuer les végétaux. Comme tous les autres pesticides, un produit herbicide se compose de deux types de constituants : les matières actives qui lui confèrent son activité herbicide et les formulants qui complètent la formulation. Ces derniers sont soit des charges ou des solvants qui n'ont qu'un rôle de dilution des matières actives, soit des produits qui améliorent la préparation (El habib, 2013).

Les fongicides permettent de combattre la prolifération des maladies des plantes provoquées par des champignons. Ils peuvent agir différemment sur les plantes soit en inhibant le système respiratoire ou la division cellulaire, soit en perturbant la biosynthèse des acides aminés, des protéines ou le métabolisme des glucides. Ils peuvent agir chez les champignons selon différents modes d'action tels que : l'inhibition de la synthèse des lipides (cas du boscalide) ou des stéroïdes (cas du tébuconazole), ainsi que inhibition de la germination des spores (cas de la bouillie bordelaise). Certains fongicides perturbent aussi les processus respiratoires (cas du chlorothalonil) ou inhibent la synthèse des microtubules (cas du propamocarbe) (Calvet *et al.*, 2005).

Les insecticides sont utilisés pour la protection des plantes contre les insectes. Ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction. Différents types existent à l'occurrence les neurotoxiques, les régulateurs de croissance et ceux agissant sur la respiration cellulaire. Les insecticides peuvent agir sur le système nerveux (exemple de la cyperméthrine), sur la

Première partie : GENERALITES

respiration (exemple de l'hydraméthylnon) ou sur la synthèse de composés cuticulaires (exemple du triazoxide) (El habib, 2013).

Les pesticides sont devenus un besoin pour les agriculteurs, car ils permettent l'intensification de l'agriculture afin de couvrir la demande exprimée dans les marchés sur les produits agricoles. En vérité, les pesticides ont un avantage concernant la protection des cultures et l'augmentation de la production, mais malheureusement leurs risques ont dépassé l'utilité de ces derniers, parce qu'ils endommagent l'environnement. Les pesticides ont contaminé presque toutes les parties de notre environnement (Aktar *et al.*, 2009), même si ils tuent quelques espèces visées comme les insectes, champignons et les plantes indésirables. Les effets des pesticides sur l'environnement sont nombreux : ils ont un effet sur la santé humaine, la faune, la flore, la contamination des eaux, le sol et l'air.

Les substances et les molécules issues des pesticides sont susceptibles de se retrouver dans l'air, le sol, les eaux et les sédiments, ainsi que dans les aliments. Ces substances et molécules constituent, par leur migration entre les compartiments de l'environnement, des dangers importants pour l'homme et les écosystèmes, avec un impact à court ou à long terme (Ministère de l'Environnement, de l'énergie et de la Mer, 2015).

Les matières actives phytosanitaires sont appliquées le plus souvent sous la forme de liquides pulvérisés sur les plantes et/ou sur le sol. Dans certains cas, elles sont incorporées au sol ou y sont injectées ou sont déposées sous forme de granulés, ou encore les graines en sont enrobées. Le produit de traitement, lors d'une application, se trouve réparti en proportion variant avec le stade de la culture, la formulation, la cible, la technique d'application et les conditions météorologiques entre le sol, le feuillage de la plante ou les résidus de culture et des pertes dues à la « dérive ». Dès qu'ils ont atteint le sol ou la plante, les pesticides commencent à disparaître : ils sont dégradés ou sont dispersés. Les matières actives peuvent se volatiliser, ruisseler ou être lessivées et atteindre les eaux de surface ou souterraines, être absorbées par des plantes ou des organismes du sol ou rester dans le sol (Taylor & Spencer, 1990).

7-Taxonomie bactérienne

La taxonomie ou systématique est la science du classement des organismes vivants. Elle consiste à regrouper les individus qui se ressemblent selon des critères prédéfinis et à éliminer les individus différents qui peuvent former un autre groupe distinct avec leurs semblables. Un groupe d'organismes spécifiquement défini sur la base de certains caractères est connu sous le nom de taxon. Ainsi, la taxonomie est importante pour l'identification des organismes, la description et la dénomination des taxons en se basant sur la similitude.

Première partie : GENERALITES

Dans la taxonomie bactérienne, le niveau le plus élevé est le domaine, suivi par le phylum, la famille, le genre, l'espèce et la sous-espèce (Brenner *et al.* 2005). Avec le développement des idées et des recherches, la taxonomie est en changement permanent au niveau de la classification, la nomenclature et l'identification. Il existe trois grands concepts pour définir les espèces : 1) le concept typologique ou morphologique, 2) le concept de l'espèce biologique, 3) le concept phylogénétique ou l'évolution des espèces.

Selon le concept morphologique, une espèce est un groupe d'organismes ayant des propriétés morphologiques et anatomiques proches. Sur la base du concept biologique, l'espèce est une population ou un ensemble de population dont les individus peuvent se reproduire entre eux et engendrer une descendance viable et féconde, ce concept n'est évidemment pas utilisé chez les procaryotes, en particulier les bactéries, d'où l'importance du concept le plus récent qui est la phylogénétique. La phylogénétique définit l'espèce comme étant un groupe d'individus qui ont un ancêtre commun et qui peuvent être séparés des autres espèces par des caractères distincts. Selon Garrity et ses collaborateurs (2007) « Une espèce est constituée par sa souche type et par l'ensemble des souches considérées comme suffisamment proches de la souche type pour être incluses au sein de la même espèce ».

8- Phylogénétique moléculaire

L'étude des relations évolutives entre les organismes en utilisant les données moléculaires (ADN, ARN ou séquences de protéines) est connue sous le nom de la phylogénétique moléculaire. Zuckerkandl & Pauling (1965) ont proposé le concept théorique de la reconstruction phylogénétique qui se base sur les macromolécules et de l'histoire évolutive. Le concept de l'horloge moléculaire a aussi été introduit. Il suggère que la vitesse d'accumulation des changements aléatoires dans les séquences de nucléotides ou d'acides aminés est généralement constante sur de longues périodes, de sorte que le nombre de différences entre deux molécules aux fonctions conservées chez deux organismes est approximativement proportionnel à l'évolution qui s'est déroulée dans le temps. Mais cette notion est très souvent fautive et démentie par les données.

Un arbre phylogénétique est un arbre schématique composé de nœuds et de branches, avec les nœuds reliant toutes les branches adjacentes. Les branches représentent des unités taxonomiques qui peuvent être des espèces, des populations ou des individus. Les relations entre les unités taxonomiques sont définies par branches en termes de descendance et d'ascendance, sous le nom de topologie des arbres (Graur & Li, 2000). Suite à une approche cladiste uniquement monophylétique, les groupes dérivant d'un ancêtre commun, devraient

former des unités taxonomiques telles que des genres, tribus, familles, espèces ou sous-espèces (Wink, 2007).

8.1- Avantages de la phylogénie moléculaire

Les données moléculaires, en particulier les séquences d'ADN, d'ARN et d'acides aminés, sont beaucoup plus fiables pour les études évolutives que les données morphologiques et physiologiques (Nei, 2005). Les caractères morphologiques peuvent être convergentes et de nature adaptative, tandis que les données moléculaires sont strictement héréditaires et moins propices à la convergence et l'homoplasie (Wink, 2007). D'une part, une séquence d'ADN est relativement résistante aux changements en raison de divers systèmes de réparation par une machinerie enzymatique complexe, réparation des lésions qui joue un rôle essentiel pour la pérennité de l'information. On distingue plusieurs mécanismes de réparation : (1) la réparation par une simple réversion de la lésion, (2) la réparation par excision de la lésion et remplacement en utilisant l'autre brin comme matrice, (3) la recherche d'une matrice contenant une séquence homologue (dans le cas où la lésion affecte les 2 brins). Ainsi, les caractères moléculaires évoluent de manière beaucoup plus régulière et donc une relation plus claire peut être déduite à partir des séquences d'ADN, de l'ARN ou d'acides aminés. D'autre part, les données moléculaires sont abondantes dans les bases de données publiques et beaucoup plus accessibles que les données morphologiques. Les procaryotes en particulier ont très peu de variations morphologiques et physiologiques, souvent considérées insuffisantes pour des études phylogénétiques (Nei & Kumar, 2000). D'où l'importance des données moléculaires dans l'étude de la phylogénie des microorganismes tels que les bactéries.

8.2- Phylogénie bactérienne et rhizobienne

Après l'âge noir « Dark age » de la phylogénie bactérienne (Woese et al. 1984; Woese 1994; Oren & Papke 2010) et à partir de 1977, le développement de la technologie du séquençage des protéines et des acides nucléiques a bouleversé la réflexion sur l'évolution du monde microbien. Woese et ses collaborateurs se sont basés sur des relations phylogénétiques plutôt que les similitudes morphologiques. Ainsi, ils ont obtenu 23 divisions principales classées dans trois domaines « *three domains of life* »: les bactéries, les archées et les eucaryotes. Ces relations phylogénétiques sont devenues l'ultime point de départ pour la comparaison des gènes ADNr 16S chez les procaryotes et ADNr 18S chez les eucaryotes.

Actuellement, les études de la taxonomie et de la systématique dépendent des données moléculaires, en particulier des séquences d'ADN chromosomiques. Ainsi, les analyses

Première partie : GENERALITES

phylogénétiques de différents gènes de ménages permettent de comprendre l'évolution de l'histoire des gènes chez les microorganismes. Jusqu'à présent la phylogénie repose sur les séquences moléculaires pour accepter ou refuser une hypothèse phylogénétique.

Bien que la classification et l'identification du rhizobium aient commencé sur la base de la capacité de nodulation et sur les caractéristiques morphologiques, l'analyse des séquences du gène ADNr 16S a permis d'éliminer les caractères basés sur le plasmide (nodulation, pathogénéicité ou la formation des racines capillaires). Elle a contribué de manière significative à l'identification de nouveaux rhizobia, et donc le séquençage du gène ADNr 16S est devenu un critère principal pour la taxonomie du rhizobium (Woese *et al.*, 1984), en raison de son ubiquité, de la facilité de l'amplification et du niveau approprié de conservation pour la plupart des souches bactériennes (Rivas *et al.*, 2009, Capella-Gutierrez *et al.*, 2014). En revanche, l'utilisation du gène ADNr 16S dans la classification taxonomique n'est pas suffisante pour la description de nouveaux taxons. Elle est limitée par: (1) toutes les séquences disponibles dans les bases de données ne sont pas de bonne qualité, (2) le pourcentage de similarité ne peut être appliqué pour déterminer une espèce. Ceci a été prouvé chez plusieurs espèces, le faible polymorphisme des séquences ADNr 16S de certains genres ne permet pas de distinguer les espèces étroitement liées (van Berkum *et al.*, 2003; Vinuesa *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2008; Harun-or *et al.*, 2012; Mousavi *et al.*, 2014; Harun-or *et al.*, 2014; Harun-or *et al.*, 2015; Villadas *et al.*, 2017), (3) le gène ADNr 16S pourrait occasionnellement subir un transfert horizontal, et donc la phylogénie basée sur ce gène seul pourrait ne pas refléter la phylogénie bactérienne. Par conséquent, la séquence ADNr 16S peut être utilisée pour attribuer un organisme inconnu à un groupe (genre ou famille).

Les gènes de ménage sont une alternative à l'ADNr 16S. Le choix de bons candidats comme marqueurs appropriés et aussi l'analyse MLSA (analyse multilocus des séquences) permettent d'assigner un organisme à une espèce ou à une sous-espèce (Gaunt *et al.*, 2001).

Les phylogénies basées sur le gène *recA* codant pour la protéine RecA, responsable de la réparation et la recombinaison homologue de l'ADN (Gaunt *et al.*, 2001) est généralement en concordance avec les phylogénies ADNr 16S chez l'ensemble des groupes de bactéries (Eisen 1995; Holmes *et al.*, 2004), et notamment des α -protéobactéries (Gaunt *et al.*, 2001). Le gène *atpD* codant pour la sous unité β de l'ATP synthase, est considéré comme un gène approprié pour la phylogénie bactérienne, en raison de sa conservation et sa constance fonctionnelle (Christensen & Olsen 1998, 2004; Gaunt *et al.*, 2001). Le gène *glnII* codant pour la protéine glutamine synthétase II (GSII), qui catalyse le glutamate et l'ammoniaque pour former la

glutamine, est largement distribué chez les eucaryotes mais restreint chez les familles des *Rhizobiaceae*, *Frankiaceae* et *Streptomycetaceae* (Crespo *et al.*, 1998). Tian *et al.* (2010) ont indirectement suggéré la présence de deux copies du *glnII* chez les *Rhizobium leguminosarum* nodulant *Vicia faba*, et récemment cette hypothèse a été confirmée par Sbabou *et al.* (2016) chez *R. leguminosarum* isolé à partir des nodosités de *Vicia ervilia*, et chez *R. laguerreae* associé à *Lens culinaris* par Taha *et al.* (2017).

8.3- Principales étapes de l'analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique utilisant des séquences nucléotidiques comme données se fait en quatre principales étapes :

- La sélection des marqueurs moléculaires,
- Le séquençage des marqueurs moléculaires sélectionnés,
- L'alignement des séquences multiples,
- La reconstruction des arbres phylogénétiques.

8.3.1- Sélection des marqueurs moléculaires

Dans la phylogénie d'espèces, il est important de choisir les marqueurs moléculaires appropriés au groupe taxonomique étudié. Chez les bactéries plusieurs mécanismes interviennent dans l'évolution moléculaire tels que : que la mutation, la duplication de gènes, les échanges génétiques par recombinaison ainsi que le transfert latéral de gènes. La duplication des gènes entraîne une perte de l'information génétique, qui se produit fréquemment chez les gènes multiples. Ceci exige le choix des gènes orthologues ayant une copie unique dans le génome, permettant ainsi de définir les relations phylogénétiques entre les espèces. En plus des critères cités, les marqueurs utilisés doivent être universalisés. Dans le cas des rhizobia, les gènes symbiotiques portés par des plasmides sont aussi étudiés. Ils ne sont pas utilisés dans la taxonomie en raison de leur capacité à être transférés, mais ils sont principalement étudiés pour identifier les espèces non-rhizobia capables de noduler les légumineuses et mener des recherches sur les endosymbiotes des légumineuses dans différentes zones biogéographiques.

8.3.2- Séquençage moléculaire

Le séquençage des gènes amplifiés se fait par la méthode de séquençage ciblé. Cette méthode a un grand intérêt dû à sa grande précision et sa sensibilité. Elle permet de détecter à la fois des variants rares et communs. Dans notre cas et pour séquencer les régions ciblées d'ADN chromosomique, la méthode de Sanger est la plus adéquate. Elle permet d'identifier les

positions des bases dans des paires de gènes dissemblables, les petites insertions/délétions dans les séquences d'ADN génomique. Les séquences obtenues brutes sont éditées par (1) élimination du début et de la fin de la séquence (baisse de la qualité), (2) identification des pics parasites (3) correction des ambiguïtés (N= base non déterminée) due à des superpositions de pics insuffisamment discriminés par le programme. Il existe plusieurs programmes d'analyses des séquences comme : « Chromas and ChromasPro DNA Sequencing Software – Technelysium Pty Ltd » et « BioEdit v7.0.5 General Information ».

8.3.3- Alignement et l'analyse des séquences multiples

En bio-informatique, l'alignement de séquences ou alignement séquentiel est une manière de représenter deux ou plusieurs séquences de macromolécules biologiques (ADN, ARN ou protéines) les unes sous les autres, de manière à en faire ressortir les régions homologues ou similaires. L'objectif de l'alignement est de disposer les composants (nucléotides ou acides aminés) pour identifier les zones de concordance Kumar & Filipski (2007).

La qualité des chromatogrammes des données de séquençage et leurs alignements sont très importants dans la reconstruction phylogénétique, son interprétation et les conclusions tirées sont fortement liées à un alignement correcte (Oren & Papke, 2010). Kumar & Filipski (2007) ont souligné l'importance de l'alignement des séquences d'ADN dans les analyses génomiques comparatives, y compris l'identification des séquences conservées et dans l'étude de l'évolution. Ils ont aussi confirmé que les erreurs dans l'alignement des séquences sont significativement corrélées avec l'interprétation phylogénétique erronée.

En inférence phylogénétique et à partir des données de séquence, chaque position de la séquence peut être considérée comme un trait de caractère indépendant. L'alignement est donc important pour identifier les positions d'homologues dans les séquences, et correspond à une matrice de données. Chaque colonne de l'alignement correspond à des traits homologues, et les résidus spécifiques (acide aminé ou nucléotide) représentent la présence ou l'absence d'un caractère. Ces alignements sont réalisés par des logiciels dont l'objectif est de maximiser le nombre de coïncidences entre nucléotides ou acides aminés dans les différentes séquences. Ceci nécessite en général l'introduction de « trous » à certaines positions dans les séquences, de manière à aligner les caractères communs sur des colonnes successives. Ces trous (lacunes) correspondent à des insertions ou des délétions (appelés indel) de nucléotides ou d'acides aminés dans les séquences biologiques. Le résultat final est traditionnellement représenté

comme des lignes d'une matrice. Bien que l'introduction des trous provoque une augmentation de la similarité des séquences, elle ne garantit pas un appariement parfait. L'insertion manuelle par un spécialiste est plus précise et permet d'avoir un bon alignement. Le logiciel GenDOC est parmi les logiciels performants largement utilisés (Nicholas *et al.* 1997).

8.3.4- Reconstruction des arbres phylogénétiques

La reconstruction phylogénétique a pour but d'étudier les relations entre entités (les espèces, les gènes ou les génomes) de manière à refléter leurs histoires évolutives (Darlu & Tassy, 1993; De Bruyn *et al.*, 2014) ainsi que la proximité génétique des individus. Actuellement, l'algorithme fréquemment appliqué est l'algorithme de *neighbor-joining*, proposé par Saitou & Nei (1987), implémenté dans divers logiciels (Felsenstein 1989; Kumar *et al.*, 2004). Différentes méthodes de génération d'arbres phylogénétiques, appelées méthodes d'inférence phylogénétique, peuvent être appliquées pour obtenir l'arbre qui reflète le mieux les données. Deux grandes catégories regroupent ces différentes méthodes : les méthodes basées sur la distance génétique et celles basées sur les caractères.

8.3.4.1- Méthodes basées sur la distance génétique

Ces méthodes utilisent une matrice d'estimation de la distance évolutive appelée matrice de dissimilarité, obtenue en comparant les paires de séquences. Les plus importantes méthodes sont : (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean UPGMA) (Michener & Sokal 1957) et (*neighbor-joining* : NJ) (Saitou & Nei, 1987). UPGMA est une méthode qui, par itérations successives, réduit progressivement la taille de la matrice fournissant l'ensemble des distances entre toutes les paires de séquences et produit un arbre enraciné. La méthode NJ effectue une recherche séquentielle des voisins en minimisant la longueur totale de l'arbre, et produit des arbres non enracinés. Actuellement, la méthode UPGMA n'a plus qu'un intérêt historique dans le cadre de l'inférence d'un arbre phylogénétique. Elle est remplacée par des méthodes plus avancées comme la NJ ou la parcimonie, puis par les techniques de maximum de vraisemblance ou algorithmes bayésiens utilisées aujourd'hui.

8.3.4.2- Méthodes basées sur les caractères génétiques

Les méthodes basées sur les caractères exploitent toutes les informations disponibles dans les séquences de chaque site homologue. Les méthodes les plus utilisées sont : Maximum de parcimonie (*Maximum parsimony MP*) (Björklund, 1990), le Maximum de vraisemblance (*Maximum likelihood ML*) (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967; Felsenstein, 1981) et la *Méthode bayésienne* (Delsuc & Douzery, 2004).

- **La méthode de maximum de parcimonie** : Ce principe propose que l'arbre phylogénétique le plus crédible ou le plus parimonieux soit l'arbre qui invoque le plus petit nombre de changements évolutifs. Elle consiste à rechercher parmi tous les arbres possibles et toutes les séquences possibles, des nœuds ancestraux et la combinaison qui requiert le plus petit nombre de changements évolutifs dans l'arbre phylogénétique (Björklund, 1990)

- **La méthode bayésienne** : Cette méthode utilise une distribution de tous les paramètres (topologies, longueurs des branches, taux relatifs des substitutions). Cette approche comporte certains problèmes comme la nécessité d'avoir à définir une distribution sur les hypothèses. Comme le calcul de la probabilité de toutes les topologies d'arbres est presque impossible, l'approche bayésienne est couplée avec la technique appelée « Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo », qui permet de générer un échantillon de la distribution postérieure des topologies d'arbres (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

- **La méthode de maximum de vraisemblance** : Les analyses du maximum de vraisemblance dépendent d'un modèle de substitution pour l'estimation de la probabilité d'un arbre donné. Elle est souvent décrite comme étant la meilleure méthode, très utile et puissante car elle donne souvent des estimations dont la variance est plus faible comparée à d'autres méthodes. Cette méthode d'estimation est la moins affectée par l'erreur d'échantillonnage. L'analyse de vraisemblance permet donc un examen explicite des hypothèses faites sur l'évolution de la séquence. Plusieurs logiciels peuvent être utilisées pour la reconstruction d'un arbre de maximum de vraisemblance tels que PAUP (Swofford *et al.*, 1996) ; PHYLIP (Felsenstein, 1988) ou MEGA (Tamura *et al.*, 2013).

8.4- Analyse de la robustesse par bootstrap

Une analyse de la robustesse appelée « bootstrap » doit être effectuée afin de compléter la construction de l'arbre phylogénétique avec les méthodes énoncées précédemment. Cette technique dérive des simulations de Monte-Carlo, qui consiste à comparer les positions de l'alignement en se basant sur plusieurs répétitions (entre 50 et 1000) pour relancer la construction phylogénétique. Le résultat est représenté sous forme d'un arbre consensus dans lequel figurent les regroupements majoritairement apparus. La valeur de bootstrap est un pourcentage de 0 à 100 % associé à chaque branche de l'arbre indiquant le nombre de fois où cette branche a été retrouvée au cours des répétitions et juger ainsi de leur crédibilité, cette valeur indique aussi une évaluation de la résistance d'un nœud.

8.5- Analyse des Séquences Multi-locus (MLSA)

La MLSA est basée sur le typage multilocus des séquences (Multilocus Sequence Typing (MLST)), qui a été introduit par Maiden *et al.* (1998) comme méthode de typage microbien pour les études épidémiologiques et génétiques des populations des espèces de bactéries pathogènes (au niveau de l'espèce). Par la suite, Gevers *et al.* (2005) ont défini MLSA comme méthode de caractérisation génotypique pour différents groupes de procaryotes. Les gènes de ménages, codant pour des protéines impliquées dans le maintien physiologique des procaryotes, sont considérés comme des marqueurs appropriés pour la phylogénie microbienne (Young *et al.*, 2006; Harrison & Langdale, 2006). Plusieurs études ont déduit que la MLSA est une des meilleures méthodes utilisées pour distinguer les espèces étroitement apparentées appartenant au genre *Rhizobium* (Mutch & Young, 2004; Vinuesa *et al.*, 2005; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008; Santillana *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2010 b; Harun-or *et al.*, 2014, 2015; Glaeser & Kämpfer, 2015; van Berkum *et al.*, 2006).

Au début, Maiden et ses collaborateurs (1998) ont utilisé 11 gènes de ménages d'environ 470 bp chez des souches de *Neisseria meningitidis*, l'analyse MLST basée sur 6 des 11 gènes a donné la même résolution, ainsi il a été déduit que le nombre et la sélection des loci pour une analyse MLST dépendent des taxons bactériens et de la résolution requise des études réalisées. Le nombre des gènes ne doit pas être considéré fixe. Il peut être étendu si une résolution intra-population élevée est requise. Tandis que, la sélection des gènes étudiés exige qu'ils soient : omniprésents chez les procaryotes, chromosomiques, diverses et que leur occurrence soit unique dans le génome. Dans cette dernière décennie, la méthode MLSA est considérée comme la meilleure approche pratique et la méthode préférée pour les analyses taxonomique et phylogénétique en microbiologie (Mousavi *et al.*, 2015; Glaeser & Kämpfer, 2015).

8.6- Gènes de nodulation et leur rôle dans l'analyse phylogénétique

La spécificité de la symbiose est déterminée par les gènes régulateurs de la transcription (*nod*) codant pour les facteurs nod (Dénarié *et al.*, 1996; Degefu *et al.*, 2013). Les gènes de nodulation *nodABC* sont des gènes très conservés présents chez la majorité des rhizobia, organisés en opéron sauf chez *Rhizobium etli* où le gène *nodA* est séparé des gènes *nodBC* (Vázquez *et al.*, 1991) et chez *Mesorhizobium loti* le gène *nodB* est séparé des gènes *nodAC* (Sullivan *et al.*, 2002). Les différences rencontrées au niveau des gènes nod jouent un rôle limitant dans la nodulation des espèces végétales. En effet, la souche *Mesorhizobium muleiense* CCBAU83963^T spécifique de *Cicer arietinum* (Zhang *et al.*, 2012) tandis que *Sinorhizobium* sp. NGR234 a un large spectre d'hôte et peut noduler aussi bien les légumineuses que les non-légumineuses,

Première partie : GENERALITES

comme *Parasponia andersonii* (Pueppke & Broughton 1999), de même, certaines légumineuses comme le haricot *Phaseolus vulgaris* et le soja *Glycine max* (Pedrosa *et al.*, 2006; Wasike *et al.*, 2009).

Chez les rhizobia en général, les gènes symbiotiques sont inclus dans le groupe des gènes auxiliaires (ou gènes accessoires), parce qu'ils ne sont pas essentiels à la survie et à la reproduction des rhizobia. Les gènes les plus étudiés sont *nodD*, *nodA*, *nodC* et *nifH* (Laguerre *et al.*, 2001; Moulin *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2009). Néanmoins, ces gènes plasmiques ne sont pas très utiles dans l'étude de la taxonomie, ainsi des corrélations n'ont toujours pas été trouvées entre les types obtenus dans l'analyse des gènes chromosomiques et symbiotiques, expliquées par le transfert latéral des gènes symbiotiques (Laguerre *et al.*, 1992; 1993; 1996). Plusieurs études comparatives de la diversité des gènes symbiotiques dans différentes zones bioclimatiques, ont montré une différenciation importante entre les sites étudiés. Cette différenciation a été expliquée par les contraintes environnementales climatiques, principalement la faible pluviométrie dans les climats semi-arides entraînant un stress hydrique. Sachant que la résistance à la sécheresse est un facteur sélectif structurant la diversité et que les variations environnementales ont un impact sur les structures des communautés bactériennes du sol (comme la latitude et la température (Staddon *et al.*, 1998)). Parmi les études qui ont fait état de la capacité des rhizobia à s'adapter aux changements bioclimatiques, Riah et ses collaborateurs (2014) avec l'étude de la structure génétique des rhizobia nodulant *Pisum sativum* et *Lens culinaris* dans deux zones éco-climatiques ; sub-humides et semi-arides en Algérie. L'analyse des gènes *nodD-F* des souches de *R. leguminosarum* isolées a montré une faible variation, mais avec une prédominance d'haplotypes décrits fréquents en Europe. En plus, aucun effet plante hôte n'a été détecté. Tandis que la phylogénie basée sur le gène *nodD* a suggéré que la diversité obtenue chez les populations de *R. leguminosarum* nodulant la lentille et le pois en Algérie est faible par rapport à celle rapportée dans le monde. L'étude phylogénétique et l'analyse comparative des gènes *nodA*, *nodC*, *nodH* et *nifH* des rhizobia spécifiques de *Astragalus glycyphyllos*, étroitement liés à *Mesorhizobium* (*Mesorhizobium amorphae*, *Mesorhizobium septentrionale* et *Mesorhizobium ciceri*) ont révélées que tous les isolats forment un seul clade, et qu'une similitude élevée entre les gènes symbiotiques (98 à 100%) a été montrée, ainsi se confirme l'hypothèse récente (à l'échelle évolutive) qu'est le transfert latérale de ces gènes (Gnat *et al.*, 2015). Chez les *Bradyrhizobium* nodulant le soja, l'analyse phylogénétique des gènes symbiotiques a permis de détecter de nouveaux des symbiovars potentiels (Delamuta *et al.*, 2017). Chez *Rhizobium leguminosarum* nodulant *Vicia*

Première partie : GENERALITES

ervilia au Maroc, l'étude de la diversité génétique basée sur le gène symbiotique *nodC* a montré une diversité semblable à celle répandue partout dans le monde. La différence observée par rapport aux autres pays concerne surtout l'abondance d'un haplotype par rapport à un autre et non pas le principe de présence/absence. Une grande diversité symbiotique a été obtenue et suggère qu'il s'agit d'une migration récurrente longue distance ou d'une sélection naturelle, en plus de la présence de plusieurs génotypes rares qui ont peut-être été maintenus dans les sols par hasard ou suite à la rotation des cultures, favorisant ainsi cette diversité (Sbabou *et al.*, 2016).

Deuxième partie :

MATERIEL ET METHODES

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

1- Zone d'étude

1.1- Présentation de la zone de l'étude

L'étude a été menée dans le Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire, précisément dans le département de Daloa, chef-lieu de la région du Haut Sassandra (Figure 7). Il est localisé entre 6°84' et 6°91' de latitude Nord et entre 6°41' et 6°48' de longitude Ouest (Konaté *et al.*, 2018). Ce département a une superficie de 5 450 km² et regroupe les Sous-Préfectures de Daloa, Bédiala, Gadouan, Gboguhé, Gonaté et Zaïbo. Il est limité par les départements de Zoukougbeu à l'Ouest, Bouaflé à l'Est, Issia et Sinfra au Sud, puis par ceux de Vavoua et Zuénoula au Nord. Selon le Recensement Général de la Population et de l'Habitat (RGPH), la population du Département était de 591 633 habitants en 2014. Cette population est constituée de trois (3) groupes. Le premier groupe est constitué des populations autochtones qui sont : les Bété, les Niamboua, les Kwia, les Gouro et les Niédéboua. Le second groupe comprend les populations allochtones composées en majorité des AKan (Baoulé), Sénoufo et Malinké. Le dernier groupe est constitué d'allogènes dont des populations de la CEDEAO (Burkinabès, Maliens, Guinéens, Sénégalais et Nigériens) et les communautés libanaises et Mauritanienes (PRICI, 2016).

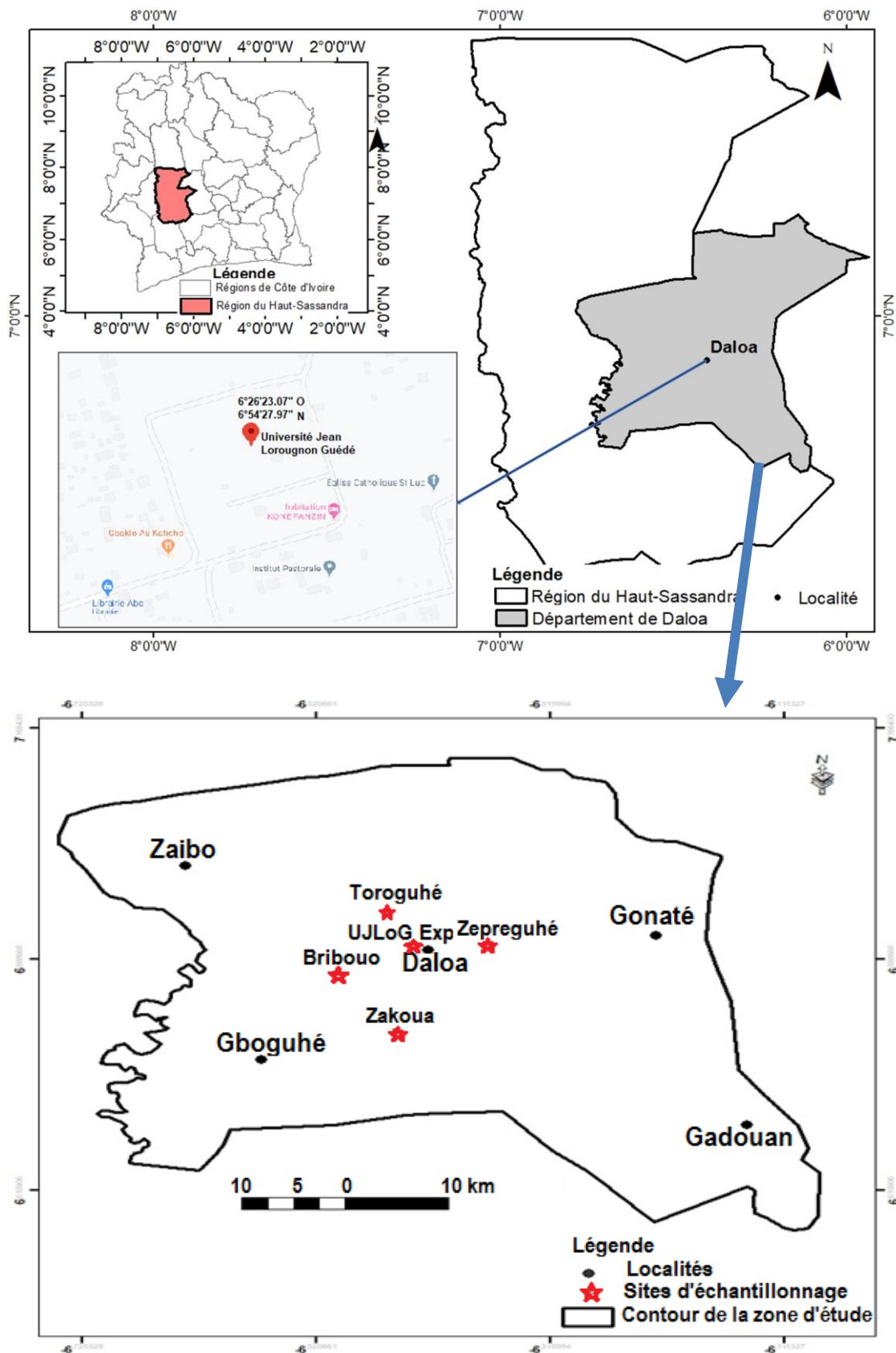
La région du Haut Sassandra est située dans la Moyenne Côte d'Ivoire Forestière. Elle est couverte par une forêt dense humide semi-décidue à une forêt défrichée mésophile (Kouamé & Zoro Bi, 2010). Les sols du département de Daloa sont de type ferrallitique moyennement lessivés et des ferrisols (Brou, 2010 ; Konaté *et al.*, 2018).

Le régime climatique du département de Daloa est celui du domaine Guinéen. C'est un climat humide avec quatre saisons dont deux saisons pluvieuses et deux saisons sèches. La première saison des pluies se situe entre avril et mi-juillet et marque la plus grande saison des pluies. La seconde saison pluvieuse est de courte durée. Elle se situe entre mi-septembre et novembre. Les deux saisons se situent entre décembre et mi-mars, puis entre mi-juillet et mi-septembre respectivement pour la grande et la petite. Les pluviométries moyennes sont comprises entre 1400 et 1600 mm par an avec une moyenne annuelle de 1300 mm. La température moyenne annuelle est de 25,6 °C. Selon Brou (2005), le mois de juin représente le pic de la grande saison pluvieuse et celui de septembre, le pic de la petite saison des pluies. Ces deux maxima sont séparés par un ou deux mois plus ou moins pluvieux. Ces conditions naturelles favorables à un bon développement agricole ont été à la base de la migration des populations allochtones et allogènes vers cette zone qui demeure une zone agricole de référence.

Les activités agricoles sont assez diversifiées dans le département de Daloa. On y trouve les cultures de rente comme le café, le cacao et l'hévéa. C'est la deuxième zone de production du

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

cacao et la première du café du pays (MINAGRI, 2010). Les principales cultures familiales sont le riz, la banane plantain, le manioc, le maïs et les légumes (Koffie-Bikpo & Kra, 2013).



Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

1.2- Justification du choix de la zone d'étude

Le département de Daloa situé dans la région du Haut Sassandra est couvert par une forêt dense humide semi-décidue à une forêt défrichée mésophile (Guillaumet & Adjanohoun, 1971 ; Kouamé & Zoro Bi, 2010). Il a connu une perte de 84 % de sa superficie en forêts pendant les quatre (4) dernières décennies au profit des cultures de rente (Koné *et al.*, 2014). En effet, la région du Haut Sassandra qui abrite la zone de l'étude a une part importante dans la production et la commercialisation des produits de rentes tels que le cacao, le café et l'hévéa. En 2003, elle occupait 21 % de la surface totale de la production cacaoyère en Côte d'Ivoire (Konaté *et al.*, 2015a). Malgré ses potentialités, le Haut Sassandra fait partie des huit (08) régions qui enregistrent les taux élevés de populations rurales extrêmement pauvres avec 59,7 % (Youan Bi, 2016 ; Ducroquet, 2017). Ce paradoxe est dû au fait que les engrais et les pesticides utilisés par les agriculteurs sont acquis à crédit. Ceux-ci ont le devoir de rembourser ces crédits après les récoltes. Ainsi, lorsque leurs recettes sont inférieures aux investissements réalisés, certains parmi eux sont contraints de brader leurs champs pour rembourser les crédits contractés (Youan Bi, 2016). De plus, l'utilisation répétée des jachères ne permet plus aux agriculteurs d'être autosuffisants en aliments.

Cet état de fait a motivé les autorités à assigner à l'Université Jean Lorougnon Guedé de Daloa une vocation agroforestière afin de proposer des solutions durables pour le développement de l'agriculture et la préservation de l'environnement.

Ce travail soutenu par l'Université Jean Lorougnon Guedé et réalisé dans cette université permettra de proposer aux agriculteurs de cette zone, à court terme, des techniques culturales viables économiquement et écologiquement. En effet, les agriculteurs de la zone de l'étude pourront utiliser le pois bambara inoculé avec les bactéries locales promotrices de croissance pour fertiliser les reliques de terre dont ils disposent. Ils pourront ainsi réduire les investissements liés à l'achat des intrants chimiques. Aussi, la vente des graines du pois bambara ou de ses produits dérivés pourrait-elle leur permettre de diversifier les sources de revenu. Parallèlement, l'on assistera à la promotion de la culture du pois bambara (*Vigna subterranea*) et des biens faits de cette légumineuse qui est méconnue et dont la culture est inexistante dans ce département.

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

2- Matériel

2.1- Matériel biologique

2.1.1- Matériel végétal

Le matériel végétal est composé des semences de cinq (5) cultivars du pois bambara (*Vigna subterranea*). Ce sont les cultivars Ci1, Ci2, Ci3, Ci5 et Ci6 (Figure 8). Les graines des cultivars Ci1 et Ci2 ont été obtenues chez quelques agriculteurs à Ferkessedougou. Quant aux graines des cultivars Ci3, Ci5 et Ci6, elles ont été achetées sur les marchés de Daloa. Les graines trouvées sur les marchés proviendraient en grande partie du Burkina Faso, du Mali et une petite partie du Nord de la Côte d'Ivoire selon les commerçants rencontrés.

L'aspect des graines et le cycle de culture de ces différents cultivars du pois bambara ont été décrits par Touré *et al.* (2013) et sont consignés dans le tableau II. Les graines présentent différents aspects avec des cycles variant entre 105 et 120 jours



Figure 8 : Graines de différents cultivars du pois bambara

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

Tableau II : Caractéristiques de cinq cultivars du pois bambara (*Vigna subterranea*)

Code	Aspect des graines	Durée du cycle (jours)
Ci1	Blanc	105
Ci2	beiges roux tachetés de rouge foncé	120
Ci3	Marbrures noires et brunes sur fond crème	105
Ci5	Rouge foncé	120
Ci6	Crème avec œil noir en forme de papillon	120

Source : (Touré *et al.*, 2013)

2.1.2- Matériel bactérien

Le matériel bactérien est constitué des bactéries locales isolées de nodules des cinq (05) cultivars de pois bambara testés dans cette étude et des souches de *Rhizobium leguminosarum* L01, *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 et *Mesorhizobium sp* STM 183 utilisées comme références. Ces dernières ont été octroyées par le Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire de la Faculté des Sciences de l'Université Mohamed V de Rabat, Maroc.

2.2. Matériel technique

Le matériel technique est constitué du matériel de laboratoire et de matériel de terrain.

Le matériel de laboratoire est essentiellement constitué de :

- verreries (tubes à essai ; tubes à hémolyse, béchers, éprouvettes graduées, erlenmeyers, flacons) pour la mesure et la préparation des solutions et des réactifs, la mise en culture et conservation des bactéries ;
- boîtes de Pétri pour la mise en culture des bactéries ;
- balance électronique de marque Adventurer Pro de précision 0,01 g pour réaliser les pesées ;
- vortex pour homogénéiser les précultures ;
- plaque chauffante pour homogénéiser et chauffer les milieux de culture, des solutions et des réactifs ;
- étuves, agitateur-incubateur de tubes à essais et agitateur-incubateurs d'erlenmeyer pour l'incubation des cultures ;
- hotte, bec Bensen, et autoclave pour la stérilisation et l'aseptisation ;
- surgélateurs, congélateurs et réfrigérateurs pour la conservation des bactéries, de leur ADN et des produits de PCR ;

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

- spectrophotomètre UV (NanoDrop) pour la mesure de la concentration et de la pureté de l'ADN ;
- spectrophotomètre, lecteur de plaque et plaques pour la mesure de DO ;
- centrifugeuse et centrifugeuse à vortex pour l'éclatement des cellules et l'homogénéisation ;
- thermocycler pour l'amplification des séquences de l'ADN ;
- cuves à électrophorèse pour la migration des produits de la PCR ;
- système photo print pour la visualisation des produits de la PCR ;
- pH-mètre pour la mesure du pH ;
- pipettes, micropipettes et anse pour les prélèvements ;
- seringues et filtres pour les prélèvements et filtrations ;
- papier filtre pour le test de production de l'AIA ;
- cuves à spectrophotomètre pour la lecture de la DO et le mélange des filtrats et des réactifs ;
- tubes en plastique pour la préparation des solutions, des réactifs et la mise en culture des bactéries ;
- microscope optique pour l'observation de la forme des bactéries et de la coloration de leur paroi ;
- appareil photographique pour les prises de vues.

Le matériel de terrain est composé de :

- machettes et de dabas pour la collecte des échantillons de sol ;
- sacs plastiques pour conserver les échantillons de sol ;
- pots en plastique de 3 litres pour les essais en conditions contrôlées ;
- G.P.S (Global Positioning System) pour géoréférencer les sites d'échantillonnage des sols.

3- Méthodes

3.1- Constitution d'une collection de bactéries nodulaires autochtones du pois bambara

2.3.1.1. Collecte des échantillons de sols

Une prospection de différentes localités du département de Daloa a été entreprise pour collecter des échantillons de sols dans le but d'avoir une collection hétérogène de bactéries associées au pois bambara. Les échantillons de sols ont été prélevés sur cinq (5) sites à savoir Bribouo, Toroguhé, Zakoua, Zépréguhé et Daloa. Les sites échantillonnés n'avaient jamais reçu la culture du pois bambara et sans précédents culturaux récents de légumineuses.

Sur chaque site, des sous-échantillons de sols ont été prélevés à l'aide d'une tarière à une profondeur de 0 à 15 cm au hasard dans cinq (5) endroits distincts et mélangés pour obtenir un

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

échantillon composite. Au total cinq (5) échantillons composites correspondant aux différents sites ont été transportés au laboratoire, puis conservés dans des sacs plastiques à fermeture hermétique à la température ambiante.

2.3.1.2- Piégeage des bactéries du sol

Le piégeage des bactéries présentes dans les échantillons de sols composites prélevés a été réalisé en conditions sémi-contrôlées (sous abri et un régime hydrique dépendant d'un arrosage régulier) sur le site expérimental de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa (6°54'27,37''N ; 6°26'11,26''W). Des pots en plastique de capacité 3 litres ont été remplis avec les sols composites échantillonnés. Ces pots ont une profondeur de 17 cm et un diamètre de 20 cm en surface et 15 cm à la base.

Les graines des cinq (5) cultivars de pois bambara ont été stérilisées en surface successivement avec l'éthanol 70 % pendant 3 min et l'hypochlorite de sodium (12° chl) 30 % pendant 2 min, suivi par une série de rinçage à l'eau distillée stérile selon la méthode de Somasegaran & Hoben (1994).

Six (6) graines stériles de chacun des cultivars ont été semées dans chaque pot à une profondeur de 3 cm. Chaque cultivar a été semé à trois répétitions par localité en raison de six (6) graines par pot (Figure 9), soit 15 pots par localité et 75 pots pour l'ensemble de l'essai. Après la germination, les plantules ont été démarquées afin de laisser croître que trois (3) plantules par pot et l'arrosage a été fait deux (2) fois par semaine avec l'eau distillée.

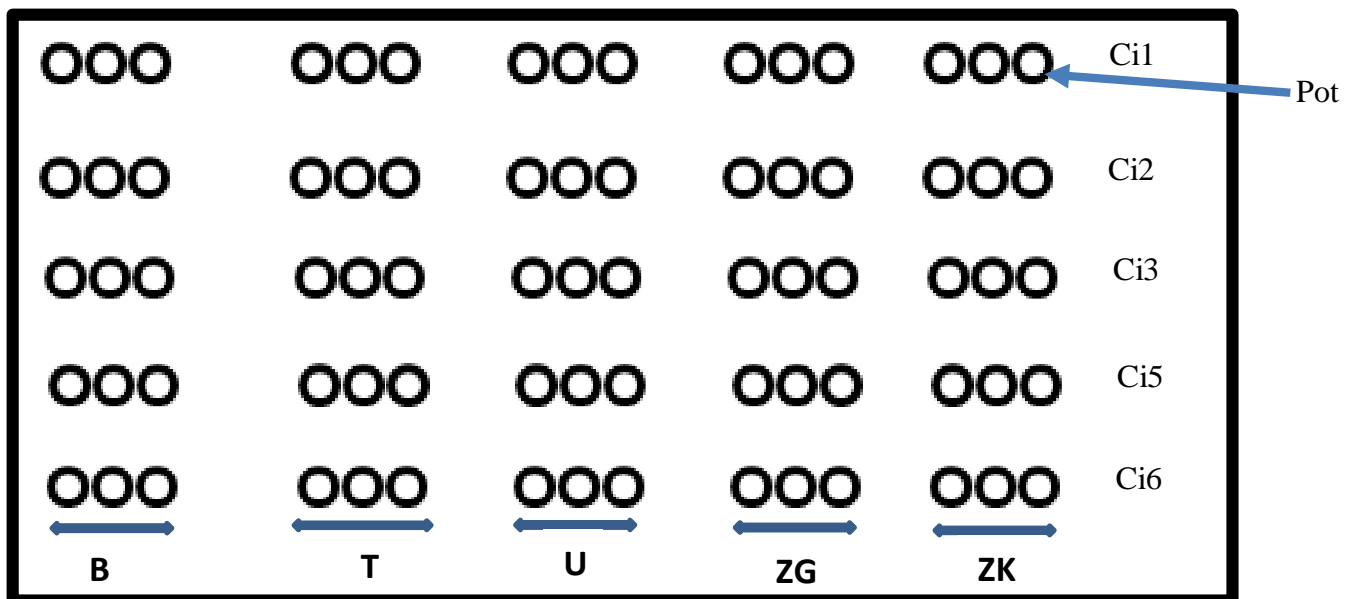


Figure 9 : Dispositif de piégeage des rhizobactéries natives sur des sols de 5 provenances
B : Sol de Bribou, **T** : Sol de Toroguhé, **U** : Sol de l'UJLoG, **ZG** : Sol de Zépréguhé,
ZK : Sol de Zakoua

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

3.1.3- Collecte et conservation des nodules

La collecte des nodules a été réalisée au niveau des racines des plantules de pois bambara obtenues au début de la floraison (soit 45 jours après semis). Les plantules ont d'abord été délicatement retirées des substrats. Ensuite, les mottes de terres ont été débarrassées manuellement des racines sans toutefois endommager les nodules. Puis, le système racinaire (racines et nodules) a été lavé plusieurs fois à l'eau ordinaire afin d'éliminer les restes de terre. Enfin, les nodules obtenus ont été séchés sur du papier filtre et conservés au réfrigérateur à 4° C pour usage allant jusqu'à deux (2) jours. Toutefois, pour une longue durée de conservation allant de 6 à 12 mois, une dessiccation a été faite. La méthode utilisée est celle décrite par Vincent (1970) et Somasegaran & Hoben (1994). Elle a consisté à déposer les nodules sur du coton dans des flacons stérilisés préalablement remplis de moitié par du chlorure de calcium.

3.1.4 - Isolement et purification des bactéries

L'isolement a été réalisé en conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire selon la méthode classique d'isolement décrite par Cleyet-Marel (1989). Les nodosités prélevées ont été maintenues séparément, désinfectées successivement avec l'éthanol 70 % pendant 3 min et l'hypochlorite de sodium (12° chl) 30 % pendant 2 min, suivi par une série de rinçage (10) avec l'eau distillée stérile.

Un nodule stérile est déposé dans un tube eppendorf contenant 50 µL d'eau stérile, écrasé à l'aide d'une pince fine préalablement stérilisée par incinération. Une quantité de 10 µL de la suspension obtenue a été prélevée puis étalée directement sur le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) solide additionné de rouge congo (Annexe 1). Un milieu témoin a été ensemencé par dix (10) µL de l'eau du dernier rinçage. Les cultures ont été incubées à 28 °C à l'étuve pendant sept (7) jours.

Après l'incubation, certains isolats ont été choisis en se basant sur l'aspect morphologique des colonies, une série de repiquages par stries selon la méthode décrite par Jordan (1984) a été nécessaire afin de s'assurer de la pureté de ces isolats bactériens. Ils ont été codés par les initiales de la localité de provenance des échantillons de sol (exemple B pour Bribouo) suivis du code du cultivar (exemple Ci3) et d'un numéro d'ordre de sélection.

3.1.5- Caractérisation morphologique et biochimique des bactéries

Les isolats purifiés ont été décrits selon certains critères par observation et description des caractères culturels sur les milieux gélosés. Il s'agit de : la forme, la taille (diamètre), la

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

chromogène (la couleur), l'opacité, l'élévation, le pourtour (la surface) et l'aspect (la consistance) des colonies.

Cette description macroscopique a été suivie d'une coloration de Gram (une coloration différentielle) de la paroi. C'est une double coloration qui permet de mettre en évidence la forme, l'arrangement, la pureté et la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Ainsi, à partir de pré-culture de chaque isolat, des frottis ont été réalisés sur des lames à l'aide d'une anse de platine (flambée et refroidie) puis fixés à la chaleur du bec Bunsen. Ces lames ont été recouvertes par une série de colorations dont le violet de gentiane (1 min), une solution iodée (lugol) pendant 30 secondes, quelques gouttes d'alcool-acétone et la fuschine (1 min). Chaque étape a été suivie d'un rinçage à l'eau distillée. Après séchage des lames, les bactéries colorées ont été observées au microscope (X 100) avec de l'huile à immersion.

2.3.1.6- Sélection, nomenclature et conservation des isolats bactériens

Dans le but de constituer une collection hétérogène, certains isolats ont été choisis en tenant compte de la diversité morphologique montrée par la description des colonies et par l'étude biochimique des isolats. Ces isolats sélectionnés ont été codés RVC (Rhizobactéries associées à *Vigna subterranea* en Côte d'Ivoire) et conservés pour des études ultérieures.

Deux modes de conservations ont été effectués parallèlement :

- Une conservation par ensemencement dans des tubes à essai contenant le milieu YEM solide sans rouge de Congo et en forme inclinée. Après incubation à 28 °C pendant 48h, les tubes sont conservés à 4 °C au réfrigérateur, pour une courte durée de 6 à 12 mois maximum (Vincent, 1970).
- Une conservation longue durée a été effectuée en utilisant des cryotubes contenant 500 µl de glycérol à 40% stérilisé, additionné de 500 µl de la culture bactérienne en phase exponentielle. Les isolats bactériens ont été conservés en trois exemplaires à -80°C.

3.2- Caractérisation moléculaire des isolats bactériens

3.2.1- Extraction de l'ADN génomique

L'ADN a été extrait à partir des cellules bactériennes mises en culture dans le milieu YEM liquide selon le protocole de Chen & Tsong-Teh (1993). L'ADN a été isolé des protéines qui l'entourent par une extraction différentielle suivant le gradient de sel. La pelote d'ADN a été obtenue par addition de sel et d'éthanol absolu.

Un volume de 3 mL de chaque préculture liquide a été centrifugé pendant 10 min à 13000 rpm dans des tubes eppendorfs stériles.

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

Pour lyser les cellules bactériennes, le culot a été suspendu dans le tampon de lyse [40 mM Tris acétate (pH7.8), 1 mM EDTA, 1 % SDS, 20 mM acétate de sodium, ARNase à 20 µg/mL] à raison de 300 µL par eppendorf. Ensuite 100 µL du NaCl (5 M) ont été ajoutés puis le mélange a été vortexé et mis en incubation sur la glace pendant 15 min. Après une centrifugation de 10 min à 13000 rpm, le surnageant a été récupéré dans de nouveaux eppendorfs stériles.

Dans chaque tube a été ajouté un volume égal du mélange chloroforme/alcool isoamylique (v/v) (24 :1) soit 450 µL suivi d'une douce agitation et d'une inversion des tubes jusqu'à l'obtention d'une solution blanche. La séparation des phases aqueuse et organique a été faite par centrifugation à 13 000 rpm pendant 3 min. La phase aqueuse qui contient les acides nucléiques a été récupérée dans de nouveaux eppendorfs en prenant soin de ne pas toucher l'interphase qui contient les protéines.

La précipitation de l'ADN a été réalisée par l'ajout de deux volumes (2V) de l'éthanol absolu froid suivi d'une centrifugation de 10 min à 13000 rpm. Ensuite, l'ADN a été lavé dans 700 µL d'éthanol 70 % froid et centrifugé pendant 10 min à 13000 rpm, le surnageant a été jeté puis le culot séché à l'air libre a été dissout dans 55 µL d'une solution de TE (pH 7.8, 10 mM Tris-Hcl, 1 mM EDTA) et 1 µL d'ARNase à 20 µg/mL.

3.2.2- Evaluation de la quantité et de la qualité de l'ADN

La concentration et la pureté de l'ADN ont été mesurées par Nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo scientific) qui utilise le principe d'un spectrophotomètre (Loi de Beer Lambert) et selon les directives du fabricant. La concentration est déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 et à l'aide de la relation suivante : 1 unité d'absorbance correspond à 50 ng.µL⁻¹ d'ADN. La pureté est évaluée par le ratio 260:280 et le ratio 260:230. En effet, les acides nucléiques absorbent majoritairement à 260 nm, les protéines quant à elles absorbent majoritairement à 280 nm à cause des acides aminés aromatiques. Les molécules organiques (tampons, etc...) absorbent majoritairement à 230 nm. De ce fait, les ratios 260:280 et 260:230 sont utilisés respectivement pour évaluer la contamination de protéines et la contamination provenant de l'échantillon ou de la purification, comme par exemple le phénol, les peptides, l'EDTA, les polysaccharides dans une solution d'acides nucléiques.

La pureté d'une solution d'acide nucléique est considérée comme acceptable lorsque le ratio 260:280 est compris entre 1,8 – 2,0 et le ratio 260:230 est compris entre 2,0 – 2,2 pour l'ADN.

Les extraits d'ADN ont été par la suite stockés à -20° C puis ajustés à une concentration de 50 ng avant utilisation.

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

3.2.3- Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S par PCR

La présente PCR consiste à multiplier la séquence du gène de l'ARNr 16S encadrée par les amorces universelles (fD1 et rD1) spécifiques de ce gène (Tableau III) et a été réalisée selon le protocole standard de MyTaq Mix (BIOLINE).

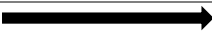
Le volume final du mélange réactionnel de PCR était de 25 µL contenant 12,5 µL du mélange myTaq, 2X (BIOLINE), 1 µL chaque amorce, 1 µL (50 ng) d'extrait d'ADN et 9,5 µL d'eau de PCR sans nucléase. Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycler PCR (multiGeneoptiMAX, Labnet).

Les mélanges réactionnels ont subi :

- une dénaturation initiale à 95 °C pendant 3 min ;
 - une dénaturation à 94 °C pendant 1 min ;
 - une hybridation des deux amorces à 54 °C pendant 45 s ;
 - une élongation à 72 °C pendant 2 min.
 - une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 7 min.
- } 35 cycles

Les amplifiats ont été mélangés avec le tampon de charge, puis sont vérifiés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1% (p / v) coloré au BET (100 mg/mL) dans le tampon TAE (1X). La migration a été faite pendant 90 min à 70 volts et enfin les bandes ont été visualisées sous lumière ultraviolette et photographiées à l'aide d'un système photo print (ENDURO™ GDS Labnet). Le 1KB ladder (Annexe 2) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire pour chaque gel.

Tableau III : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S

Amorce	Séquence 5'  3'	Taille du gène cible	Référence
fD1	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1500 pb	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
rD1	5'-AAGGAGGTG ATC CAG CC-3		

3.2.4- Identification moléculaire

3.2.4.1- Purification et séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S

l'ADNr 16S est le premier gène ciblé pour l'étude de la diversité bactérienne et des relations phylogénétiques pour sa présence chez toutes les bactéries, sa fonction constante et la présence de ses zones très conservées ainsi que de ses parties à séquence variable (Woese, 1987 ; Schleifer & Ludwig, 1989 ; Stackebrandt & Goebel, 1994).

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

Le séquençage partiel de l'ADNr 16S a été effectué à partir des produits d'amplification. Ces derniers ont été purifiés en utilisant le Kit de purification de produit PCR de Qiagen, puis ont été soumis à un séquençage de cycle en utilisant les mêmes amorces que pour l'amplification par PCR. Les produits ont été analysés avec un séquenceur automatique 3130xl dans les installations de séquençage du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) Rabat (Maroc).

3.2.4.2- Traitement des séquences

Les séquences brutes obtenues après séquençage sous forme de chromatogramme, ont été traitées avec le logiciel ChromasPro V2.1 (Technelysium Pty Ltd. s. d.). Afin de vérifier la qualité des séquences, le début et la fin des séquences qui présentaient souvent des pics illisibles ont été éliminés, les ambiguïtés (N= base non déterminée, M = A ou C, K = G ou T, R = A ou G, Y= C ou T) ont été corrigées et les doubles pics, reflet d'un mélange de deux séquences différentes ont été identifiés.

Les séquences finales sont analysées et comparées avec celles de la base de données GenBank en utilisant le programme Blastn disponible sur le site Blastn EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) et NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), puis déposées et identifiées dans la banque de données Genbank *via* un numéro d'accèsion (ATCC number).

Les séquences traitées ont été exportées sous format FASTA au Logiciel GeneDOC V2.7 (Nicholas *et al.* 1997) ; par la suite, elles ont été alignées entre elles et comparées aux séquences de référence obtenues par BLASTn NCBI.

Enfin, les séquences ont été analysées avec le logiciel Mothur ver.1.32.1 (Schloss *et al.* 2009), afin de déterminer le nombre d'haplotypes et de grouper les isolats ayant des séquences identiques. Les représentants de chaque haplotype ont été utilisés pour la construction des phylogénies.

3.2.4.3- Construction d'arbres phylogéniques

La construction des arbres phylogénétiques a été basée sur la méthode de Neighbor joining (Saitou & Nei, 1987). L'arbre optimal avec la somme de la longueur des branches = 0,93975877 a été affiché et chaque phylogénie a inclus les représentants des haplotypes obtenus précédemment, en plus des séquences de références récupérées par BLASTN dans la base de données GenBank. Pour chaque nœud, une valeur de bootstrap a été évaluée avec 1000 répliquions pour estimer la probabilité de l'existence des différents noeuds, les plus souvent rencontrés parmi tous les arbres générés. Le pourcentage d'arbres répliqués dans lesquels les

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

taxons associés s'étaient regroupés dans le test bootstrap, a été indiqué à côté des branches (Felsenstein, 1985).

L'arbre a été dessiné à l'échelle avec des longueurs de branche dans les mêmes unités que celles des distances évolutives utilisées pour déduire l'arbre phylogénétique. Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance composite (maximum likelihood methods: ML) (Tamura *et al.*, 2004) et sont exprimées en unités du nombre de substitutions de base par site. Ces analyses évolutives ont été menées dans le logiciel MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

3.3- Caractérisation phénotypique des bactéries associées au pois bambara

3.3.1- Caractérisation physiologique et symbiotique des rhizobia

Ces tests concernent les 15 souches identifiées comme des rhizobia lors de la caractérisation moléculaire et ont été réalisés afin d'évaluer la diversité phénotypique qui existe entre ces souches.

3.3.1.1- Vitesse de croissance des souches rhizobiales sur YEMA + Bleu de bromothymol

Les souches ont été ensemencées sur milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) additionné d'une solution de Bleu de bromothymol (Annexe 3). Ce colorant est un indicateur de pH qui permet de mettre en évidence la vitesse de croissance des bactéries (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970). Les boîtes ensemencées ont été mises en incubation à 28°C pendant 24 heures. L'acidification du milieu par les bactéries à croissance rapide se traduira par une coloration jaune tandis qu'une coloration bleue indiquera la présence de bactéries à croissance lente dans un milieu alcalin.

3.3.1.2- Assimilation des substrats carbonés par les souches rhizobiales

Les souches ont été ensemencées sur le milieu YEMA modifié ; l'extrait de levure est réduit à 0,05 g/l et le mannitol est substitué à chaque fois par différents sucres tels que D-Fructose, D-Galactose, D-Saccharose, D-Glucose, Mannose, Tréhalose, Lactose et Maltose, à concentration de 0,1 %. Le milieu YEM contenant le Mannitol à 0,1 % a été utilisé comme milieu de référence (Somasogaran & Hoben, 1994). Les boîtes de pétri ont été subdivisées en sections. Chaque section a été ensemencée par spot avec 10 µL des pré-cultures fraîches en phase exponentielle de croissance et incubés à 28 ° C pendant 72 h.

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

3.3.1.3- Authentification

L'authentification a consisté à vérifier l'aptitude des souches à rénoduler leur plante hôte. La capacité à induire la formation de nodules sur les racines de la légumineuse hôte est un trait distinctif des bactéries de la famille des Rhizobiaceae (Somasegaran & Hoben, 1994). a été conduit sous abri à la station expérimentale de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa selon les étapes suivantes :

- Préparation du substrat

Le substrat utilisé était le sable blanc de rivière. Ce substrat a été traité avec une solution de HCl à 7 % dans le but d'éliminer toute trace de matière organique. Après un lavage abondant à l'eau distillée et un séchage à l'air libre, le sable a été réparti dans des pots préalablement désinfectés à raison de 3 kg par pot, couvert avec du papier aluminium et autoclavé pendant une (1) h. Ces pots ont été préalablement désinfectés à l'eau de javel (12° chl) et ont été perforés pour assurer l'aération et le drainage d'un éventuel excès d'eau (Figure 10).



Figure 10 : Traitement du substrat

A : Sable de construction riche en matière organique. **B** : Sable en début de lavage. **C** : Sable en fin de lavage. **D** : Sable séché. **E** : Stérilisation du sable. **F** : sable stérile prêt à être utilisé.

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

- Stérilisation des graines

Les graines des cinq (5) cultivars de pois bambara ont été stérilisées successivement avec l'éthanol 70 % pendant trois (3) min et l'eau de javel (12° chl) 30 % pendant deux (2) min, suivi par une série de rinçage à l'eau distillée stérile. Elles ont ensuite été laissées dans la dernière eau de rinçage pendant 4 h à 4 °C puis transférées aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant l'eau gélosée à 0,9 %, et incubées pendant trois (3) à sept (7) jours à 28 °C. Après germination, les plantules ont été transférées dans les pots contenant du substrat stérile à raison de trois (3) plantules par pot et trois (3) pots par traitement.

- Préparation des inocula et inoculation des plantules

Les souches bactériennes ont été mises en culture dans des tubes contenant 25 mL du milieu YEM liquide, puis incubés à 28 °C dans un incubateur-agitateur à 120 tours/min pendant deux (2) jours. Chaque suspension bactérienne dont la charge a été estimée à 10^9 bactéries/mL, a été utilisée pour inoculer les plantules du morphotype hôte. L'inoculation des plantules a été faite par dépôt de 1 ml de culture au niveau des racines de chaque plantule. Pour chaque cultivar, des plantules non inoculées ont servi de témoins (témoin négatifs non inoculés et non azotés et témoins positifs non inoculés mais azotés) et ont été traités en parallèle dans les mêmes conditions de cultures.

La solution nutritive de Broughton & Dilworth (1971) en Annexe 4, a été utilisée pour l'irrigation de tous les pots. Pour les témoins positifs, la solution a été additionnée de KNO_3 à une concentration de 0,5 g/L.

- Evaluation de la capacité infective préliminaire

Trente-cinq (35) jours après inoculation, toutes les plantes ont été dépotées délicatement puis lavées pour évaluer la capacité de chaque isolat bactérien à former des nodosités sur le système racinaire de leur plante hôte respective. Les nodules ont été collectés puis dénombrés.

3.3.1.4- Evaluation de la performance symbiotique des rhizobia authentiques du pois bambara

La capacité symbiotique d'une souche de rhizobium est évaluée par deux paramètres : son infectivité et son efficacité. L'infectivité de chaque souche est appréciée par le nombre de nodosités formées sur la racine de chaque plante. L'efficacité a été estimée par la détermination du pourcentage de gain en matière sèche de la partie aérienne des plantes inoculées par rapport aux témoins non inoculés (El-Hilali, 2006).

Les 15 souches authentifiées avec leurs cultivars hôtes ont été testées à nouveau avec le cultivar

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

Ci3 afin d'évaluer leurs performances symbiotiques. En dehors de l'infectivité et de l'efficacité, ce test a consisté à déterminer également l'effet des souches sur la vitalité des plantes, la couleur et la longueur des feuilles et racines ainsi que les biomasses.

La biomasse sèche quant à elle, a permis d'évaluer l'efficacité symbiotique selon deux méthodes :

- ✓ L'efficacité relative (ER) a été calculée en comparant le poids sec (PS) des parties aériennes des plantes de chaque plante traitement par rapport au PS des parties aériennes du contrôle azoté (Témoin +) selon Chibeba *et al.* (2018).

$$(ER \%) = (x/y)*100 \quad (1)$$

x = la moyenne des poids secs des parties aériennes des plantes inoculées de chaque traitement

y = la moyenne des poids secs des parties aériennes du contrôle positif

- ✓ L'index relatif (IR) calculé en comparant le poids sec (PS) des parties aériennes des plantes de chaque traitement par rapport au PS des parties aériennes du contrôle négatif non inoculé (Témoin -) (Cheriet, 2016).

$$IR = a/b \quad (2)$$

a = la moyenne des poids secs des parties aériennes des plantes inoculées de chaque traitement

b = la moyenne des poids secs des parties aériennes du contrôle positif

Les termes fixateurs inefficaces (IE ; $ER < 50 \%$), moyennement efficace (ME ; $50 \% \leq ER \leq 80 \%$) et hautement efficace (HE ; $ER \geq 80 \%$) ont été adoptés pour qualifier l'efficacité symbiotique selon les proportions.

Ce test a été réalisé dans les mêmes conditions que le test d'authentification et les plantes ont été déterrés au même stade végétatif (35 jours après inoculation) afin que les performances symbiotiques puissent être comparables.

3.3.2- Evaluation *in vitro* de l'impact des facteurs abiotiques sur la croissance des bactéries associées au pois bambara

La viabilité des bactéries isolées des nodules du pois bambara a été évaluée à la fois sur milieux solides et liquides en présence de différentes concentrations de NaCl et à différents pH puis sur uniquement milieu solide à différentes températures et en présence de deux doses de différents

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

engrais et pesticides. Chaque souche a été testée en trois répétitions sur le milieu YEM et incubé pendant 72 h.

3.3.2.1- Effet de la salinité

Ce test de tolérance a été réalisé sur du YEM sans NaCl à pH = 6,8 et incubé à 28 °C.

Le sel a été ajouté dans le milieu avant autoclavage à des concentrations de 0,1 (témoin) ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 et 11 %.

Pour le test en milieu solide, les boîtes de Pétri ont été subdivisées en sections et chaque section a étéensemencée par spot avec 10 µL de chaque suspension bactérienne contenant environ 10^9 cellules mL⁻¹. La croissance des souches a été estimée par rapport à celle du traitement témoin comme suit: - pas de croissance; +, faible croissance (10-30% par rapport au témoin); 2+, croissance moyenne (30-80% par rapport au témoin); 3+, bonne croissance (similaire au témoin) (Djedidi *et al.*, 2011)

Pour le test en milieu liquide, chaque pré-culture fraîche en phase exponentielle de croissance, avec une densité optique DO de départ de 0,05 a été inoculée dans 5 ml de YEM/tube additionné de l'une des concentrations de NaCl testées. La tolérance des souches bactériennes a été estimée en se basant sur la valeur de DO après 24 h, 48 h et 72 h de croissance, mesurée avec le lecteur de plaque BIOTEK Elx808 à une longueur d'onde de 630 nm. le test est considéré comme positif lorsque la DO atteinte est $\geq 0,5$ (Taha, 2018).

3.3.2.2- Effet du pH

Ce test de tolérance a été réalisé sur du YEM à 0,1 % de NaCl et incubé à 28 °C. Les valeurs du pH testées ont été fixées à pH = 3,5 ; pH = 4 ; pH = 5; pH = 6,8 (témoin) ; pH = 9 ; pH = 10 et pH = 11. Les valeurs du pH ont été ajustées avant autoclavage en utilisant les tampons tels que HOMOPIPES (pH = 4,5) à une concentration de 25 mM, MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] (pH = 5,5) à 40 mM et le Tris Base pour les pH alcalins à 25 Mm (Taha, 2018). Les tests ont été faits tels que décrits dans le test précédent (effet de la salinité).

3.3.2.3- Effet de la température

Ce test de tolérance a été réalisé uniquement sur du YEM solide à 0,1 % de NaCl et à pH = 6,8. Les températures d'incubation ont été 4,28 (témoin), 35, 40, 45 et 50 °C (Djedidi *et al.*, 2011). Le test a été réalisé tel que décrit pour le milieu solide de l'effet de la salinité.

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

3.3.2.4- Effet des facteurs engrais de synthèse et pesticides

Le test de sensibilité/tolérance des bactéries isolées des nodules du pois bambara et des souches *Rhizobium leguminosarum* L01, *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 et *Mesorhizobium* sp STM 183 utilisées comme références aux produits agrochimiques a été réalisé suivant le protocole de Khan *et al.* (2006) modifié par Konaté *et al.* (2015).

La dose recommandée et la moitié de la dose recommandée de chaque produit ont été ajoutées aseptiquement et séparément aux différents milieux YEM gélosés stériles et refroidis à 60 °C. Après solidification, les milieux gélosés ont été subdivisés en sections et chaque section a étéensemencée par spot avec 10 µL de préculture fraîche (10⁹ bactéries/mL) de chaque souche. Les cultures ont été incubées à 28 °C pendant 72 heures.

L'ensemble des produits agrochimiques testés ainsi que leurs concentrations utilisées sont consignés dans le tableau IV.

Tableau IV : Caractéristiques des produits agrochimiques utilisés

Produits	Nom commercial	Formulation ou matière active	Dose recommandée	½ de la dose recommandée	
Engrais	Fertileg	NPK 10.8.10 +Mgo + B, C, Fe, Mo, Z et Mn	10 µL/mL	5 µL/mL	
	Nutrigofol	NPK 8.8.8 B, C, Fe, Mo, Z, Mn et Mg	10 µL/mL	5 µL/mL	
	Urée erlée (blanche)	46%N	0,3 %	0,15 %	
	Engrais LDC CI ou urée rouge	NPK 12.22.22 +2%SO3+1%MgO+5%Fe	0,41 %	0,205 %	
	Nitrate de potassium	KNO ₃	0,05 %	0,025 %	
	Nitrite de sodium	NaNO ₂	0,05 %	0,025 %	
Pesticides	herbicides	Roundup 360 SL	Glyphosate	27 µL/mL	13,5 µL/mL
		Herbo select 108 EC	Haloxypop-R methyl	3,4 µL/mL	1,7 µL/mL
	insecticides	K-optimal 250 EC	Lambda cyhalothrine + Acétamipride	27 µL/mL	13,5 µL/mL
		Cypercal 50 EC	Cyperméthrine	2,7 µL/mL	1,35 µL/mL
	fongicides	Antracol 70 WP	Propinèbe	6,7.10 ⁻³ g/mL	3,35.10 ⁻³ g/mL
		Ivory 80 WP	Mancozèbe	5.10 ⁻³ g/mL	2,5.10 ⁻³ g/mL

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

3.3.3- Evaluation *in vitro* des activités promotrices de croissance des plantes

3.3.3.1- Production d'acide indol-acétique (AIA)

La production d'auxine sous forme d'acide indol-acétique (AIA) par les souches bactériennes a été mise en évidence sur le milieu YEM additionné de 0,5 mg/mL de L-tryptophan. Les souches ont été précultivées sur YEM liquide et testée en trois répétitions.

- Détection de la production d'auxine

Pour détecter la production de l'AIA, le test qualitatif a été réalisé sur milieu YEM solide additionné de 0,5 mg/ml de L-tryptophan. Les boîtes de pétri ont été subdivisées en section et chaque section a été ensemencée par spot avec 10 µL des pré-cultures fraîches en phase exponentielle de croissance. Après incubation à 28 °C pendant 3 jours, des rondelles de papier filtre stériles imprégnées de réactif de Salkowski (Ehman, 1977) décrit en Annexe 5, ont été déposées sur les colonies bactériennes dans les boîtes de Pétri. Une coloration rose-rougeâtre des colonies après 30 à 60 min à l'obscurité indique la production de l'AIA.

- Evaluation de la quantité d'auxine produite

Pour évaluer la quantité d'AIA produite par chaque souche, le test qualitatif décrit par Sarwar et *al.* (1992) a été utilisé. Des tubes contenant 5 mL de YEM liquide additionné de 0,5 mg/mL de L-tryptophan ont été inoculés par 50 µL de pré-cultures fraîche en phase exponentielle de croissance avec une DO de départ de 0,05. Après 72 h de croissance à 28 °C et sous agitation (180 tours/min), les cultures ont été centrifugées à 9000 rpm pendant 10 min et les surnageants récupérés (2 mL) ont été filtrés à l'aide de filtres millipores de 0,22 µm. Dans des cuves à spectrophotomètre, 200 µL du filtrat ont été additionné à 800 µl du réactif de Salkowski (Ehman, 1977), suivi par une incubation dans l'obscurité pendant 30 à 60 min. Ensuite, la DO a été mesurée à 540 nm.

Les concentrations d'auxine sont déterminées à l'aide d'une courbe étalon d'AIA (Gordon & Weber, 1951) réalisée à partir d'une série de solutions avec des concentrations d'auxine connues allant de 0 à 125 ppm (Annexe 6). La quantité d'AIA produite a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe standard :

$$[AIA] (\mu\text{g/mL}) = (y-0,16) / 0,004 \quad (3)$$

y = DO de l'échantillon

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

3.3.3.2- Solubilisation du phosphate

Les tests ont été réalisés sur le milieu Pikovskaya (Annexe 7) et chaque souche a été testée en trois répétitions.

- Détection de la solubilisation du phosphate

Le test qualitatif de solubilisation du phosphate a été fait sur Pikovskaya (PVK) solide contenant du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3 [\text{PO}_4]_2$) additionnée de bleu de bromophénol (Vyas *et al.*, 2007). Les boîtes de Pétri ont été subdivisées en section et chaque section a étéensemencée avec 10 μL des pré-cultures fraîches en phase exponentielle de croissance. Toutes les cultures ont été incubées à 28 °C pendant trois (3) jours et la présence d'un halo clair autour des colonies indique la solubilisation du phosphate.

- Evaluation de la quantité du phosphate solubilisé

La quantité du phosphate inorganique a été déterminée selon la méthode de Pikovskaya (1948). Des pré-cultures ont été préparées, ensuite utilisées pour ensemenecer des fioles contenant 100 ml de milieu PVK liquide additionné de 0,05 g de la roche phosphatée innée (phosphate naturel), avec une DO de départ de 0,05. Les fioles ont été incubées à 28 °C pendant 48 h sous agitation (180 tr/min). Après incubation, le pH de chaque échantillon a été mesuré puis la quantité du phosphate soluble libéré a été estimée après centrifugation (10 000 rpm pendant 10 min) selon la méthode colorimétrique à l'acide Vanadomolybdo-phosphorique. Ainsi, 1 mL de chaque échantillon a été additionné d'un 1 mL du réactif Vanadate-molybdate (Annexe 8), puis incubé pendant 1 h et finalement la DO mesurée à 405 nm. La quantité du phosphate libéré est déterminée à partir de courbe étalon qui représente la DO à 405 nm en fonction des concentrations connues de phosphate soluble (KH_2PO_4) (Annexe 9). La quantité du phosphore soluble total a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe standard :

$$[\text{P}] (\mu\text{g/mL}) = (y - 0,1175) / 0,0058 \quad (4)$$

y = DO de l'échantillon

3.3.3.3- Production de siderophores

La production de sidérophore a été testée sur le milieu Chrome Azurol S (milieu CAS) (Annexe 10) comme décrit par Schwyn & Neilands (1987). Les boîtes de Pétri subdivisées en sections

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

et chaque section a été ensemencée par spot avec 10 µL de précultures fraîches en phase exponentielle de croissance et incubées à 28 ° C pendant 72 h. La production de sidérophore a été détectée sur la base du changement de couleur du milieu de vert-bleu à orangé. La mesure des diamètres du halo et de la colonie de bactéries a permis d'établir un rapport pour chaque souche reflétant la quantité de sidérophores sécrétée (Jasim *et al.*, 2013).

$$\text{IPS} = \text{DH} / \text{DC} \quad (5)$$

IPS = indice de production de sidérophore; **DH** = diamètre du halo; **DC** = Diamètre de colonie

Chaque souche a été testée en trois répétitions. Toute la verrerie utilisée a été trempée pendant une nuit dans du HCl 6M et rincée à l'eau distillée plusieurs fois pour éliminer toute trace de fer.

3.4- Evaluation de l'efficacité agronomique des bactéries nodulaires du pois bambara

3.4.1- Dispositif expérimental

Ce test a été réalisé avec le cultivar Ci3 sous abri à la station expérimentale de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa dans des pots contenant du sable préalablement stérilisé tel que décrit lors du test d'authentification. Le facteur étudié est la source de l'azote sur le cultivar Ci3 et est constitué de 28 traitements dont 19 souches locales ayant montré des bons traits PCP, trois (03) souches de référence, cinq (05) formulations d'engrais chimiques (Fertileg, Nutrigofol, urée blanche, LDC CI, KNO₃) et d'un témoin négatif non fertilisé et non inoculé. Chaque traitement a été fait en six (06) répétitions soit six (06) pots par traitement et 168 pots pour l'ensemble.

3.4.2- Préparation des solutions mères d'engrais

Les solutions mères des engrais ont été préparées de manière suivante :

- pour les engrais solides tels que l'urée blanche et le LDC CI, une cuillerée à soupe a été mise dans 5 L d'eau distillée stérile pour chaque engrais. La solution d'engrais est homogénéisée puis conservée au laboratoire.
- pour les engrais liquides tels que fertileg et Nutrigofol qui sont des engrais foliaires, 50 mL de la solution d'engrais sont ajoutés à 5 L d'eau distillée stérile. La solution d'engrais est homogénéisée puis conservée.

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

- pour le nitrate de potassium (KNO_3), 2,5 g du produit ont été mis dans 5 L de solution nutritive. La solution d'engrais est homogénéisée puis conservée au laboratoire

3.4.3- Semis des graines et traitement des plantules

Avant les semis, les graines du cultivar Ci3 du pois bambara préalablement désinfectées à l'éthanol et l'hypochlorite de sodium, ont été pré-germées dans de l'eau gélifiée. Trois (03) graines pré-germées ont été transférées dans les pots contenant du sable stérile. Sept (07) jours après semis, les plantules ont été traitées chacune excepté le témoin négatif. Certaines ont été inoculées avec des souches bactériennes tel que décrit lors de l'étude de la caractérisation symbiotique tandis que d'autres ont été fertilisées avec des engrais chimiques de la manière suivante :

- pour les engrais solides (urée blanche et LDC CI), 1,2 mL de la solution correspondante, ont été apportés autour des plantules une fois par semaine suivi d'un arrosage à l'eau distillée ;
- pour les engrais liquides (fertileg et Nutrigofol) 1,2 mL de la solution préparée ont été versés sur les feuilles des plantules une fois par semaine suivi d'un arrosage à l'eau distillée ;
- le nitrate de potassium (KNO_3) qui est le témoin azoté, est apporté aux plantules 2 fois par semaines tel que décrit dans la caractérisation symbiotique.

Les plantes ont été arrosées deux (2) fois dans la semaine en alternance avec la solution nutritive de Broughton & Dilworth et de l'eau distillée.

3.4.4- Evaluation de l'effet des souches autochtones, des souches de références et des engrais de synthèse sur les paramètres de croissance et de rendement des plantes

Les différents paramètres liés à la croissance de la plante ont été évalués en début de floraison. Trois pots par traitement soit 84 pots ont été sacrifiés et les plantes ont été dépotées et délicatement lavées. La hauteur de la plante (du collet à l'apex), la largeur et la longueur des folioles et le nombre de feuilles sont déterminés. Les mesures réalisées sur les folioles ont été utilisées pour évaluer la surface foliaire suivant la formule de Nguy-Ntamag (1995) :

$$Sf = 0,71x Lx l+ 0,23 \quad (6)$$

Sf (cm^2) : la surface foliaire ; **L** (cm) : la longueur moyenne des 3 folioles ; **l** (cm) : la largeur moyenne des trois folioles.

Ensuite les parties aériennes et racinaires de chaque plante ont été étiquetées et séchées à $70^\circ C$ pendant 72 h puis les poids secs ont été mesurés.

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

L'indice d'efficacité de l'inoculation de chaque souche (E) est calculé selon la formule décrite par Ferreira & Marques (1992).

$$E (\%) = (I - C / N - C) \times 100 \quad (7)$$

I : Poids sec des plantes inoculées par les souches, **C** : Poids sec des plantes témoins non inoculées et non azotées, **N** : Poids sec des plantes fertilisées à l'azote (KNO_3).

Les termes inefficace (IE ; $E < 25 \%$), moyennement efficace (ME ; $25 \% \leq E \leq 74 \%$) et hautement efficace (HE ; $E \geq 75 \%$) ont été adoptés pour qualifier l'efficacité selon les proportions.

Cette formule a été utilisée pour déterminer également l'efficacité de la fertilisation où **I** représente le poids sec des plantes fertilisées par les engrais autres que le KNO_3 .

Les plantes des 84 pots restants ont été dépotées 105 jours après semis. Les gousses ont été comptées, pesées puis étiquetées et séchées à $70^\circ C$ pendant 72 h. Par la suite, les poids secs ont été déterminés.

3.5- Analyses statistiques des données

Toutes les données ont été saisies sous le tableur Excel qui a permis de réaliser les diagrammes. La comparaison des moyennes des données collectées sur le pois bambara a été faite par une analyse de la variance (ANOVA) au seuil de probabilité 5 %. Lorsqu'une différence significative est notée entre les traitements pour un caractère donné, le test de Student-Newman-Keuls est réalisé au seuil de 5 %. Toutes ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel R version 3.5.1 software (R Core Team, 2018).

Troisième partie :
RESULTATS ET DISCUSSION

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1 : CONSTITUTION D'UNE COLLECTION DE SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES DES NODULES DU POIS BAMBARA

1.1- Bactéries nodulaires et natives du pois bambara piégées dans les différents sols

Il y a une variabilité dans les réponses des plantes des cinq (5) cultivars sur les différents sols testés (Tableau V). En effet, tous les sols ont pu induire la formation de nodules avec les cultivars du pois bambara. Cependant, le nombre de nodules a été différent d'un sol à un autre pour le même cultivar et d'un cultivar à un autre pour le même sol (Figure 11).

L'analyse de la variance a révélé que le nombre de nodules formés sur les racines des plantes a varié significativement ($P < 5\%$) en fonction du cultivar et du sol.

Sur le sol de Bribouo, le nombre de nodules/plante a été plus élevé (188) avec le cultivar Ci3 et moins élevé (48) avec le cultivar Ci1.

Sur le sol de Toroguhé, le nombre de nodules/plante a été plus élevé (200 et 191) respectivement avec les cultivars Ci6 et Ci3 et moins élevé (94) avec le cultivar Ci1.

En ce qui concerne le sol de Zakoua, le cultivar Ci3 a montré plus de nodules (155) sur son système racinaire et le cultivar Ci2 a montré moins de nodules (48).

Concernant le sol de Zepreguhé, les cultivars Ci3 et Ci1 ont présenté un nombre considérable de nodules respectivement 262 et 109. En revanche, les trois (03) autres cultivars ont obtenu un nombre de nodule inférieur à 20.

Enfin sur le sol de l'UJLoG, le nombre de nodules/plante a été plus élevé (76) avec le cultivar Ci3 et moins élevé (02) avec le cultivar Ci5.

Dans l'ensemble, le cultivar Ci3 a été le plus compatible avec les rhizobia indigènes sur les échantillons de sols par rapport aux quatre (4) cultivars. Par ailleurs, le sol de l'UJLoG a été moins riche en rhizobia nodulant le pois bambara et le sol de Toroguhé a été plus riche en rhizobia nodulant le pois bambara.

Le sol et le cultivar du pois bambara ont influencé la formation de nodules sur les systèmes racinaires des plantes.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau V : Nombre de nodules en fonction des cultivars de pois bambara et des sols échantillonnés

Cultivars	Sols échantillonnés										Total
	Bribouo		Toroguhé		Zakoua		Zepreguhé		UJLoG		
	NN	SD	NN	SD	NN	SD	NN	SD	NN	SD	
Ci1	48 ± 5 d		94 ± 3 d		92 ± 7 c		109 ± 10 b		41 ± 5 b		384
Ci2	167 ± 11 b		107 ± 6 c		48 ± 4 e		7 ± 2 d		9 ± 2 d		338
Ci3	188 ± 9 a		191 ± 10 a		155 ± 6 a		262 ± 17 a		76 ± 9 a		872
Ci5	78 ± 3 c		133 ± 8 b		75 ± 2 d		17 ± 4 c		2 ± 1 e		305
Ci6	75 ± 5 c		200 ± 15 a		110 ± 8 b		9 ± 3 cd		29 ± 4 c		309
Total	556		725		480		404		157		

Dans chaque colonne les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ (test de Newman-Keuls). NN : Nombre de nodule ; SD : Ecart type



Figure 11: Nodules du cultivar Ci3 du pois bambara en fonction des sols échantillonnés

(U) : Université Jean Lorougnon Guédé, (T) : Toroguhé, (B) : Bribouo, (ZG) : Zepreguhé, (ZK) : Zakoua

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

1.2- Caractéristiques morphologiques et biochimiques des isolats bactériens

L'isolement des bactéries à partir des nodules des différents cultivars de pois bambara a permis d'obtenir sur milieu YEM plusieurs colonies après deux (02) à sept (07) jours d'incubation à 28 °C. Cependant, aucune colonie n'a été observée sur les milieux témoins ensemencés avec l'eau du dernier rinçage.

Le repiquage et la striation en surface des colonies ont permis la pré-sélection de cent-vingt-deux (122) isolats. Ces isolats ont été codifiés par les initiales de la localité de provenance des échantillons de sol suivis du code de la variété et d'un numéro d'ordre de sélection.

Les Figure 12 et Tableau VI, VII, VIII, IX, X montrent les différentes morphologies des colonies purifiées. L'observation macroscopique des colonies de ces isolats présélectionnés sur les boîtes de Pétri a révélé qu'elles sont majoritairement de formes sphériques ou rondes. Elles sont translucides, transparentes ou opaques avec un pourtour régulier, filamenteux ou dentelé et de couleurs variables (blanche, crème, jaune, orange ou rose). Les colonies ont un aspect généralement lisse, une élévation majoritairement plate ou bombée avec un diamètre compris entre 1 et 8 mm (Tableau VI, VII, VIII, IX, X).

L'observation microscopique des bactéries a montré qu'elles sont en majorité à Gram négatif (93,5 %), des bacilles (79 %) mais aussi quelques cocci (21 %) avec un mode de regroupement varié (Figure 13) (Tableau VI, VII, VIII, IX, X).

Les études macroscopique et microscopique des isolats ont permis la sélection de soixante (60) isolats codés RVC (Annexe 11). Cette sélection s'est faite sur la base de la diversité morphologique présentée par les colonies afin de constituer une collection hétérogène de bactéries autochtones associées au pois bambara.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION



Figure 12 : Aspect macroscopique des isolats sur milieu YEMA+ RC

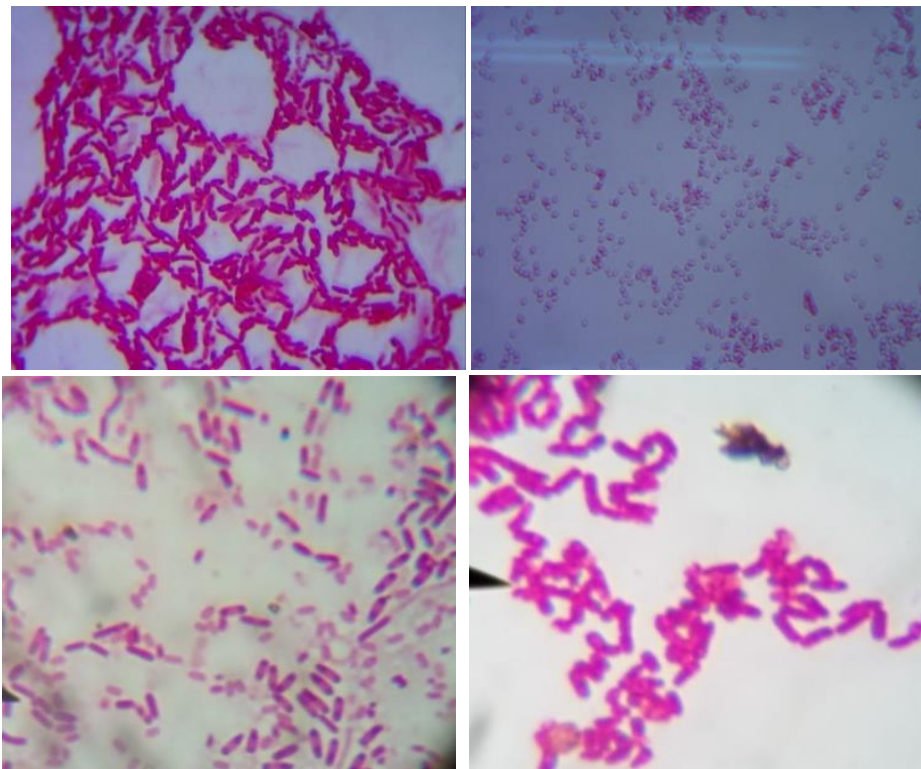


Figure 13 : Aspect microscopique des isolats après coloration de Gram (G×100) au microscope électronique

Tableau VI: Caractères morphologiques et biochimiques des bactéries associées au pois bambara piégées sur le sol de Bribouo

Aspects macroscopiques des isolats								Aspects microscopiques des isolats		
Codes	Forme	Chromogène	Pourtour	Elévation	Diamètre (mm)	Opacité	Aspect	Gram	Forme	Mode de regpmt
BCI 1.1	Circulaire	Crème	Dentelé	Plat	2 à 4	Translucide	Rugueux	+	Bacille	chaîne
BCI 1.2	Point	Orange	Régulier	Convexe	2 à 3	Translucide	Lisse	-	Bacille	isolé
BCI 1.3	Point	Jaune	Régulier	Plat	<1	Translucide	Lisse	-	Cocci	chaîne
BCI 1.4	Circulaire	Orange	Régulier	Plat	1 à 3	Translucide	Lisse	-	Cocci	chaînette
BCI 2.1	Circulaire	Rouge-orangé	Régulier	Plat	2 à 4	Opaque	Lisse	-	Bacille	diplo
BCI 2.2	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	≤4	Translucide	Lisse	-	Bacille	ND
BCI 2.3	Circulaire	Crème	Régulier	Surélevé	1 à 4	Opaque	Lisse	-	Cocci	chaînette
BCI 2.4	Point	Jaune	Régulier	Plat	<1	Translucide	Lisse	+	Cocci	chaîne
BCI 2.5	Circulaire	Rose-pâle	Régulier	Bombé	2 à 3	Opaque	Lisse	-	Cocci	amas
BCI 2.6	Point	Crème	Régulier	Plat	<1	Opaque	Lisse	-	Cocci	diplo
BCI 3.1	Circulaire	Rose-claire	Régulier	Bombé	1 à 3	Translucide	Lisse	-	Bacille	amas
BCI 3.2	Point	Belge	Régulier	Plat	<1	Translucide	Lisse	-	Cocci	isolé
BCI 3.3	Point	Crème	Régulier	Convexe	≤1	Translucide	Lisse	-	Bacille	isolé
BCI 3.4	Point	Jaune	Régulier	Plat	≤2	Translucide	Lisse	-	Bacille	diplo
BCI 3.5	Point	Crème	Régulier	Plat	<2	Opaque	Lisse	-	Cocci	amas
BCI 3.6	Point	Crème	Régulier	Plat	<1	Transparent	Lisse	-	Bacille	chaîne
BCI 5.1	Circulaire	Rose-pâle	Régulier	Plat	2 à 3	Opaque	Lisse	-	Cocci	ND
BCI 5.2	Point	Crème	Régulier	Plat	<2	Translucide	Lisse	-	Cocci	amas
BCI 5.3	Point	Crème	Régulier	Plat	≤2	Translucide	Lisse	-	Cocci	diplo
BCI 5.4	Point	Crème	Régulier	Plat	<2	Transparent	Lisse	-	Bacille	isolé
BCI 5.5	Circulaire	Rose-pâle	Régulier	Surélevé	1 à 2	Opaque	Lisse	-	Bacille	chaînette
BCI 5.6	Point	Rose	Régulier	Plat	≤2	Translucide	Lisse	-	Bacille	diplo
BCI 5.7	Circulaire	Crème	Régulier	Surélevé	1 à 3	Opaque	Lisse	-	Bacille	amas

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau VII: Caractères morphologiques et biochimiques des bactéries associées au pois bambara piégées sur le sol de Toroguhé

Aspects macroscopiques des isolats								Aspects microscopiques des isolats		
Codes	Forme	Chromogène	Pourtour	Élévation	Diamètre (mm)	Opacité	Aspect	Gram	Forme	Mode de regpmt
TCI 1.1	Circulaire	Rose-claire	Régulier	Convexe	1 à 4	Opaque	Lisse	-	Bacille	chaînette
TCI 1.2	Circulaire	Crème	Régulier	Convexe	1 à 3	Opaque	Lisse	-	Bacille	chaîne
TCI 1.3	Circulaire	Rose	Régulier	Surélevé	1 à 3	Translucide	Filamenteux	-	Cocci	tétrade
TCI 1.4	Circulaire	Crème	Régulier	Bombé	1 à 5	Translucide	Lisse	-	Bacille	amas
TCI 1.5	Circulaire	Crème	Régulier	Surélevé	1 à 2	Translucide	Lisse	-	Bacille	isolé
TCI 1.6	Circulaire	Crème	Régulier	Surélevé	2 à 4	Translucide	Lisse	-	bacille	diplo
TCI 1.7	Circulaire	Crème	Régulier	Bombé	≤2	Translucide	Lisse	-	Cocci	chaîne
TCI 1.8	Point	Crème	Régulier	Plat	<2	Translucide	Lisse	-	bacille	diplo
TCI 1.9	Point	Crème	Régulier	Plat	≤2	Opaque	Lisse	+	bacille	chaînette
TCI 1.10	Circulaire	Crème	Régulier	Convexe	1 à 6	Opaque	Lisse	-	bacille	isolé
TCI 1.11	Circulaire	Crème	Régulier	Surélevé	1 à 5	Translucide	Lisse	-	bacille	diplo
TCI 1.12	Circulaire	Crème	Régulier	Bombé	2 à 3	Opaque	Lisse	-	bacille	diplo
TCI 1.13	Point	Crème	Régulier	Plat	≤2	Translucide	Lisse	-	Cocci	amas
TCI 2.1	Circulaire	Rose	Régulier	Convexe	≤5	Opaque	Lisse	-	bacille	diplo
TCI 2.2	Circulaire	Crème	Régulier	Bombé	1 à 3	Opaque	Lisse	-	bacille	diplo
TCI 2.4	Point	Crème	Régulier	Plat	<1	Opaque	Lisse	+	Cocci	tétrade
TCI 3.1	Point	Rose-pâle	Régulier	Plat	≤2	Transparent	Lisse	-	bacille	isolé
TCI 3.2	Point	Blanchâtre	Régulier	Plat	≤1	Translucide	Lisse	-	bacille	isolé
TCI 3.3	Point	Orange	Régulier	Plat	≤2	Translucide	Lisse	-	bacille	chaîne
TCI 3.4	Point	Rose	Régulier	Plat	<2	Opaque	Lisse	-	bacille	isolé
TCI 3.5	Point	Crème	Régulier	Plat	≤1	Translucide	Lisse	-	Cocci	diplo
TCI 3.6	Point	Orange	Régulier	Plat	<1	Opaque	Lisse	-	Cocci	amas
TCI 3.7	Circulaire	Crème	Dentelé	Plat	≤1	Translucide	Rugueux	-	bacille	chaînette
TCI 3.8	Circulaire	Rose	Filamenteux	Plat	<2	Opaque	Envahissant	-	bacille	diplo
TCI 3.9	Punctiforme	Orangé	Dentelé	Plat	<2	Translucide	Envahissant	-	bacille	chaînette

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

TCI 3.10	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	1 à 4	Translucide	Lisse	-	bacille	isolé
TCI 3.11	Point	Orange	Régulier	Plat	≤1	Translucide	Lisse	-	bacille	amas
TCI 5.1	Point	Orangé	Régulier	Plat	<2	Translucide	Lisse	+	Cocci	Amas
TCI 5.2	Circulaire	Crème	Régulier	Convexe	1 à 2	Opaque	Lisse	-	bacille	Diplo
TCI 5.3	Point	Crème	Régulier	Surélevé	≤1	Translucide	Lisse	-	bacille	Amas
TCI 5.4	Circulaire	Crème	Régulier	Convexe	1 à 2	Opaque	Lisse	-	bacille	Diplo
TCI 5.6	Point	Crème	Régulier	Plat	≤1	Translucide	Lisse	+	bacille	Amas
TCI 5.7	Point	Orange	Régulier	Surélevé	≤2	Translucide	Lisse	-	bacille	Isolé
TCI 5.8	Point	Crème	Régulier	Surélevé	<2	Translucide	Lisse	-	bacille	amas
TCI 5.9	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	1 à 2	Opaque	Lisse	-	bacille	isolé
TCI 5.10	Point	Orangé	Régulier	Plat	≤ 2	Translucide	Lisse	-	Cocci	amas
TCI 6.1	Circulaire	Rose-claire	Régulier	Bombé	2 à 3	Opaque	Lisse	-	bacille	diplo
TCI 6.2	Circulaire	Crème	Régulier	Surélevé	1 à 2	Translucide	Lisse	-	bacille	chaînette

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau VIII: Caractères morphologiques et biochimiques des bactéries associées au pois bambara piégées sur le sol de l'UJLoG

Aspects macroscopiques des isolats								Aspects microscopiques des isolats		
Codes	Forme	Chromogène	Pourtour	Élévation	Diamètre (mm)	Opacité	Aspect	Gram	Forme	Mode de regpmt
UCI 2.1	Circulaire	Orange	Régulier	Convexe	1 à 3	Translucide	Lisse	-	bacille	diplo
UCI 2.2	Circulaire	Jaune	Régulier	Surélevé	1 à 3	Translucide	Lisse	-	Cocci	tétrade
UCI 3.1	Point	Rose-pâle	Régulier	Plat	≤2	Opaque	Lisse	-	Cocci	isolé
UCI 3.2	Point	Rose-claire	Régulier	Plat	<1	Transparent	Lisse	-	bacille	isolé
UCI6.1	Circulaire	Rose-pâle	Régulier	Plat	3 à 5	Translucide	Lisse	-	bacille	chaînette
UCI 6.2	Circulaire	Rose-pâle	Régulier	Plat	2 à 8	Opaque	Lisse	-	bacille	amas
UCI 6.3	Point	Crème	Régulier	Plat	<2	Translucide	Lisse	-	Cocci	isolé
UCI 6.4	Point	Crème	Régulier	Plat	1 à 2	Translucide	Lisse	-	Cocci	isolé
UCI 6.5	Point	Orangé	Régulier	Plat	<2	Translucide	Lisse	-	bacille	ND
RVC 8.1	Circulaire	Rose	Régulier	Plat	1 à 3	Opaque	Lisse	+	Cocci	amas
RVC 8.2	Circulaire	Rose	Régulier	Plat	1 à 2	Opaque	Lisse	-	Bacille	isolé
RVC8.3	Circulaire	Crème	Régulier	Bombé	3 à 6	Translucide	Lisse	-	Bacille	isolé
RCV14	Circulaire	Rose-pâle	Régulier	Plat	1 à 5	Opaque	Lisse	-	Bacille	amas
RVC13.1	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	1 à 2	Translucide	Lisse	+	Bacille	tétrade
RVC13.2	Circulaire	Rose-pâle	Régulier	Surélevé	2 à 5	Opaque	Lisse	-	Bacille	isolé

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau IX: Caractères morphologiques et biochimiques des bactéries associées au pois bambara piégées sur le sol de Zépréguhé

Aspects macroscopiques des isolats								Aspects microscopiques des isolats		
Codes	Forme	Chromogène	Pourtour	Elévation	Diamètre (mm)	Opacité	Aspect	Gram	Forme	Mode de regpmt
Z ₆ CI1.1	Point	Crème	Régulier	Plat	<1	Transparent	Lisse	-	Bacille	isolé
Z ₆ CI1.2	Circulaire	Orangé	Régulier	Surélevé	1 à 3	Opaque	Lisse	-	Bacille	diplo
Z ₆ CI1.3	Point	Orangé	Régulier	Plat	≤1	Opaque	Lisse	-	Cocci	tetrade
Z ₆ CI1.4	Circulaire	Rose-pâle	Régulier	Bombé	2 à 4	Opaque	Lisse	-	Bacille	Chaînette
Z ₆ CI2.1	Circulaire	Crème	Régulier	Surélevé	1 à 2	Translucide	Lisse	-	Bacille	Amas
Z ₆ CI3.1	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	2 à 3	Transparent	Lisse	-	Bacille	Diplo
Z ₆ CI3.2	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	2 à 6	Opaque	Lisse	-	Bacille	Diplo
Z ₆ CI3.3	Circulaire	Orangé	Régulier	Convexe	2 à 7	Opaque	Lisse	-	Bacille	ND
Z ₆ CI3.4	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	<5	Transparent	Lisse	-	Bacille	Diplo
Z ₆ CI3.6	Circulaire	Crème	Régulier	Bombé	2 à 3	Transparent	Lisse	-	Bacille	Isolé
Z ₆ CI3.7	Circulaire	Crème	Régulier	Bombé	1 à 6	Translucide	Lisse	-	Bacille	Chaînette
Z ₆ CI3.8	Circulaire	Rose-pâle	Régulier	Bombé	2 à 3	Opaque	Lisse	-	Bacille	Tétrade
ZGCI3.9	Circulaire	Crème	Régulier	Convexe	2 à 3	Opaque	Lisse	-	Bacille	Diplo
Z ₆ CI3.10	Circulaire	Crème	Régulier	Bombé	≤11	Opaque	Lisse	-	Bacille	Diplo
Z ₆ CI5.1	Fuselé	Rose-pâle	Crénelé	Plat	2 à 4	Opaque	Filamenteux	-	Bacille	Isolé
Z ₆ CI5.3	Point	Crème	Régulier	Plat	<1	Translucide	Lisse	-	Bacille	ND
Z ₆ CI6.1	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	1 à 3	Translucide	Lisse	-	Cocci	Isolé
Z ₆ CI6.2	Circulaire	Crème	Régulier	Surélevé	<3	Translucide	Lisse	-	Bacille	Diplo
Z ₆ CI6.3	Circulaire	Orange	Régulier	Plat	<3	Translucide	Lisse	-	Bacille	Amas
Z ₆ CI6.4	Point	Crème	Régulier	Plat	≤1	Translucide	Lisse	-	Bacille	Isolé
Z ₆ CI6.5	Circulaire	Rose-pâle	Régulier	Surélevé	2 à 4	Opaque	Filamenteux	-	Cocci	Tetrade

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau X: Caractères morphologiques et biochimiques des bactéries associées au pois bambara piégées sur le sol de Zakoua

Aspects macroscopiques des isolats								Aspects microscopiques des isolats		
Codes	Forme	Chromogène	Pourtour	Elévation	Diamètre (mm)	Opacité	Aspect	Gram	Forme	Mode de regpmt
Z _k CI1.1	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	1 à 2	Translucide	Lisse	-	Bacille	isolé
Z _k CI1.2	Point	Orange	Régulier	Surélevé	≤2	Translucide	Lisse	-	Bacille	amas
Z _k CI1.3	Point	Crème	Régulier	Plat	<2	Translucide	Lisse	-	Bacille	amas
Z _k CI1.4	Circulaire	Rose	Régulier	Surélevé	1 à 2	Translucide	Lisse	-	Cocci	diplo
Z _k CI1.5	Point	Crème	Régulier	Plat	≤2	Translucide	Lisse	-	Bacille	amas
Z _k CI1.6	Circulaire	Crème	Régulier	Surélevé	1 à 4	Opaque	Lisse	-	Bacille	diplo
Z _k CI1.7	Circulaire	Crème	Régulier	Surélevé	1 à 3	Opaque	Lisse	-	Bacille	isolé
Z _k CI1.9	Point	Crème	Régulier	Plat	≤ 2	Translucide	Lisse	-	Bacille	diplo
Z _k CI2.1	Circulaire	Rose-claire	Régulier	Plat	1 à 2	Opaque	Lisse	-	Bacille	isolé
Z _k CI2.2	Circulaire	Rose-pâle	Régulier	Bombé	2 à 4	Opaque	Lisse	-	Bacille	isolé
Z _k CI2.3	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	≤2	Opaque	Lisse	-	Bacille	diplo
Z _k CI2.4	Point	Rose-pâle	Régulier	Plat	≤1	Opaque	Lisse	-	Cocci	amas
ZKCI2.5	Point	Crème	Crénelé	Plat	≤ 2	Opaque	Lisse	-	Bacille	amas
Z _k CI3.1	Point	Jaune	Régulier	Plat	≤ 2	Translucide	Lisse	-	Bacille	diplo
Z _k CI3.2	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	2 à 4	Opaque	Lisse	-	Bacille	amas
Z _k CI3.3	Point	Orange	Régulier	Plat	<2	Opaque	Lisse	+	Cocci	ND
Z _k CI3.4	Point	Orange	Régulier	Plat	<1	Opaque	Lisse	-	Bacille	amas
Z _k CI3.5	Point	Crème	Régulier	Plat	<1	Translucide	Lisse	-	Bacille	diplo
Z _k CI5.1	Circulaire	Crème	Régulier	Convexe	1 à 4	Translucide	Lisse	-	Bacille	isolé
Z _k CI5.2	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	<2	Translucide	Lisse	+	Bacille	chaînette
Z _k CI5.3	Circulaire	Crème	Régulier	Bombé	4 à 5	Opaque	Lisse	+	Bacille	tétrade
Z _k CI5.4	Circulaire	Crème	Régulier	Plat	1 à 2	Translucide	Lisse	-	Bacille	isolé
Z _k CI5.5	Point	Crème	Régulier	Plat	<1	Opaque	Lisse	-	Cocci	chaînette

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Z_kCI5.6	Point	Crème	Régulier	Plat	≤ 1	Translucide	Lisse		+	Bacille	tétrade
Z_kCI6.1	Point	Crème	Régulier	Plat	≤2	Translucide	Lisse		-	Bacille	ND

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

1.3- Discussion

Le test de piégeage des rhizobactéries a été réalisé sur des sols de différentes localités, suivi de la vérification de la diversité morphologique des bactéries abritées dans les nodules de pois bambara afin de constituer une collection hétérogène de bactéries indigènes associées au pois bambara.

Il y a une variabilité dans les réponses des plantes des cinq cultivars sur les différents sols testés. En effet, les nombre de nodules ont différencié d'un sol à un autre pour un même cultivar et d'un cultivar à un autre sur un même sol. Dans l'ensemble, le cultivar Ci3 a été le plus compatible avec les rhizobia indigènes sur les échantillons de sols. Par ailleurs, le sol de l'UJLoG a été moins riche en rhizobia nodulant le pois bambara. Le sol et le cultivar du pois bambara ont influencé la formation de nodules sur les systèmes racinaires des plantes.

La différence dans la nodulation observée chez un cultivar sur différents sols pourrait s'expliquer d'abord par la densité de la communauté bactérienne en général et de la communauté rhizobienne en particulier vivant dans les différents sols. En effet, plus le sol est riche en rhizobia, plus ces derniers pourront entrer en symbiose avec les plantes pour former les nodules. De plus, ce fait pourrait s'expliquer par la compatibilité des rhizobia vivant dans le sol vis-à-vis des plantes du cultivar. En effet, plus il y a compatibilité entre rhizobia-plante, plus il pourra avoir symbiose et par la suite formation de nodules.

La différence dans la nodulation observée chez différents cultivars sur un même sol pourrait s'expliquer par la botanique, la physiologie et la génétique de chaque cultivar. En effet, Pazdernik *et al.* (1997) ont attribué cette variation de la nodulation aux facteurs génétiques entre la plante et le symbionte. D'autres chercheurs ont attribué cette spécificité à l'interaction entre le gène Sym2 de la plante et le gène nodX de l'espèce rhizobiale (Smith & Goodman, 1999 ; Gunnabo *et al.*, 2019)

Les études macroscopique et microscopique de ces isolats présélectionnés ont montré que quelques-uns ont présenté les caractéristiques morphologiques connues des rhizobia déjà évoquées par Dommergues & Mangenot (1970). En effet, ils ont formé sur milieu YEM solide des colonies blanchâtres à crèmes, opaques ou d'aspects marbrés dont la mucosité variait selon les isolats. L'observation microscopique de ces derniers a montré qu'ils sont de forme coccobacille ou en bâtonnet à Gram négatif. Cependant, la majorité des isolats des nodules de pois bambara a présenté des caractères morphologiques diversifiés et variés. Ces caractères différaient de ceux des rhizobia. De plus, aucune colonie n'a été observée sur les milieux

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

témoins ensemencés par l'eau du dernier rinçage. Ceci voudrait dire que ces bactéries proviennent uniquement des nodules. Aussi, pourrait-il exister des bactéries autres que les rhizobia dans les nodules de pois bambara. En effet, il a été rapporté par Peix *et al.* (2015) qu'à côté des bactéries nodulantes, les nodules de légumineuses abritent d'autres bactéries non nodulantes appelées endophytes. Ainsi, Sturz *et al.*, (1997) avaient récupéré simultanément $4,3.10^9$ UFC de rhizobiums et 3.10^5 UFC d'endophytes non rhizobiaux de 12 genres bactériens par gramme de poids frais de tissu de nodules de trèfle rouge. Des preuves ont également été rapportées que des nodules sains de légumineuses sauvages contiennent des bactéries non liées aux rhizobia (Zakhia *et al.*, 2006 ; Deng *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2012).

1.4- Conclusion partielle

Dans l'ensemble, le cultivar Ci3 a été le plus compatible avec les rhizobia indigènes sur l'ensemble des échantillons de sols. Par ailleurs, le sol d'Université Jean Lorougnon Guédé a été moins riche en rhizobia nodulant le pois bambara. Le sol et le morphotype du pois bambara ont influencé la formation de nodules sur les systèmes racinaires des plantes au cours du test de piégeage. Cent-vingt-trois (123) bactéries isolées des nodules du pois bambara et purifiées ont montré des caractères morphologiques différents et très variés. Ainsi soixante (60) isolats codés RVC ((Rhizobactéries associées à *Vigna subterranea* Côte d'Ivoire) ont été présélectionnés sur la base de leur diversité morphologique pour constituer une collection hétérogène de bactéries indigènes associées au pois bamabara.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 2 : CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES DES BACTERIES ISOLEES DES NODULES DU POIS BAMBARA

2.1- Résultats de l'amplification du gène codant pour l' ARNr par PCR

L'amplification par PCR de la région génomique de l'ARNr 16S de ces 60 bactéries isolées des nodules du pois bambara (*Vigna subterranea* (L). a généré, sur gel d'agarose, une seule bande d'ADN d'environ 1500 pb (Figure 14).

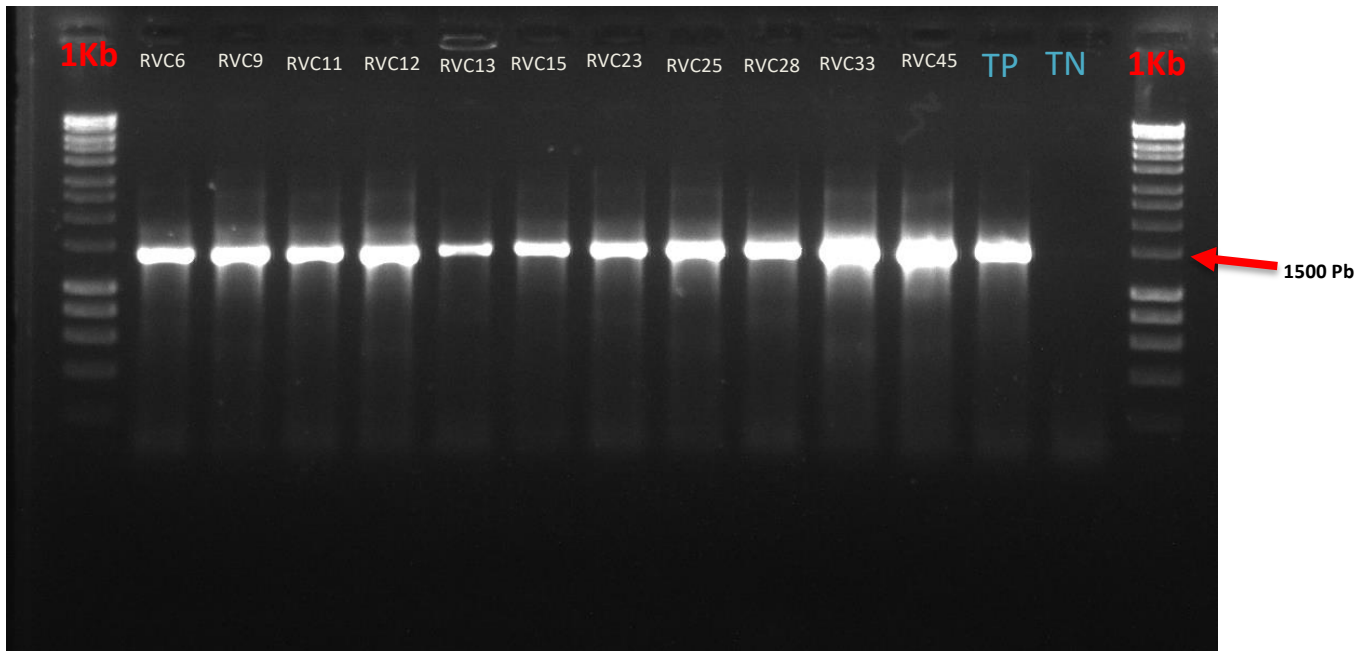


Figure 14 : Gel d'agarose 1 % montrant l'amplification de l'ADNr 16S

2.2- Identification moléculaire des isolats bactériens du pois bambara

L'ensemble des séquences brutes obtenues après séquençage de l'ADN sous forme de chromatogramme a été traité avec le logiciel ChromasPro puis les séquences finales ont été mises sous format fasta (Figure 15). Les tailles des séquences ont varié de 1056 à 1172 pb.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

```
>16_PCF
TGAGGGGGCGCAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTA
AAAGCTCTTTACCCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCG
CACGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAAGTGCCTT
TGATACTGGGTGTCTAGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAAT
TCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCT
GAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC
GATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTTTACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATT
CCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATC
CCGATCGCGGATTACAGAGATGTTTTCTTCAGTTCGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGC
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TCGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGA
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGC
TACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACCGCGAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCAT
CTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCA
GATCAGCATGCTGCGGGTGATACGTTTCAGGCCTTGACACACCGCCCGGTACACCCATG
GGAGTGGTCTACCCGATGTAGTGCCTAACC GCAAGGAGGCAGCTAACCAC
```

A

```
>63_PCF
TGCATGAGGCATCTGACTGAGCACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTA AAGC
TCTTTTGT CAGGGAAGAACCGGTTTTGGCGTAACTGCTCGAACCTTGACGGTACCTGACC
AAAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT
CCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCGTTAAGACTGATGTGAAATCCCC
CGGCTCAACCGGGGAAGTGCATTGGAAACTGGAGGACTTGAGTGCCTAAGAGAAGAGTGG
AATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAATGGCGAAGGCGA
CCCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTCAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGACTGCTAATTGTTAGAGGGTTTCTGCCCTTAA
TGCTGCCTCAAACGCATTAACACTCCCCGGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCA
GGAGATTTGACGGACCCCCGCACACGCGGTGGAACATGTGTTTTATTTCTAAGCCACGCA
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCCTGACAATCCTAGATATGGGACGTGCTCCCTTC
GAGAACACAGCGATGACAGTGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGATATGTG
GGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCACCCCTGTGATCTTTTGTGCCAGCATTTCACTCTAC
ACTCTACTGGT GACTGACAGATCACAACACAGAGGAAGAGTGACGGTATGATCTCCAATG
CACCATGACCGCCTTAGTGACTCTCGCGCTTACACGATGCGTAACAATGCATGGGTACA
GACCGGACACCCAAAGCGGCGAGCGTAATAGCCAAATCGCAGTATCACC AATTCTGGAGT
TGCAGATCTGCAAGCTCGCACATCTCTGCATACTTTGAAGTCTGGTAATCAATTAGTGAA
TCAGCGAATGCAGCAGTGTCAATACTGTACTACGTCTGGACATTGCTAACACAGTCGCA
CCGTCAGCACA ACTGAGTGTATCCGTAAACACTCGGTAGGTCGGATCGCGCGCTAAG
CA
```

B

Figure 15 : Séquences d'ADN de la souche RVC12 (A) et de RVC62 (B) sous format fasta

Sur la base de la comparaison des séquences obtenues par BLAST, deux grands groupes de rhizobactéries à savoir rhizobia et les endophytes ont été mis en évidence. Les séquences alignées (Figure 16) entre elles en fonction des deux groupes (rhizobia et endophytes) ont permis la construction des arbres phylogénétiques par la méthode neighbor-joining.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

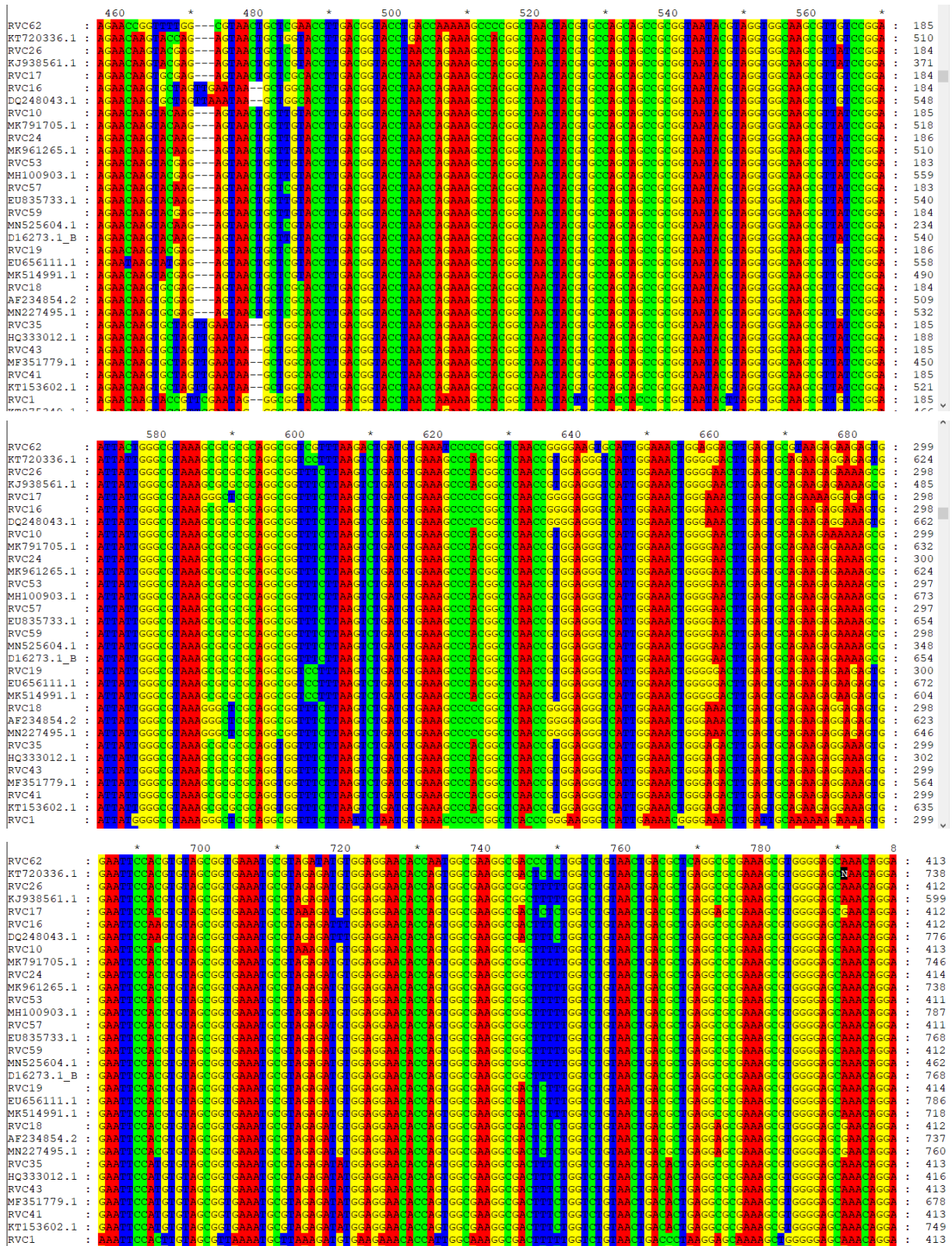


Figure 16: séquences alignées entre 400 et 800 pb de quelques *Bacillus* du pois bambara et des souches de références des *Bacillus*

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

2.2.1- Caractéristiques moléculaires des rhizobia

L'analyse bio-informatique des données a révélé l'appartenance de 15 souches (25 %) de la collection au groupe des rhizobia. Ces bactéries ont été identifiées comme membres de *Rhizobium* (80 %), *Bradyrhizobium* (13,3 %) et *Ensifer* (6,7 %) avec 98 % à 99 % de similarité (Tableau XI).

Tableau XI : Caractéristiques des séquences de l'ADNr 16S des rhizobia du pois bambara

Souches	N° accession	Séquences (pb)	Homologies aux souches de références	Similarité (%)	
RVC6	MT661512	1160	<i>Rhizobium radiobacter</i> NGB-FR-55	AB749219	98,7
RVC9	MT661514	1098	<i>Rhizobium sp.</i>	MG755296	99,51
RVC11	MT661494	1073	<i>Ensifer adhaerens</i>	KY660602	98,88
RVC12	MT661495	1157	<i>Rhizobium nepotum KBL41</i>	MG576194	98,58
RVC13	MT661515	1103	<i>Rhizobium sp. HIN2</i>	JX436337	98,64
RVC15	MT661496	1071	<i>Ensifer sp.</i>	KY992904	98,88
RVC23	MT661517	1064	<i>Ensifer morelensis</i>	KY660614	98,41
RVC25	MT661519	1101	<i>Rhizobium alamii CK-8</i>	KU305699	99,33
RVC28	MT661497	1155	<i>Rhizobium sp. UFPI-38</i>	MK681951	98,3
RVC33	MT661510	1104	<i>Rhizobium sp.</i>	KX884982	98,81
RVC34	MT661497	1094	<i>Rhizobium sp.</i>	MG755296	99,41
RVC38	MT661515	1099	<i>Rhizobium sullae SCAU26</i>	FJ785219	99,43
RVC45	MT661496	1109	<i>Bradyrhizobium yuanmingense DCV2</i>	LC460889	98,81
RVC47	MT661518	1096	<i>Rhizobium sp. UFLA 02-232</i>	MG755296	99,31
RVC50	MT661513	1096	<i>Rhizobium sp. A2Ec4</i>	KF465964.1	99,45

L'arbre phylogénétique obtenu représente différentes espèces rhizobiales, notamment les souches de références de différentes espèces de rhizobia et les souches locales. Ces souches locales sont réparties distinctement en six clusters (Figure 17). Le cluster I contient deux (2) souches de référence et a montré un lien génétique entre deux (2) souches locales RVC45 et RVC11 avec l'espèce *Bradyrhizobium yuanmingense* et trois (3) souches RVC50, RVC13 et RVC23 avec l'espèce *Rhizobium sp. A2Ec4*. Le groupe II a montré une relation génétique très rapprochée entre l'isolat RVC33 et l'espèce *Rhizobium sp. HIN2*. Le groupe III contient 2 groupes de souches locales (a) RVC38 et RVC9 et (b) RVC47 et RVC34 très proches respectivement des espèces *Rhizobium sallue* et *Rhizobium sp. UFLA*. Dans le groupe IV, les souches locales RVC28, RVC6 et RVC12 étaient relativement liées à l'espèce *Rhizobium sp. UFPI*. Enfin, les clusters V et VI contiennent séparément les souches RVC25 et RVC15 qui ont une similitude de 100% respectivement avec l'espèce *Rhizobium alamii CK* et l'espèce *Ensifer sp. PZS*.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Une grande diversité génétique a été observée entre ces souches locales et elles sont affiliées aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Ensifer*.

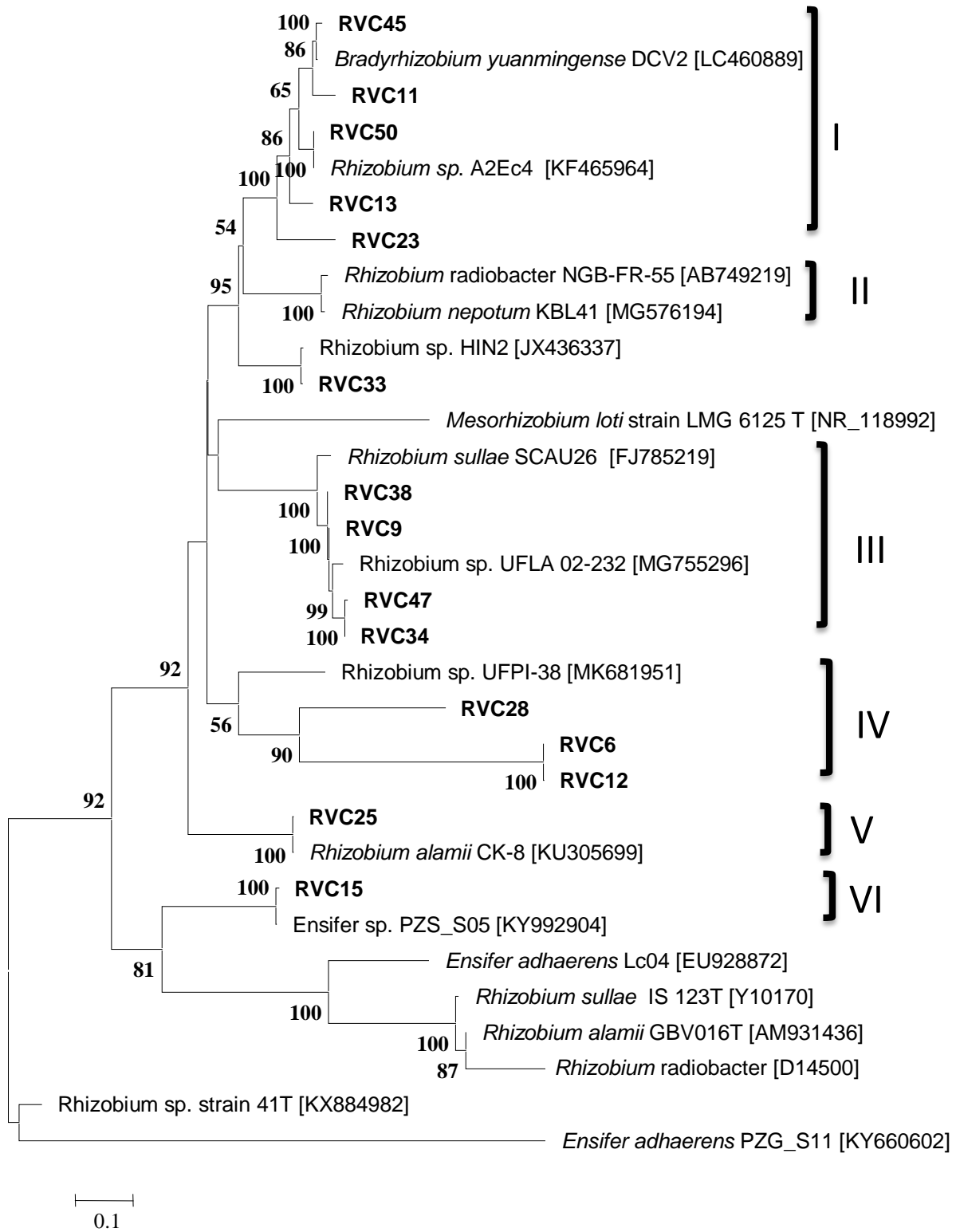


Figure 17 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ADNr 16S montrant les positions phylogénétiques des rhizobia locaux isolés du pois bambara.

Les rhizobia locaux isolés du pois bambara (marqués en gras) par rapport aux souches de référence de différentes espèces de rhizobia.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

2.2.2- Caractéristiques moléculaires des endophytes

L'analyse bio-informatique des données moléculaires a montré que 45 souches (75 %) sont des endophytes nodulaires. En effet, les souches sont affiliées à dix genres (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Rahnella*, *Paenibacillus*, *Mitsuaria*, *Lysobacter* et *Brevibacillus*) avec 98 % à 99 % de similarité (Tableau XII). Le genre bactérien endophytique prédominant dans les nodules du pois bambara est *Bacillus* (55,6 %) suivi de *Pseudomonas* (17,8 %). Cependant, pour la construction de l'arbre phylogénétique, les sept (7) genres les plus abondants ont été pris en compte. L'arbre phylogénétique a permis de grouper les souches en dix groupes inclus dans trois phyla notamment les Firmicutes, les Actinobacteries et les α -Proteobacteries (Figure 18).

Le premier groupe (I) a montré que les souches RVC35, RVC41, RVC43 s'apparentent à neuf espèces du genre *Bacillus*.

Le deuxième (II) groupe a révélé que la souche RVC16 est très proche de de l'espèce *B. acidiceler* N15121.

Le troisième (III) groupe renferme quatre souches de référence des espèces de *Bacillus* et a montré une similarité de 100 % entre la souche RVC4 et l'espèce *B. ginsengisoli*, entre les souches RVC19, RVC24, RVC26, RVC53, RVC59 et l'espèce *B. aryabhatai* puis entre les souches RVC10, RVC57 et l'espèce *B. megaterium* FBMAX18.

Le quatrième (IV) groupe a montré un lien génétique fort entre la souche RVC17 et l'espèce *B. toyonensis*, la souche RVC18 et l'espèce *B. pumilus* puis les souches RVC8, RVC30, RVC37, RVC44, RVC48, RVC61 et six espèces du genre *Bacillus*.

Le cinquième groupe (V) a montré que la souche RVC56 est très proche de l'espèce *Paenibacillus lautus* E7593-69.

Le sixième (VI) groupe comprend les souches RVC5 et RVC32 qui ont une ressemblance avec l'espèce *Microbacterium paraoxydans* QT383.

Le septième (VII) groupe comporte la souche RVC40 qui est liée génétiquement à l'espèce *Curtobacterium* sp. SNH_M18

Le huitième (VIII) groupe a montré que les souches RVC14 et RVC31 sont très proches de l'espèce *Lysobacter soli* DCY21T.

Le neuvième (IX) groupe comprend la souche RVC42 qui a une ressemblance avec l'espèce *Rahnella inusitata* DSM 30078 T.

Enfin le dixième (X) groupe a révélé un lien génétique très proche entre la souche RVC29 et l'espèce *Pseudomonas poae* 15-A1, entre la souche RVC36 et *Pseudomonas* sp. RP-S-1, entre la souche RVC51 et l'espèce *Pseudomonas koreensis*, la souche RVC21 et l'espèce

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Pseudomonas azotoformans, entre la souche RVC54 et l'espèce *Pseudomonas fluorescens*, entre la souche RVC22 et l'espèce *Pseudomonas libanensis* 4G787.

Ces souches ont présenté une grande diversité génétique et sont affiliées aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Rahnella*, *Paenibacillus*, *Mitsuaria*, *Lysobacter* et *Brevibacillus* incluses dans trois phyla (*Firmicutes*, *Actinobacterie* et *α -Proteobacterie*)

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XII: Caractéristiques des séquences de l'ADNr 16S des endophytes du pois bambara

Souches	N° accession	Séquences (pb)	Homologie aux souches de référence	Similarité (%)
RVC1		1147	<i>Bacillus subtilis strain SP3</i>	KT875349 98,94
RVC2		1105	<i>Bacterium strain BS1151</i>	MK824339 98,81
RVC3		1085	<i>Bacterium JDSHGTGPM03-12</i>	KT692617 98,78
RVC4	MT661499	1089	<i>Bacillus pocheonensis strain P12</i>	JN700154 98,86
RVC5	MT661520	1101	<i>Microbacterium sp. strain JL3592</i>	KX989137 98,61
RVC7		1117	<i>Pseudomonas stutzeri strain CPO 4.213</i>	MN733041 98,55
RVC8	MT661508	1099	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis strain AN3</i>	MN560000 98,75
RVC10	MT661489	1082	<i>Bacillus megaterium strain FBMAX18</i>	MK791705 98,04
RVC14	MT661516	1083	<i>Lysobacter sp. KNUC361</i>	EU239150 99,5
RVC16	MT661490	1086	<i>Bacillus sp. L105</i>	DQ248043 99,42
RVC17	MT661491	1116	<i>Bacillus sp. L105</i>	DQ248043 98,89
RVC18	MT661492	1107	<i>Bacillus safensis strain BXC22</i>	MN227495 98,09
RVC19	MT661493	1080	<i>Bacillus nealsonii strain ASB-160</i>	MK514991 98,18
RVC20		1104	<i>Mitsuaria sp. PhRB005</i>	AB560608 98,44
RVC21	MT661511	1113	<i>Pseudomonas azotoformans strain</i>	KF147042 98,86
RVC22	MT661514	1104	<i>Pseudomonas fluorescens strain FC6846</i>	MH497588 98,73
RVC24	MT661494	1083	<i>Bacillus megaterium strain YN7 16S</i>	MK961265 98,77
RVC26	MT661495	1094	<i>Bacillus sp. BAB-3563</i>	KJ938561 98,86
RVC29	MT661515	1100	<i>Pseudomonas poae strain 15-A1</i>	MN307356 98,87
RVC30	MT661496	1080	<i>Bacillus subtilis strain THt3-1</i>	HQ333014 98,38
RVC31	MT661517	1070	<i>Lysobacter sp. KNUC361</i>	EU239150 98,77
RVC32	MT661519	1089	<i>Microbacterium sp. HBUM179633</i>	KR906409 98,34
RVC35	MT661497	1086	<i>Bacillus cereus strain THt1-8</i>	HQ333012 98,6
RVC36	MT661510	1100	<i>Pseudomonas sp strain 7</i>	MK322941 98,85
RVC37	MT661498	1103	<i>Bacillus subtilis strain V90</i>	HQ268534 98,6
RVC39		1172	<i>Brevibacillus sp. strain FW305-C-211</i>	MN067678 98,45
RVC40	MT661522	1081	<i>Curtobacterium pusillum</i>	LN681569 99,25
RVC41	MT661500	1084	<i>Bacillus cereus strain BCRh6</i>	KT153602 98,38
RVC42	MT661518	1115	<i>Rahnella inusitata strain FOD 9/21</i>	KF308406 98,61
RVC43	MT661501	1089	<i>Bacillus cereus strain BAB-6399</i>	MF351779 98,27
RVC44	MT661502	1089	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis strain GC1</i>	KC955127 99,17
RVC46		1082	<i>Bacillus subtilis strain THt3-1</i>	HQ333014 98,7
RVC48	MT661503	1085	<i>Bacillus tequilensis strain RBB6</i>	MN032396 99,55
RVC49	MT661512	1099	<i>Pseudomonas sp. strain Fas20</i>	MH235977 98,9
RVC51	MT661513	1082	<i>Pseudomonas koreensis strain PS3TA2</i>	KY910138 98,33
RVC52		1056	<i>Bacillus amyloliquefaciens strain HDL16</i>	MK214501 98,54
RVC53	MT661504	1092	<i>Bacillus megaterium strain VITNJ1</i>	MH100903 98,63
RVC54	MT661509	1093	<i>Pseudomonas sp. strain Fas20</i>	MH235977 98,98
RVC55		1121	<i>Bacillus subtilis strain M65</i>	KC315772 98,97
RVC56	MT661521	1058	<i>Paenibacillus lautus strain E118</i>	JF683659 98,93
RVC57	MT661505	1081	<i>Bacillus megaterium strain E2-04</i>	MN525604 98,61
RVC59	MT661506	1078	<i>Bacillus megaterium strain DS8</i>	EU835733 98,87
RVC60		1123	<i>Bacillus subtilis strain HHT-10</i>	HQ268531 95,37
RVC61	MT66150	1086	<i>Bacillus subtilis strain LWIS15.</i>	KT945024 98,8
RVC62		1142	<i>Bacillus sp. V44.22</i>	KT720336 98,45

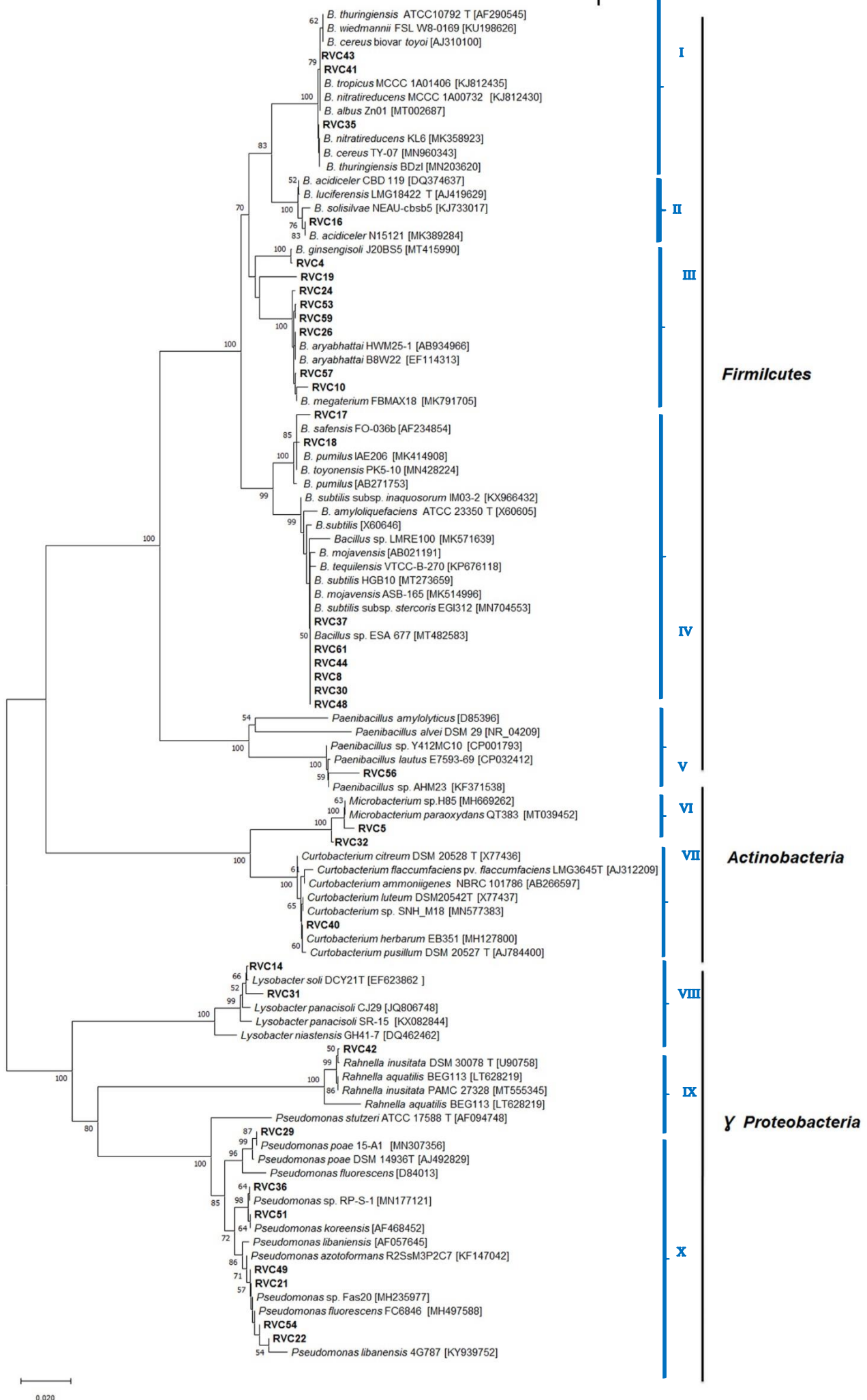


Figure 18: Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ADNr 16S montrant les positions phylogénétiques des endophytes isolés des nodules du pois bambara

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

2.3- Discussion

Pour identifier et décrire la diversité génétique des bactéries qui colonisent les nodules du pois bambara, une analyse génétique basée sur leurs gènes codant pour l'ARNr 16S a été réalisée.

Le gène ribosomique de l'ARNr 16S des 60 souches de la collection a été amplifié et a donné lieu à une bande unique révélée par électrophorèse chez l'ensemble des souches. La taille de la bande a été évaluée visuellement par comparaison au marqueur utilisé sur gel d'agarose et elle correspondait au poids moléculaire de 1500 pb. Les séquences de la bande d'ADNr 16S obtenues ont des tailles variant de 1056 à 1172 pb. L'analyse bio-informatique de ces séquences a permis de mettre en évidence la présence 15 rhizobia (25 %) et 45 endophytes (75 %) dans les nodules du pois bambara. L'arbre phylogénétique basé sur les séquences de l'ADNr 16S des rhizobia a réparti les 15 bactéries identifiées comme des rhizobia en six clusters distincts. Elles ont été regroupées respectivement avec différentes souches de référence, notamment *Bradyrhizobium yuanmingense*, *Rhizobium sp. A2Ec4*, *Rhizobium sp. HIN2*, *Rhizobium alamii CK-8*, *Rhizobium sullae SCAU26*, *Rhizobium sp. UFLA 02-232*, *Rhizobium sp. UFPI-38* et *Ensifer sp. PZS-S05*. La communauté d'endophytes nodulaires du pois bambara analysée dans la présente étude appartenait aux genres *Pseudomonas*, *Baccillus*, *Bacterium*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Rahnella*, *Paenibacillus*, *Mitsuaria*, *Lysobacter* et *Brevibacillus* inclus dans trois différents phyla (Firmicutes, Actinobacteria et α -Proteobacteria). L'endophyte prédominant isolé du nodule du pois bambara a été le genre *Baccillus*, suivi du genre *Pseudomonas*.

La présence du gène codant pour l'ARNr 16S chez ces microorganismes voudrait dire que ces derniers sont tous des bactéries. Ce résultat est parfaitement conforme aux travaux de Hilali (2006) qui a amplifié par PCR l'ADNr 16S dont l'électrophorèse a révélé une bande unique de 1500 pb chez 52 souches bactériennes de Lupin. La grande diversité observée chez les rhizobia et les endophytes de notre collection pourrait s'expliquer par le fait que les sols utilisés pour le piégeage abritent une communauté bactérienne très dense et très diversifiée. Amani *et al.* (2020) ont montré que le sol de la Côte d'Ivoire est un réservoir génétiquement polymorphe de rhizobia locaux capables de noduler efficacement diverses légumineuses. En plus, le pois bambara est une légumineuse d'origine africaine, plus précisément ouest-africaine par conséquent, plusieurs bactéries des sols tropicaux devraient lui être compatibles contrairement à certaines légumineuses comme le soja qui sont d'origine étrangère.

Des travaux réalisés par Gnangu *et al.* (2019), ont rapporté que les rhizobia issus de la rhizosphère du pois bambara au Nord de Côte d'Ivoire étaient classés phylogénétiquement dans

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

trois groupes principaux, sur la base des résultats de séquençage du gène codant pour ARN 16S. Le premier cluster contenait *Rhizobium sp*, le deuxième cluster renfermait *Rhizobium pusense* et un troisième cluster contenait une espèce non identifiée. Cependant, Ibny *et al.* (2019) ont montré que le pois bambara est généralement nodulé dans les sols africains par diverses espèces de *Bradyrhizobium*. Ces derniers ont aussi rapporté que sur les 201 isolats nodulaires du pois Bambara soumis à un test de nodulation, 106 isolats (53 %) n'ont pas nodulé la plante hôte. Des résultats similaires ont été obtenus avec des isolats du soja (Li *et al.*, 2008) et d'autres espèces de *Vigna* (Pandya *et al.*, 2013; Chidebe *et al.*, 2018). Des études récentes de Martinez-Hidalgo & Harsh (2017) ont rapporté la présence de bactéries appartenant à des genres autres que les rhizobia à l'intérieur des nodules des légumineuses, et constituent ainsi avec les bactéries symbiotiques le *microbium* nodulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs auteurs. En effet, ces derniers ont déclaré que différents genres d'endophytes étaient associés au soja (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004), à *Vigna subterranea* (Ibny *et al.*, 2019), à *Vigna radiata* (Pandya *et al.*, 2013) et *Vigna unguiculata* (Chidebe *et al.*, 2018). Les résultats de cette étude confirment ceux rapportés par Ferchichi *et al.* (2019) qui ont montré que les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* dominaient dans les nodules de *Lupinus luteus* et *Lupinus angustifolius*. Pour Compant *et al.* (2010), le genre *Bacillus* a une forte adaptabilité environnementale et constitue un colonisateur typique de diverses cultures. La prédominance des *Pseudomonas* dans le nodule suggère une sélection basée sur la population de la rhizosphère, car il est abondamment présent dans la rhizosphère et s'établit facilement dans une large variété de niches (Spiers *et al.*, 2000).

2.4- Conclusion partielle

Toutes les souches analysées ont présenté une bande unique révélée par électrophorèse d'un poids moléculaire de 1500 pb correspondant à la taille de l'ADNr 16S. Le séquençage de ce gène, et sur la base de la comparaison des séquences obtenues par BLAST, a permis de mettre en évidence la présence des rhizobia (25 %) et des endophytes (75 %) dans les nodules du pois bambara. Les bactéries nodulaires du pois bambara ont présenté une grande diversité génétique et sont affiliées à treize (13) genres (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Pseudomonas*, *Baccillus*, *Bacterium*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Rahnella*, *Paenibacillus*, *Mitsuaria*, *Lysobacter* et *Brevibacillus*) inclus dans trois (3) phyla (Proteobacterie, Firmicutes et Actinobacterie). Le genre bactérien prédominant trouvé dans les nodules du pois bambara est *Baccillus* (41,7 %).

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 3: CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DES BACTERIES NODULAIRES POIS BAMBARA

3.1- Caractéristiques physiologiques et symbiotiques des rhizobia isolés des nodules du pois bambara

Ces tests ont concerné les 15 souches identifiées comme des rhizobia lors de la caractérisation moléculaire

3.1.1- Caractéristiques physiologiques

3.1.1.1- Croissance sur milieu YEMA au bleu de bromothymol

Les résultats de ce test sont indiqués dans le tableau IX. La majorité (86,7 %) des souches ont acidifié les milieux de culture en changeant la couleur de YEMA additionné au BTB en jaune pendant les 3 premiers jours d'incubation. Tandis que les souches RVC45 et RVC11 (13,3 %) ont alcalinisé les milieux de culture en changeant la couleur de YEMA additionné au BTB en bleu (Figure 19). Ainsi, la collection de rhizobia est constituée de bactéries à croissance rapide (86,7 %) et de bactéries à croissance lente (13,3 %).

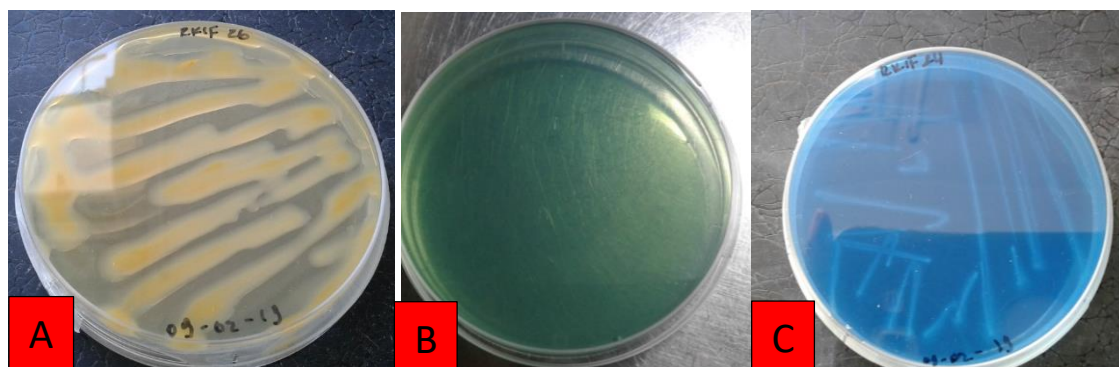


Figure 19 : Réactions des rhizobia nodulant le pois bambara sur YEM + BTB

A : réaction acide B : témoin C : réaction alcaline

3.1.1.2- Assimilation de la source de carbone

L'assimilation des mono et dissaccharides (D-Fructose, D-Galactose, D-Glucose, Mannose, Tréhalose, Mannitol et Maltose) par les souches est apparu après 24 h d'incubation. La croissance des souches a été variable selon l'hydrate de carbone utilisé (Tableau XIII et Figure 20). En effet, 86,7 % des souches ont pu assimiler tous les sucres testés mais à des degrés différents. Mais les souches RVC45 et RVC11 (13,3 %) n'ont pas pu croître en présence du Tréhalose et Maltose. La croissance de 67 % des souches a été affectée négativement en présence des hydrates de carbone testés autre que le mannitol (référence).

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

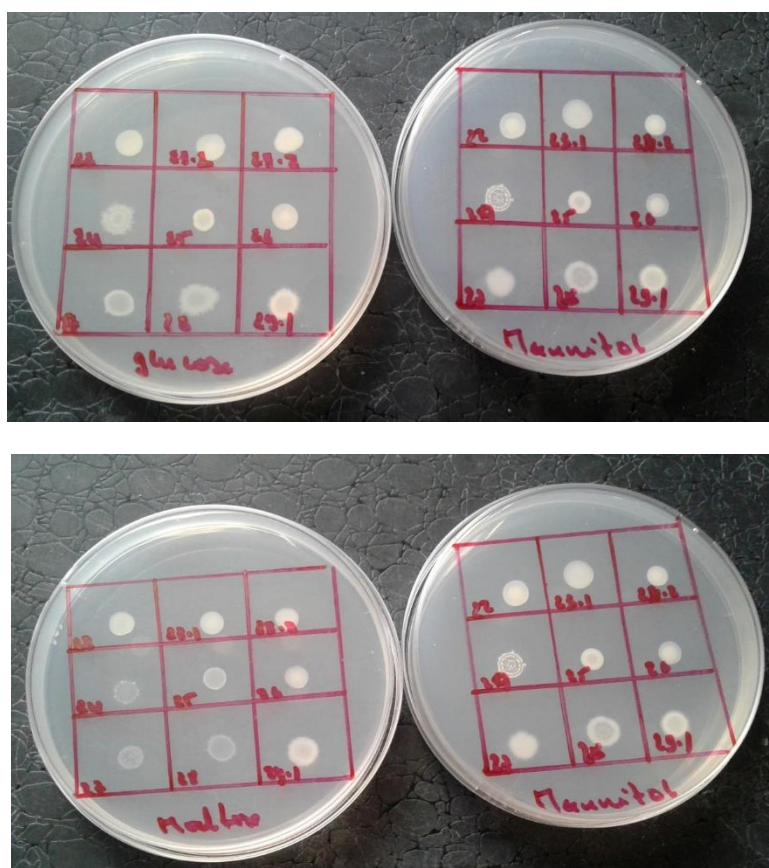


Figure 20 : Comportement des souches rhizobiales en présence des hydrates de carbone testés

Tableau XIII : Croissance des rhizobia en présence de différents hydrates de carbone et leurs réactions sur YEMA + BTB

Souches	Mannitol	Fructose	Glucose	Galactose	Maltose	Mannose	Tréhalose	BTB
RVC6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	A
RVC9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	A
RVC11	+++	++	++	++	-	++	-	B
RVC12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	A
RVC13	+++	++	++	++	++	++	++	A
RVC15	+++	++	++	++	++	++	++	A
RVC23	+++	++	++	++	++	++	++	A
RVC25	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	A
RVC 28	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	A
RVC33	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	A
RVC34	+++	++	++	++	+	++	+	A
RVC38	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	A
RVC45	+++	++	++	++	-	++	-	B
RVC47	+++	++	++	++	+	++	+	A
RVC50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	A

- : pas de croissance; + faible croissance; 2+, croissance moyenne; 3+, très bonne croissance, A: réaction acide, B : réaction alcaline

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1.2- Caractéristiques symbiotiques

3.1.2.1- Authentification des rhizobia

Parmi tous ces isolats ayant présenté des traits distinctifs (morphologies, coloration de Gram) des rhizobia, quinze (15) ont été identifiés comme étant génétiquement très proches de certaines espèces de la famille des Rhizobiacées. Ces quinze (15) bactéries étudiées ont pu réinfecter et reformer les nodules fonctionnels avec les plantes de leur cultivar d'origine (Figure 21 A et B). Tandis qu'aucun nodule ne s'est formé sur les racines des témoins azotés et des témoins non azotés et non inoculés (Figure 21 C et D). Par ailleurs, l'analyse des variances a montré des différences significatives à $P < 0,05$ entre les nombres nodules d'une part et entre les poids secs de nodules induits par les souches rhizobiales d'autre part (Tableau XIV). En effet, le nombre et le poids sec de nodules formés ont varié en fonction de la souche. Ces souches ont induit des nombres importants de nodules variant de 25 nodules/plante pour la souche RVC12 à 106 nodules/plante pour la souche RVC50. La matière sèche de nodules quant à elle, a varié de 30,33 mg/plante pour la souche RVC12 à 298 mg/plante pour la souche RVC50. De plus, une proportion de 46,7 % des souches a exhibé une infectivité supérieure à 50 nodules par plante. Les souches rhizobiales testées sont des rhizobia authentiques du pois bambara. Ainsi, les souches RVC50, RVC45, RVC38, RVC25, RVC13, RVC28, et RVC47 se sont révélées plus infectives.

Tableau XIV : Nombre et poids sec des nodules en fonction des souches rhizobiales

Traitements	Nombre de nodules/plante	Poids secs nodule (mg) /plante
N -	-	-
RVC6	32±5 hi	40±8 ij
RVC9	45±7 f	61±6 g
RVC11	39±3 fgh	45±9 hi
RVC12	25±8 i	30,33 ±2 j
RVC13	78±6 c	152,33±15 d
RVC15	34±3 gh	59,67±7 g
RVC23	32±9 hi	61±4 g
RVC25	88±15 b	285,33±13 a
RVC28	70±11 d	119±21 e
RVC33	40±4 fg	53,33±10 gh
RVC34	33±5 gh	45±8 hi
RVC38	79±13 c	175±25 c
RVC45	105±21 a	265±13 b
RVC47	61±12	85,33±6 f
RVC50	106±17 a	298±15 a
N +	-	-

Dans chaque colonne les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ (test de Newman-Keuls). N- : témoin non inoculé et non azoté, N+ : témoin azoté

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

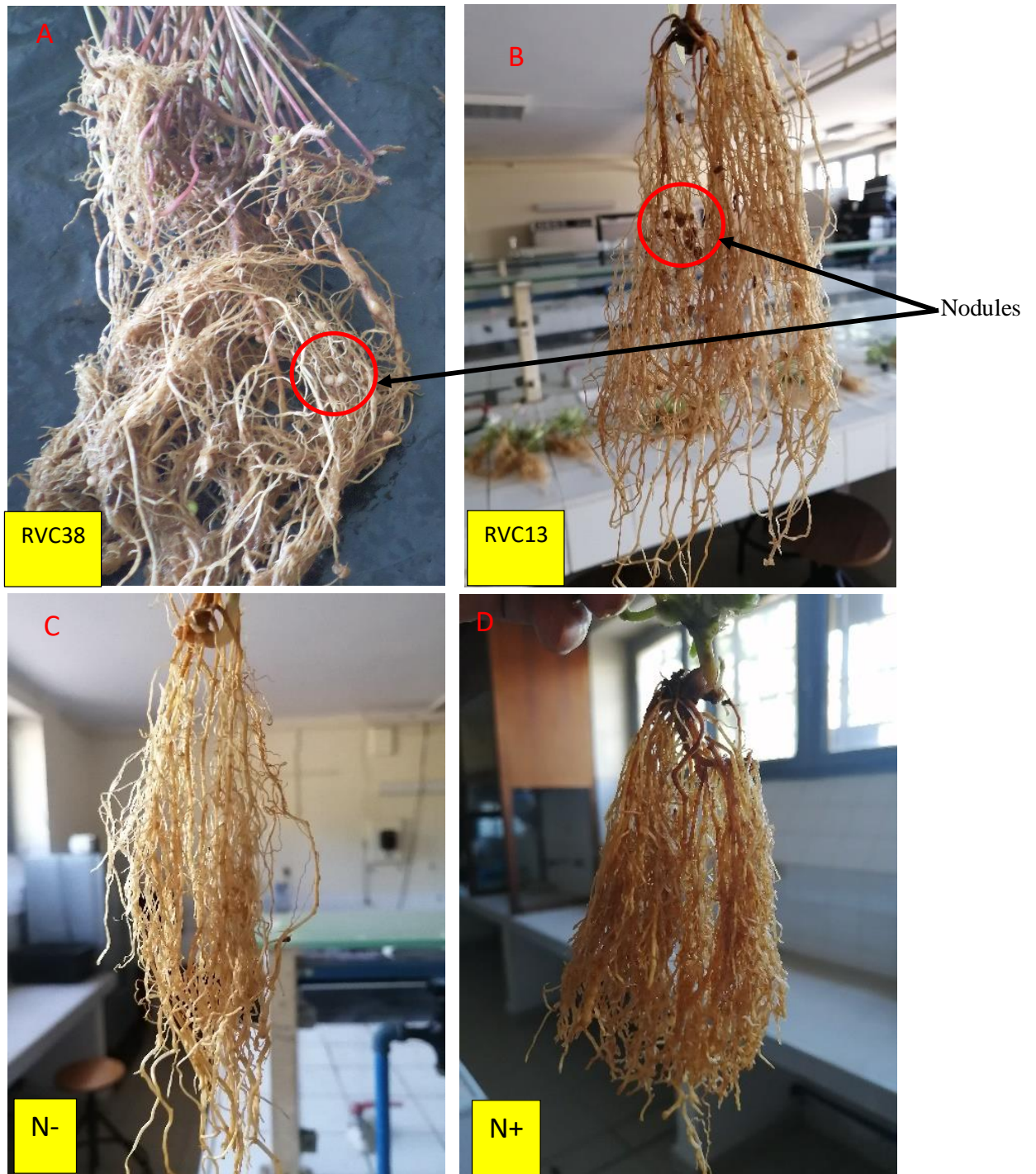


Figure 21 : Systèmes racinaires des plantes des cultivars Ci3 et Ci5 du pois bambara

(N-) : témoin négatif non inoculé et non azoté ; (N+) : témoin positif azoté et non inoculé
(RVC13) : plante inoculée avec la souche RVC13 ; (RVC38) : plante inoculée avec la souche RVC38

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1.2.2- Performance symbiotique des rhizobia authentifiés

3.1.2.2.1- Effet des rhizobia sur les caractéristiques agro-morphologiques des plantes

L'observation des plantes a permis de constater une différence nette entre les plantes inoculées d'une part et entre les plantes azotées, les plantes inoculées et les plantes non inoculées et non azotées d'autre part (Figure 22, Tableau XV).

En effet, les plantes inoculées ont principalement formé des racines brunes claires mais aussi des racines blanchâtres. Les plantes azotées quant à elles, ont formé des racines brunes foncées. Tandis que les plantes non inoculées et non azotées ont formé des racines blanchâtres.

Pour la couleur des feuilles, les plantes inoculées ainsi que celles fertilisées ont présenté des feuilles vert-foncées à l'exception des plantes inoculées avec les souches RVC12, RVC15, RVC23 et RVC47. Ces dernières ont donné des feuilles vert-claires différentes des feuilles verdâtres des plantes témoins non inoculées et non azotées.

La vitalité des plantes a été dans la même dynamique que la couleur des feuilles si bien que les plantes inoculées et les plantes azotées (N+) étaient plus vigoureuses que les témoins non inoculées et non azotées (N-). En effet, les feuilles des plantes azotées n'ont subi aucune attaque. Quant aux feuilles des plantes inoculées, certaines ont été sans attaque par contre d'autres ont présenté des signes de nécrose. Pour les plantes non inoculées et non azotées, les feuilles ont présenté toutes des signes de nécrose et de chlorose.

L'analyse de la variance a révélé à $P < 0,05$, une différence significative entre les longueurs des racines et une différence non significative entre longueurs des tiges (Tableau XV). En effet, les longueurs des racines des plantes inoculées ont varié de 21,17 à 34,63 cm tandis que celles des plantes azotées et des plantes non inoculées et non azotées ont été respectivement de 22,37 et de 18,83 cm. Les racines des plantes inoculées avec les souches RVC13, RVC25, RVC28, RVC38, RVC45 et RVC50 ont été plus longues que celles des plantes azotées. Les longueurs des tiges des plantes inoculées ont varié de 16,37 à 19,63 cm tandis que celles des plantes azotées et des plantes non inoculées et non azotées ont été respectivement de 19,70 et de 14,97 cm.

L'inoculation des plantes par les souches rhizobiales a amélioré les caractères agro-morphologiques de ces dernières comparés aux témoins négatifs et même les témoins positifs pour certaines. Cependant l'effet de l'inoculation varie en fonction de la souche rhizobiale.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XV : Caracteristiques morpho-agronomiques des plantes en fonction du traitement

Traitement	Couleur racine	Couleur feuille	Vitalité plante	Longueur racine (cm /Pl)	Longueur tige (cm/Pl)
N-	B	3	+	18,83±4,09 c	14,97±3,15 a
RVC6	BC	5	+++	24,26±0,57 bc	16,80±1,66 a
RVC9	BC	5	+++	24,36±0,57 bc	16,90±1,66 a
RVC11	BC	5	+++	26,87±2,48 b	16,60±1,56 a
RVC12	BC	4	++	21,17±5,49 bc	16,86±2,00 a
RVC13	BC	5	+++	32,53±1,88 a	18,03±0,59 a
RVC15	B	4	++	25,77±2,63 bc	16,90±1,49 a
RVC23	BC	4	++	26,07±1,38 bc	16,37±1,56 a
RVC25	BC	5	+++	33,03±1,88 a	18,53±0,59 a
RVC28	BC	5	+++	34,30±1,37 a	19,37±1,95 a
RVC33	BC	5	+++	25,90±2,92 bc	17,83±1,86 a
RVC34	BC	5	+++	23,97±0,57 bc	16,50±1,66 a
RVC38	BC	5	+++	32,83±1,88 a	18,33±0,59 a
RVC45	BC	5	+++	33,30±1,30 a	18,57±2,13 a
RVC47	B	4	++	26,10±2,92 bc	18,03±1,85 a
RVC50	BC	5	+++	34,63±1,11 a	19,63±2,09 a
N+	BF	5	+++	22,37±5,06 bc	19,70±2,90 a

Dans chaque colonne les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ (test de Newman-Keuls). **B** : blanchâtre, **BC** : brun clair, **BF** : brun foncé, **5** : vert foncé, **4** : vert clair, **3** : verdâtre, +++ : bonne vitalité, ++ : vitalité moyenne, + : mauvaise vitalité, N- : témoin négatif, N+ : témoin azoté, **RVC** : souches bactériennes

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

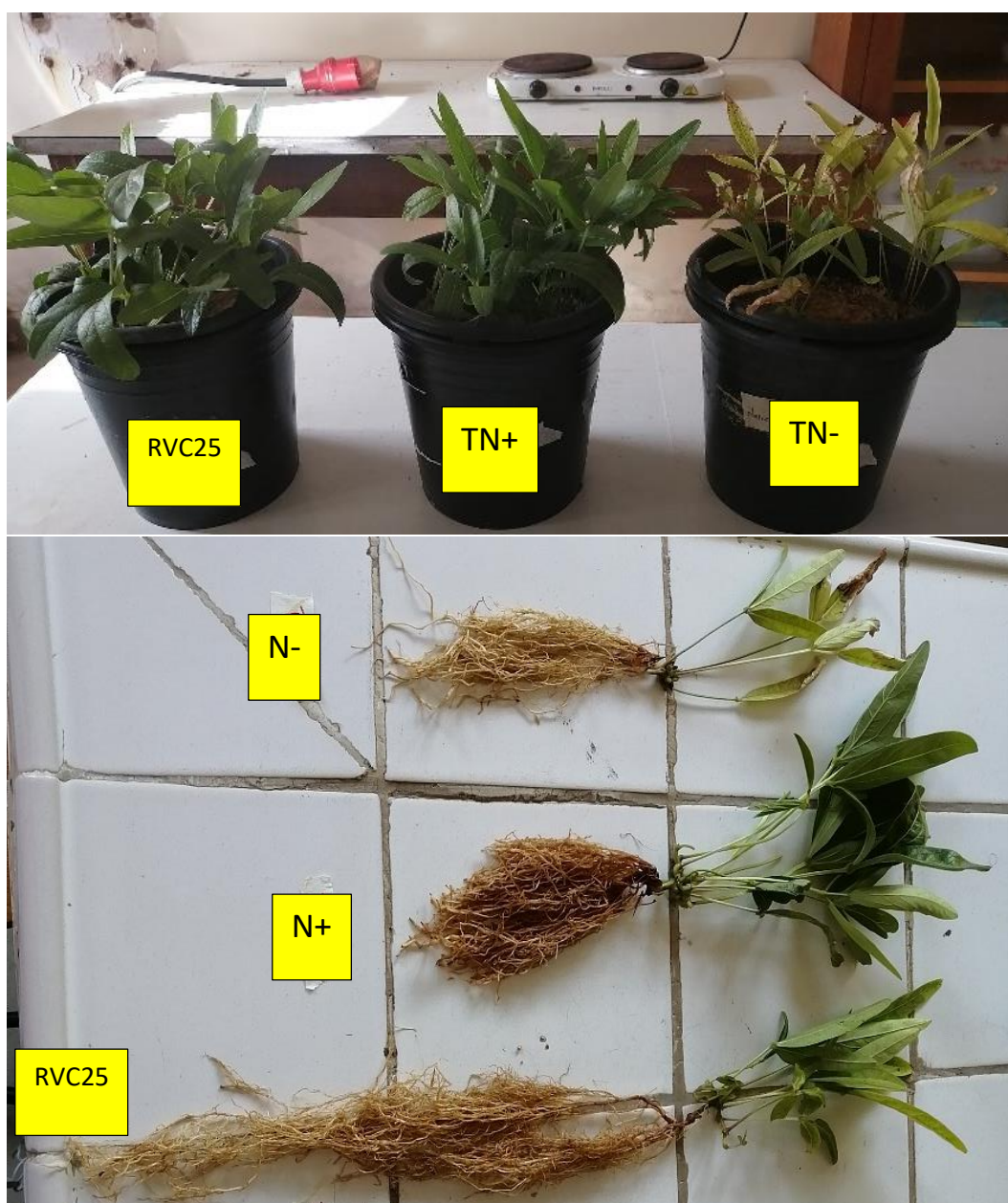


Figure 22 : Aspect des plantes du cultivar Ci3 en fonction des traitements
(N-) : témoin négatif non inoculé et non azoté (N+) : témoin positif azoté
(RVC25) : plante inoculée avec la souche RVC25

3.1.2.2.2- Infectivité symbiotique

Les 15 bactéries ont pu infecter et reformer les nodules fonctionnels avec les plantes du cultivar Ci3 du pois bambara de diverses manières. Tandis qu'aucun nodule ne s'est formé sur les racines des plantes témoins azotées et témoins non azotées (Tableau XVI).

Par ailleurs, l'analyse de la variance a montré une différence significative à $P < 0,05$ entre les nombres de nodules et entre les poids secs de nodules induits par les souches rhizobiales. En

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

effet, les nombres et les poids secs des nodules formés ont varié en fonction de la souche. Ces souches ont induit des nombres importants des nodules variant de 18 nodules/plante pour la souche RVC11 à 87 nodules/plante pour la souche RVC50. De plus, une proportion de 26,7 % des souches a montré une infectivité supérieure à 50 nodules/plante.

La matière sèche de nodules quant à elle a varié de 21,67 mg/plante pour la souche RVC11 à 289 mg /plante pour la souche RVC25. Statistiquement il n'y avait pas de différence entre les nombres de nodules induits par les souches RVC50 et RVC25. Mais les poids secs des nodules induits par ces dernières étaient différents.

L'infectivité a varié en fonction des souches. Ainsi, les souches RVC50, RVC25, RVC13 et RVC38, se sont révélées plus infectives.

Tableau XVI : Nombre et poids sec des nodules en fonction du traitement

Traitements	Nombre de nodules/plante	Poids secs nodule mg/plante
N -	-	-
RVC6	20±6 f	25±2,64 i
RVC9	23±6 ef	40±5 ghi
RVC11	18±7 f	21,67±4,04 i
RVC12	19,00±4 f	27,67±7,09 i
RVC13	67±7 b	148,33±12,34 c
RVC15	27±5 ef	58,00±7,5 f
RVC23	24±2 ef	50,67±2,35 gf
RVC25	80±10 a	289,33±17,92 a
RVC28	39±5 de	80±3 e
RVC33	26±6 ef	31,33±6,03 hi
RVC34	20±6 f	36±7,53 ghi
RVC38	54±1 c	123,33±11,59 d
RVC45	46±5 dc	116±6 d
RVC47	32±8 ef	48,67±6,5 gfh
RVC50	87±9 a	266±4 b
N +	-	-

Dans chaque colonne les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$ (test de Newman-Keuls). N- : témoin non inoculé et non azoté, N+ : témoin azoté

3.1.2.2.3- Effet des souches sur la biomasse et leur efficacité symbiotique

L'analyse de la variance (ANOVA) a montré qu'il y a une différence significative ($P < 0,05$) entre les biomasses fraîches et entre les biomasses sèches (Tableau XVII).

En effet, la biomasse fraîche aérienne issue de l'inoculation a varié de 2,53 g/plante pour les souches RVC11 et RVC28 à 4,11 g/plante pour la souche RVC9. Tandis que celles du témoin négatif (N-) et du témoin positif (N+) ont été respectivement de 2,08 et de 8,47 g/plante. Alors,

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

la biomasse fraîche aérienne a été améliorée par l'ensemble des souches testées par rapport à celle du témoin négatif. Cependant les biomasses induites par ces souches étaient inférieures à celles des témoins azotés (N+).

La biomasse fraîche racinaire issue de l'inoculation a varié de 3,32 g/plante pour la souche RVC11 à 6,50 g/plante pour la souche RVC50. Tandis que celles du témoin négatif (N-) et du témoin positif (N+) ont été respectivement de 3,17 g/plante et de 7,87 g/plante. Moins de la moitié (40 %) des souches a impacté positivement la quantité en biomasse par rapport au témoin négatif. Les plantes inoculées avec les souches RVC23, RVC25 et RVC50 ont présenté les mêmes réponses que les témoins azotés (N+).

La quantité en matière sèche de la partie aérienne de la plante hôte a différencié considérablement entre les souches testées, avec des valeurs allant de 0,51 g/plante pour la souche RCV28 à 1 g/plante pour la souche RVC25. La matière sèche de la partie aérienne des plantes inoculées était supérieure à celle des plantes non inoculées et non azotées (0,46 g/plante) et inférieure à celle des plantes azotées (1,21 g/plante).

La biomasse sèche racinaire issue de l'inoculation a varié de 0,27 g/plante pour les souches RVC11 et RVC23 à 0,50 g/plante pour la souche RVC25. Tandis que celles du témoin négatif (N-) et du témoin positif (N+) ont été respectivement de 0,22 g/plante et de 0,56 g/plante. Cependant, aucune différence significative statistique n'a été observée au niveau des valeurs de ces moyennes.

D'une manière générale, les poids frais racinaires ont été supérieurs aux poids frais aériens tandis que les poids secs racinaires ont été inférieurs aux poids secs aériens sauf pour les plantes témoins azotées.

L'inoculation a influencé positivement la biomasse de la plupart des plantules par rapport à celle du témoin négatif (N-). Toutefois, l'effet de l'inoculation a varié en fonction de la souche. Ainsi, les RVC25, RVC38 et RVC13, RVC28 et RVC50 ont induit les meilleurs rendements en biomasse.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XVII : Biomasses des plantes en fonction du traitement

Taitements	Poids frais aérien (g /Pl)	Poids frais racinaire (g/Pl)	Poids sec aérien (g/Pl)	Poids sec racinaire (g/Pl)
N -	2,08±0,62 bc	3,17±0,72 b	0,46±0,10 bc	0,22±0,03 a
RVC6	4,00±0,70 b	4,21±0,30 b	0,60±0,32 b	0,32±0,18 a
RVC9	4,11±0,70 b	4,30±0,30 b	0,67±0,34 b	0,35±0,15 a
RVC11	2,53±0,68 b	3,32±0,79 b	0,2±0,10 bc	0,27±0,11 a
RVC12	3,69±0,90 b	4,83±1,78 b	0,71±0,20 b	0,48±0,27 a
RVC13	3,45±1,46 b	5,45±2,94 ab	0,90±0,56 ab	0,45±0,23 a
RVC15	2,90±0,80 b	3,69±0,71 b	0,59±0,11 b	0,29±0,12 a
RVC23	2,58±0,68 b	3,36±0,79 b	0,61±0,09 b	0,27±0,10 a
RVC25	3,95±1,46 b	5,96±2,92 a	1,00±0,56 a	0,50±0,27 a
RVC28	2,53±0,84 b	6,09±0,31 a	0,51±0,13 bc	0,37±0,16 a
RVC33	3,40±0,43 b	4,52±0,65 b	0,71±0,13 b	0,46±0,08 a
RVC34	3,71±0,70 b	3,90±0,30 b	0,59±0,30 b	0,34±0,16 a
RVC38	3,75±1,46 b	5,76±2,92 ab	0,87±0,41 ab	0,41±0,19 a
RVC45	2,77±0,72 b	5,39±0,33 ab	0,51±0,13 bc	0,37±0,17 a
RVC47	3,60±0,44 b	4,72±0,65 b	0,63±0,16 b	0,42±0,09 a
RVC50	2,93±0,83 b	6,50±0,33 a	0,61±0,13 b	0,44±0,22 a
N +	8,47±3,06 a	7,87±4,88 a	1,21±0,49 a	0,56±0,29 a

Dans chaque colonne les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ (test de Newman-Keuls). N- : témoin non inoculé et non azoté, N+ : témoin azoté, RVC : souches bactériennes

La mesure indirecte des contributions de la fixation de l'azote via la matière sèche des parties aériennes variaient considérablement entre les souches testées. L'indice relatif (IR) (figure 23) et l'efficacité symbiotique relative (ER) (Figure 24) ont évolué dans le même sens que les différences observées dans la nodulation et le rendement en matière sèche des plantes. Les souches RVC45 et RVC28 ont été les moins efficaces avec $IR = 1,1$ et $ER = 42 \%$ contrairement à la RVC25 qui a été la plus efficace avec $IR = 2,17$ et $ER = 83 \%$. Sur la base des proportions de l'efficacité relative manifestée par les souches, 33 % des souches ont été classées comme fixatrices inefficaces de N_2 ($ER < 50 \%$); tandis que 60 % étaient

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

moyennement efficaces ($50 \leq ER \leq 80 \%$). Seule la souche RVC25 s'est révélée comme une fixatrice très efficace ($ER \geq 80 \%$).

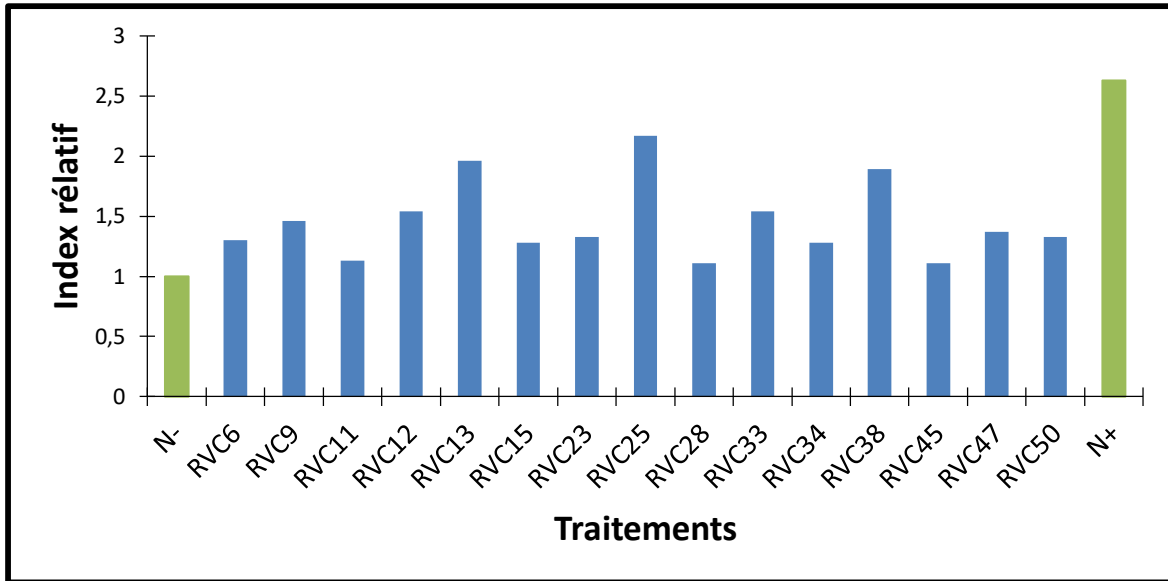


Figure 23 : Index relatif des rhizobia nodulant le pois bambara

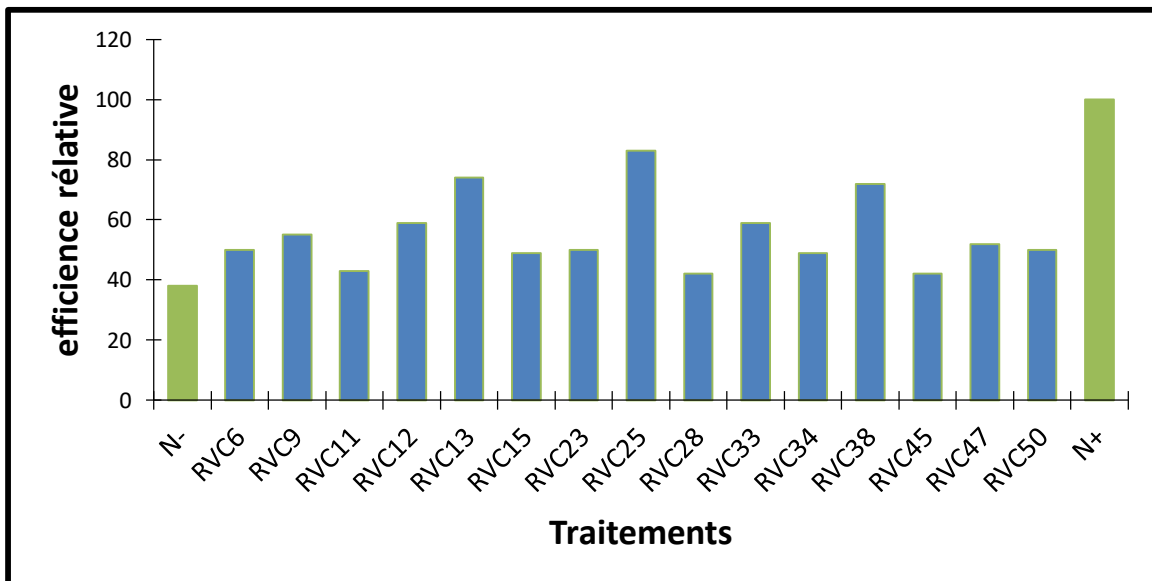


Figure 24 : Efficacité symbiotique relative des rhizobia nodulant le pois bambara

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.2- Effets des facteurs abiotiques *in vitro* sur la viabilité des bactéries nodulaires du pois bambara

3.2.1- Effet du NaCl sur les bactéries nodulaires du pois bambara

3.2.1.1- Effet du NaCl sur les rhizobia

Les souches ont présenté une variabilité dans leur tolérance vis-à-vis du NaCl sur YEM solide (Tableau XVIII, Annexe 12).

Toutes les souches ont pu croître en présence de 5 % de NaCl mais avec des tolérances différentes. En effet, 46,7 %, 20 % et 33,3 % des souches ont présenté respectivement des croissances faible, moyenne et bonne. Toutes les souches ont été sensibles au-delà de 7 % de NaCl excepté quatre souches (RVC11, RVC15, RVC38 et RVC50) soit 26,66 % des souches mais la croissance de ces dernières était faible. Seule la souche RVC15 a toléré 10 % de NaCl. Par contre, aucune souche n'a pu croître à la concentration de 11 % de NaCl.

Tableau XVIII: Croissance des rhizobia à différentes concentrations de NaCl sur YEM solide

Souches	Concentration de NaCl (%)							
	0,01	5	6	7	8	9	10	11
RVC6	3+	+	-	-	-	-	-	-
RVC9	3+	2+	+	+	-	-	-	-
RVC11	3+	3+	3+	2+	+	-	-	-
RVC12	3+	+	-	-	-	-	-	-
RVC13	3+	3+	+	+	-	-	-	-
RVC15	3+	3+	2+	2+	+	+	+	-
RVC23	3+	2+	2+	+	-	-	-	-
RVC25	3+	+	-	-	-	-	-	-
RVC28	3+	2+	2+	+	-	-	-	-
RVC33	3+	+	+	-	-	-	-	-
RVC34	3+	+	+	-	-	-	-	-
RVC38	3+	3+	2+	2+	+	+	-	-
RVC45	3+	+	-	-	-	-	-	-
RVC47	3+	+	+	-	-	-	-	-
RVC50	3+	3+	2+	+	+	-	-	-

- : pas de croissance; + : faible croissance; 2+ : croissance moyenne; 3+ : bonne croissance

Les tests sur YEM liquide ont montré une variabilité de réponses des souches en présence des différentes concentrations de NaCl testées en fonction des intervalles de temps.

Sur le milieu additionné de 0,01 % de NaCl (témoin), toutes les souches ont pu croître normalement avec des DO > 0,5 (Tableau XIX). Les DO des cultures en 24 h ont varié de 0,555 pour la souche RVC11 à 1,152 pour la souche RVC12. Les DO en 48 h ont varié de 0,593 pour la souche RVC11 à 1,509 pour la souche RVC25 et les DO en 72 h ont varié de 0,639 pour la

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

souche RVC11 à 1,485 pour la souche RVC9. La croissance optimale de 73,3 % des souches était atteinte en 48h et celle de 26,7 % des souches en 72 h.

Tableau XIX : Croissance des rhizobia exprimée en DO à 0,01 % du NaCl (Témoin) sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24 h	48 h	72 h
RVC6	0,627	1,222	1,222
RVC9	0,655	1,485	1,485
RVC11	0,555	0,593	0,636
RVC12	1,152	1,398	1,398
RVC13	0,703	1,276	1,008
RVC15	0,69	1,106	1,002
RVC23	0,634	0,723	1,102
RVC25	1,105	1,509	1,322
RVC28	0,973	1,288	1,146
RVC33	0,979	1,449	1,353
RVC34	0,89	1,429	1,322
RVC38	0,859	1,188	1,036
RVC45	0,821	0,983	0,989
RVC47	1,146	1,241	1,394
RVC50	0,874	0,911	0,835

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Sur le milieu additionné de 5 % de NaCl, toutes les souches ont été tolérantes avec des DO \geq 0,5 de 48 h à 72 h. Toutefois, la croissance de la majorité a été affectée comparée à celle observée sur le milieu témoin (Tableau XX). En effet, 66,7 % des souches ont eu une croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins, ces dernières ont pu se développer de 48 h à 72 h atteignant des DO \geq 0,5 mais avec une croissance affectée négativement. Seulement quatre souches (RVC11, RVC13, RVC15 et RVC38) n'ont pas été véritablement affectées avec des légères baisses de DO. La souche RVC38 a été plus tolérante avec des DO (DO_{24h} = 0,861 ; DO_{48h} = 1,028 ; DO_{72h} = 0,935) qui ont subi de légères baisses comparées aux DO (DO_{24h} = 0,859 ; DO_{48h} = 1,188 ; DO_{72h} = 1,036) obtenues avec la croissance de cette souche sur le milieu témoin. La souche RVC25 a été plus sensible avec des DO (DO_{24h} = 0,476 ; DO_{48h} = 0,813 ; DO_{72h} = 0,745) qui ont subi de légères baisses comparées aux DO (DO_{24h} = 1,105 ; DO_{48h} = 1,509 ; DO_{72h} = 1,322) obtenues avec la croissance de cette souche sur le milieu témoin.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XX : Croissance des rhizobia exprimée en DO à 5 % du NaCl sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24 h	48 h	72 h
RVC6	0,344	0,535	0,496
RVC9	0,659	0,861	0,781
RVC11	0,395	0,534	0,662
RVC12	0,26	0,599	0,474
RVC13	0,612	0,985	0,819
RVC15	0,318	1,027	0,998
RVC23	0,559	0,563	0,734
RVC25	0,476	0,813	0,745
RVC28	0,516	0,924	0,823
RVC33	0,482	0,727	0,885
RVC34	0,333	0,823	0,932
RVC38	0,861	1,028	0,935
RVC45	0,359	0,544	0,649
RVC47	0,738	0,889	0,915
RVC50	0,566	0,786	0,647

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Sur le milieu à 6 % de NaCl, la majorité des souches (73,3 %) a été tolérante avec des DO \geq 0,5 de 48 h à 72 h (Tableau XXI). En effet, la majorité des souches ont eu une croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins ces dernières ont pu se développer de 48 h à 72 h atteignant des DO \geq 0,5 mais avec une croissance affectée négativement. Cependant quatre souches (RVC6, RVC12, RVC25 et RVC45) n'ont pas pu survivre en affichant des DO \leq 0,5.

Tableau XXI: Croissance des rhizobia exprimée en DO à 6 % du NaCl sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24 h	48 h	72 h
RVC6	0,307	0,355	0,483
RVC9	0,597	0,707	0,646
RVC11	0,331	0,549	0,485
RVC12	0,229	0,456	0,329
RVC13	0,597	0,771	0,608
RVC15	0,295	0,871	0,724
RVC23	0,286	0,443	0,586
RVC25	0,26	0,254	0,289
RVC28	0,468	0,908	0,781
RVC33	0,323	0,538	0,636
RVC34	0,254	0,593	0,536
RVC38	0,695	0,855	0,91
RVC45	0,298	0,458	0,478
RVC47	0,679	0,782	0,821
RVC50	0,362	0,656	0,488

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Sur le milieu additionné 7 % de NaCl, une proportion de 53,3 % des souches a été tolérante avec des DO $\geq 0,50$ de 48 h à 72 h (Tableau XXII). En effet, toutes les souches ont exhibé une croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins, plus de la moitié a pu se développer de 48 h à 72 h atteignant des DO $\geq 0,5$ mais avec une croissance affectée négativement. Cependant sept souches (RVC6, RVC12, RVC25, RC33, RVC34, RVC45 et RVC47) n'ont pas pu survivre en affichant des DO $< 0,5$.

Tableau XXII: Croissance des rhizobia exprimée en DO à 7 % du NaCl sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24 h	48 h	72 h
RVC6	0,108	0,249	0,415
RVC9	0,53	0,599	0,529
RVC11	0,427	0,492	0,392
RVC12	0,247	0,397	0,254
RVC13	0,44	0,579	0,467
RVC15	0,124	0,746	0,639
RVC23	0,184	0,314	0,568
RVC25	0,126	0,226	0,291
RVC28	0,445	0,78	0,663
RVC33	0,294	0,415	0,436
RVC34	0,26	0,304	0,258
RVC38	0,205	0,571	0,367
RVC45	0,156	0,31	0,438
RVC47	0,121	0,251	0,335
RVC50	0,355	0,566	0,401

Sur le milieu additionné 8 % de NaCl, seulement trois souches (RVC15, RVC38 et RVC50) ont été tolérantes avec des DO $\geq 0,5$ de 48 h à 72 h (Tableau XXIII). En effet, la majorité des souches a montré des croissances ralenties pendant les premières 24 h puis n'a pas pu se développer pendant de 48 h à 72 h en affichant des DO $\leq 0,5$.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XXIII: Croissance des rhizobia exprimée en DO à 8 % du NaCl sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24 h	48 h	72 h
RVC6	0,105	0,297	0,287
RVC9	0,408	0,297	0,464
RVC11	0,287	0,471	0,385
RVC12	0,2	0,232	0,231
RVC13	0,156	0,338	0,433
RVC15	0,092	0,632	0,585
RVC23	0,079	0,117	0,15
RVC25	0,116	0,201	0,225
RVC28	0,244	0,25	0,262
RVC33	0,102	0,189	0,385
RVC34	0,213	0,296	0,235
RVC38	0,26	0,492	0,498
RVC45	0,148	0,209	0,302
RVC47	0,22	0,371	0,264
RVC50	0,295	0,549	0,339

Sur le milieu additionné 9 % de NaCl, seulement deux souches (RVC15 et RVC38) ont été tolérantes avec des DO $\geq 0,5$ de 48 h à 72 h (Tableau XXIV). En effet, une proportion de 86,7 % des souches n'a pas pu se développer de 48 h à 72 h en affichant des DO $< 0,5$.

Tableau XXIV: Croissance des rhizobia exprimée en DO à 9 % du NaCl sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)	
	48 h	72 h
RVC6	0,263	0,298
RVC9	0,204	0,229
RVC11	0,371	0,307
RVC12	0,319	0,299
RVC13	0,341	0,455
RVC15	0,622	0,489
RVC23	0,227	0,199
RVC25	0,197	0,28
RVC28	0,261	0,263
RVC33	0,21	0,212
RVC34	0,308	0,33
RVC38	0,274	0,549
RVC45	0,202	0,238
RVC47	0,208	0,262
RVC50	0,292	0,336

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Sur le milieu additionné 10 % de NaCl, seulement la souche RVC15 a été tolérante avec une DO = 0,502 à 48 h (Tableau XXIV). En effet, une proportion de 93,3 % des souches n'a pas pu se développer de 48 h à 72 h en affichant des DO < 0,5

Tableau XXV: Croissance des rhizobia exprimée en DO à 7 % du NaCl sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)	
	48 h	72 h
RVC6	0,143	0,178
RVC9	0,084	0,109
RVC11	0,251	0,187
RVC12	0,199	0,179
RVC13	0,221	0,335
RVC15	0,502	0,369
RVC23	0,107	0,079
RVC25	0,077	0,16
RVC28	0,141	0,143
RVC33	0,09	0,092
RVC34	0,188	0,21
RVC38	0,154	0,429
RVC45	0,082	0,118
RVC47	0,088	0,142
RVC50	0,172	0,216

Dans l'ensemble, les bactéries symbiotiques ont toléré les fortes concentrations de NaCl. Cependant, la tolérance des souches diminuait avec l'augmentation de la concentration en NaCl quel que soit la nature du milieu. Le seuil de tolérance a été de 10 % de NaCl et la souche RVC15 a été la plus tolérante de tous les rhizobia dans les deux tests de tolérance au NaCl.

3.2.1.2- Effet du NaCl sur les endophytes

Les souches ont présenté une diversité dans leur tolérance au NaCl sur YEM solide (Tableau XXVI, Annexe 12).

Toutes les souches ont pu croître en présence de 5 % et 6 % de NaCl mais à des degrés différents. En effet, 100 % des souches ont présenté une bonne croissance en présence de 5 %. Par ailleurs, 28,9 %, 64,4 % et 17,8 % des souches ont présenté respectivement des croissances faible, moyenne et bonne en présence de 6 % de NaCl.

Au-delà de 8 % de NaCl, seulement trois souches (RVC1, RVC16 et RVC37) soit 7 % des souches ont pu croître faiblement. En revanche, aucune souche n'a pu croître à la concentration de 11 % de NaCl.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XXVI: Croissance des endophytes à différentes concentrations de NaCl sur YEM solide

Souches	Concentration de NaCl (%)							
	0,01	5	6	7	8	9	10	11
RVC1	3+	3+	3+	2+	2+	+	+	-
RVC2	3+	2+	+	-	-	-	-	-
RVC3	3+	3+	2+	-	-	-	-	-
RVC4	3+	3+	2+	-	-	-	-	-
RVC5	3+	3+	+	+	-	-	-	-
RVC7	3+	3+	+	+	-	-	-	-
RVC8	3+	3+	+	-	-	-	-	-
RVC10	3+	3+	+	+	+	-	-	-
RVC14	3+	3+	2+	2+	+	-	-	-
RVC16	3+	3+	2+	2+	2+	+	+	-
RVC17	3+	3+	2+	2+	+	-	-	-
RVC18	3+	3+	2+	+	-	-	-	-
RVC19	3+	3+	2+	+	-	-	-	-
RVC20	3+	3+	2+	2+	+	-	-	-
RVC21	3+	3+	2+	-	-	-	-	-
RVC22	3+	3+	3+	2+	+	-	-	-
RVC24	3+	3+	3+	2+	+	-	-	-
RVC26	3+	3+	+	-	-	-	-	-
RVC29	3+	3+	2+	+	-	-	-	-
RVC30	3+	3+	+	-	-	-	-	-
RVC31	3+	3+	+	+	+	-	-	-
RVC32	3+	3+	+	-	-	-	-	-
RVC35	3+	3+	+	-	-	-	-	-
RVC36	3+	3+	3+	2+	+	-	-	-
RVC37	3+	3+	3+	2+	2+	+	+	-
RVC39	3+	3+	2+	+	-	-	-	-
RVC40	3+	3+	2+	+	+	-	-	-
RVC41	3+	3+	3+	+	-	-	-	-
RVC42	3+	3+	+	+	-	-	-	-
RVC43	3+	3+	2+	+	+	-	-	-
RVC44	3+	3+	2+	2+	+	-	-	-
RVC46	3+	3+	2+	2+	+	-	-	-
RVC48	3+	3+	2+	+	+	-	-	-
RVC49	3+	3+	2+	+	+	-	-	-
RVC51	3+	3+	+	+	+	-	-	-
RVC52	3+	3+	+	+	+	-	-	-
RVC53	3+	3+	+	-	+	-	-	-
RVC54	3+	3+	2+	+	+	-	-	-
RVC55	3+	3+	3+	2+	-	-	-	-
RVC56	3+	3+	+	-	-	-	-	-
RVC57	3+	3+	2+	+	+	-	-	-
RVC59	3+	3+	2+	2+	+	-	-	-
RVC60	3+	3+	3+	2+	+	-	-	-
RVC61	3+	3+	2+	2+	+	-	-	-
RVC62	3+	3+	2+	-	-	-	-	-

- : pas de croissance; + : faible croissance; 2+ : croissance moyenne; 3+ : bonne croissance

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Les tests sur YEM liquide ont montré une variabilité de réponses des souches en présence des différentes concentrations de NaCl testées en fonction des intervalles de temps.

Sur le milieu additionné de 0,01 % de NaCl (témoin), toutes les souches ont pu croître normalement avec des DO > 0,5 (Tableau XXVII). La DO en 24 h a varié de 0,536 pour la souche RVC18 à 1,658 pour la souche RVC42 ; la DO en 48 h a varié de 0,746 pour la souche RVC8 à 1,757 pour la souche RVC42 et la DO en 72 h a varié de 0,745 pour la souche RVC8 à 1,611 pour la souche RVC42. La croissance optimale de 53,3 % des souches a été atteinte en 48h econtre 44,4 % des souches en 72 h. Une seule souche (RVC8) a montré une croissance optimale à 24 h.

Sur le milieu additionné 5 % de NaCl, toutes les souches ont été tolérantes avec des DO \geq 0,5. La croissance de ces dernières n'a pas été véritablement affectée par cette concentration de sel. Cependant, ces souches ont subi des légères baisses de DO comparées à celles obtenues avec leur croissance sur le milieu témoin (Tableau XXVIII).

Sur le milieu additionné 6 % de NaCl, toutes les souches ont été tolérantes avec des DO \geq 0,5 de 48 h à 72 h (Tableau XXIX). En effet, 91,1 % des souches a montré une croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins, ces dernières ont pu se développer de 48 h à 72 h atteignant des DO \geq 0,5 mais avec une croissance affectée négativement. Seulement quatre souches (RVC16, RVC54, RVC57 et RVC62) n'ont pas été véritablement affectées avec des légères baisses de DO. La souche RVC5 a été plus tolérante avec des DO (DO_{24h} = 0,517 ; DO_{48h} = 1,276 ; DO_{72h} = 1,252) qui ont subi de légères baisses comparée aux DO (DO_{24h} = 0,815 ; DO_{48h} = 1,29 ; DO_{72h} = 1,329) obtenues avec la croissance de cette souche sur le milieu témoin. La souche RVC4 a été plus sensible avec des DO (DO_{24h} = 0,23 ; DO_{48h} = 0,556; DO_{72h} = 0,575) qui ont subi de légères baisses comparées aux DO (DO_{24h} = 1,658 ; DO_{48h} = 1,757; DO_{72h} = 1,611) obtenues avec la croissance de cette souche sur le milieu témoin.

Sur le milieu additionné de 7 % de NaCl, une proportion de 66,7 % des souches a été tolérante avec des DO \geq 0,5 de 48 h à 72 h (Tableau XXX). En effet, toutes les souches ont eu leur croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins la majorité des souches a pu se développer de 48 h à 72 h atteignant des DO \geq 0,5 mais avec une croissance affectée négativement. Cependant une proportion de 33,3 % des souches n'a pas pu survivre en affichant des DO < 0,5.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XXVII: Croissance des endophytes exprimée en DO à 0,01 % du NaCl (Témoin) sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24H	48H	72H
RVC1	0,981	1,353	1,343
RVC2	0,932	0,955	1,13
RVC3	0,624	0,981	0,881
RVC4	0,794	0,818	1,018
RVC5	0,815	1,29	1,329
RVC7	1,141	1,228	1,348
RVC8	0,835	0,746	0,746
RVC10	1,283	1,34	1,156
RVC14	0,679	0,891	0,971
RVC16	1,101	1,276	1,416
RVC17	0,651	0,839	0,769
RVC18	0,536	0,845	0,845
RVC19	1,106	1,131	1,201
RVC20	0,952	1,405	1,416
RVC21	1,075	1,307	1,397
RVC22	0,775	1,333	1,033
RVC24	0,885	1,164	1,263
RVC26	0,601	1,416	1,491
RVC29	0,75	0,98	0,973
RVC30	0,787	1,384	1,294
RVC31	0,935	1,626	1,572
RVC32	0,92	1,193	1,393
RVC35	0,939	1,317	1,282
RVC36	1,146	1,274	1,343
RVC37	0,807	1,21	1,062
RVC39	0,99	0,962	1,082
RVC40	1,198	1,49	1,192
RVC41	1,05	1,429	1,097
RVC42	1,658	1,757	1,611
RVC43	1,174	1,386	1,258
RVC44	0,78	0,975	0,856
RVC46	1,175	1,257	1,259
RVC48	1,01	1,099	1,14
RVC49	1,443	1,517	1,282
RVC51	0,839	1,112	1,217
RVC52	1,282	1,3	1,395
RVC53	1,022	1,367	1,134
RVC54	1,296	1,433	1,003
RVC55	1,088	1,225	1,192
RVC56	0,633	0,9	1,04
RVC57	1,181	1,413	1,516
RVC59	1,264	1,511	1,284
RVC60	0,993	1,207	1,196
RVC61	1,273	1,567	1,21
RVC62	1,18	1,469	1,182

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XXVIII: Croissance des endophytes exprimée en DO à 5 % du NaCl sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24H	48H	72H
RVC1	0,781	1,153	1,143
RVC2	0,732	0,755	0,903
RVC3	0,524	0,881	0,781
RVC4	0,518	0,694	0,828
RVC5	0,715	1,19	1,229
RVC7	1,041	1,128	1,248
RVC8	0,535	0,746	0,746
RVC10	1,183	1,24	1,056
RVC14	0,579	0,691	0,871
RVC16	1,001	1,176	1,316
RVC17	0,551	0,739	0,669
RVC18	0,436	0,745	0,845
RVC19	1,006	1,031	1,101
RVC20	0,852	1,305	1,316
RVC21	1,075	1,207	1,297
RVC22	0,675	1,233	0,933
RVC24	0,785	1,064	1,163
RVC26	0,501	1,316	1,391
RVC29	0,75	0,98	0,973
RVC30	0,687	1,284	1,194
RVC31	0,835	1,426	1,472
RVC32	0,82	1,093	1,293
RVC35	0,839	1,217	1,182
RVC36	1,046	1,174	1,243
RVC37	0,707	1,11	0,962
RVC39	0,89	0,962	1,082
RVC40	1,098	1,39	1,092
RVC41	1,075	1,429	1,097
RVC42	1,558	1,657	1,511
RVC43	1,074	1,286	1,158
RVC44	0,68	0,875	0,756
RVC46	1,075	1,157	1,159
RVC48	0,901	0,999	0,914
RVC49	1,343	1,417	1,182
RVC51	0,739	1,012	1,117
RVC52	1,182	1,2	1,295
RVC53	0,922	1,367	1,134
RVC54	1,196	1,333	0,903
RVC55	0,988	1,125	1,092
RVC56	0,533	0,8	1,04
RVC57	1,081	1,313	1,416
RVC59	1,164	1,411	1,184
RVC60	0,893	1,107	1,096
RVC61	1,173	1,467	1,11
RVC62	1,08	1,369	1,082

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XXIX: Croissance des endophytes exprimée en DO à 6 % du NaCl sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24H	48H	72H
RVC1	0,506	0,732	0,827
RVC2	0,394	0,537	0,692
RVC3	0,615	0,845	0,797
RVC4	0,23	0,556	0,575
RVC5	0,517	1,276	1,252
RVC7	0,377	0,605	0,689
RVC8	0,29	0,395	0,513
RVC10	0,483	0,551	0,571
RVC14	0,422	0,623	0,698
RVC16	0,93	0,952	0,934
RVC17	0,518	0,754	0,665
RVC18	0,444	0,357	0,724
RVC19	0,754	0,898	0,926
RVC20	0,896	1,09	1,129
RVC21	0,654	1,21	0,945
RVC22	0,609	1,229	1,01
RVC24	0,711	0,812	1,181
RVC26	0,532	0,697	0,657
RVC29	0,484	0,827	0,893
RVC30	0,536	1,148	0,952
RVC31	0,499	0,684	0,841
RVC32	0,317	0,51	0,408
RVC35	0,43	0,538	0,642
RVC36	0,975	1,119	1,276
RVC37	0,744	1,008	0,879
RVC39	0,825	0,987	1,047
RVC40	0,98	0,994	1,045
RVC41	0,925	1,25	0,952
RVC42	0,304	0,304	0,742
RVC43	0,796	0,996	0,892
RVC44	0,263	0,663	0,583
RVC46	0,998	0,998	1,046
RVC48	0,445	0,555	0,662
RVC49	0,602	0,722	1,024
RVC51	0,679	0,879	0,968
RVC52	0,248	0,248	0,632
RVC53	0,615	0,955	0,741
RVC54	0,975	1,269	0,954
RVC55	0,557	0,866	0,69
RVC56	0,391	0,391	0,99
RVC57	0,94	1,245	1,315
RVC59	0,545	1,245	0,671
RVC60	0,678	1,177	1,037
RVC61	0,667	0,867	0,995
RVC62	0,949	1,204	1,056

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XXX: Croissance des endophytes exprimée en DO à 7 % du NaCl sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24H	48H	72H
RVC1	0,533	0,629	0,796
RVC2	0,3	0,393	0,352
RVC3	0,064	0,128	0,269
RVC4	0,168	0,249	0,228
RVC5	0,17	0,559	0,697
RVC7	0,538	0,679	0,677
RVC8	0,137	0,238	0,251
RVC10	0,2	0,464	0,518
RVC14	0,299	0,519	0,64
RVC16	0,599	0,795	0,692
RVC17	0,069	0,087	0,397
RVC18	0,562	0,559	0,634
RVC19	0,106	0,374	0,349
RVC20	0,324	0,665	0,397
RVC21	0,194	0,369	0,446
RVC22	0,163	0,435	0,651
RVC24	0,188	0,616	0,731
RVC26	0,124	0,348	0,412
RVC29	0,163	0,327	0,502
RVC30	0,196	0,205	0,279
RVC31	0,242	0,505	0,623
RVC32	0,125	0,402	0,419
RVC35	0,253	0,292	0,268
RVC36	0,342	0,582	0,552
RVC37	0,395	0,688	0,496
RVC39	0,344	0,579	0,529
RVC40	0,386	0,583	0,771
RVC41	0,339	0,574	0,551
RVC42	0,135	0,381	0,583
RVC43	0,472	0,552	0,534
RVC44	0,515	0,638	0,703
RVC46	0,215	0,369	0,491
RVC48	0,247	0,541	0,678
RVC49	0,281	0,568	0,632
RVC51	0,149	0,248	0,455
RVC52	0,453	0,55	0,631
RVC53	0,15	0,429	0,528
RVC54	0,338	0,591	0,553
RVC55	0,22	0,257	0,387
RVC56	0,248	0,267	0,387
RVC57	0,5	0,667	0,63
RVC59	0,537	0,833	0,443
RVC60	0,167	0,582	0,427
RVC61	0,429	0,766	0,687
RVC62	0,177	0,299	0,404

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Sur le milieu additionné de 8 % de NaCl, seulement six souches (RVC1, RVC16, RVC17, RVC22, RVC37 et RVC40) ont été tolérantes avec des DO $\geq 0,5$ de 48 h à 72 h (Tableau XXXI). En effet, la majorité des souches a eu sa croissance ralentie pendant les premières 24 h puis n'ont pas pu se développer de 48 h à 72 h en affichant des DO $< 0,5$.

Sur le milieu additionné de 9 % de NaCl, seulement quatre souches (RVC1, RVC16, RVC17 et RVC37) ont été tolérantes avec des DO $\geq 0,55$ de 48 h à 72 h (Tableau XXXII). En effet, une proportion de 73,3 % des souches n'a pas pu se développer de 48 h à 72 h en affichant des DO $< 0,5$.

Sur le milieu additionné de 10 % de NaCl, seule la souche RVC16 a été tolérante avec une DO = 0,502 à 48 h et DO = 0,586 à 48 h (Tableau XXXIII). En effet, une proportion de 97,8 % des souches n'a pas pu se développer de 48 h à 72 h en affichant des DO $< 0,5$.

Dans l'ensemble, les bactéries endophytes associatives ont toléré les fortes concentrations de NaCl. Cependant, la tolérance de souches diminuait avec l'augmentation de la concentration en NaCl quel que soit la nature du milieu. Le seuil de tolérance a été de 10 % de NaCl. En revanche, deux souches (RVC16 et RVC37) ont été plus tolérantes en milieu solide tandis qu'une seule souche (RVC16) a été plus tolérante en milieu liquide.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XXXI: Croissance des endophytes exprimée en DO à 8 % du NaCl sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24H	48H	72H
RVC1	0,109	0,426	0,678
RVC2	0,082	0,252	0,212
RVC3	0,208	0,177	0,157
RVC4	0,16	0,225	0,216
RVC5	0,095	0,22	0,26
RVC7	0,16	0,43	0,366
RVC8	0,117	0,331	0,277
RVC10	0,221	0,313	0,449
RVC14	0,195	0,432	0,444
RVC16	0,544	0,768	0,689
RVC17	0,106	0,612	0,445
RVC18	0,254	0,441	0,449
RVC19	0,05	0,058	0,215
RVC20	0,172	0,264	0,207
RVC21	0,121	0,259	0,294
RVC22	0,205	0,347	0,619
RVC24	0,085	0,096	0,3
RVC26	0,114	0,304	0,367
RVC29	0,11	0,12	0,361
RVC30	0,101	0,139	0,156
RVC31	0,125	0,46	0,482
RVC32	0,104	0,13	0,27
RVC35	0,169	0,206	0,249
RVC36	0,149	0,345	0,417
RVC37	0,107	0,494	0,478
RVC39	0,264	0,321	0,274
RVC40	0,105	0,483	0,583
RVC41	0,212	0,268	0,227
RVC42	0,259	0,428	0,418
RVC43	0,194	0,326	0,219
RVC44	0,315	0,321	0,392
RVC46	0,151	0,3	0,264
RVC48	0,142	0,233	0,358
RVC49	0,093	0,377	0,465
RVC51	0,126	0,229	0,317
RVC52	0,272	0,356	0,327
RVC53	0,131	0,134	0,333
RVC54	0,22	0,344	0,38
RVC55	0,217	0,233	0,305
RVC56	0,108	0,146	0,216
RVC57	0,165	0,319	0,34
RVC59	0,171	0,252	0,462
RVC60	0,174	0,238	0,217
RVC61	0,141	0,436	0,437
RVC62	0,162	0,254	0,355

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XXXII: Croissance des endophytes exprimée en DO à 9 % du NaCl sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)	
	48 h	72 h
RVC1	0,424	0,512
RVC2	0,17	0,245
RVC3	0,189	0,184
RVC4	0,235	0,31
RVC5	0,323	0,33
RVC7	0,22	0,334
RVC8	0,339	0,465
RVC10	0,343	0,429
RVC14	0,256	0,246
RVC16	0,622	0,706
RVC17	0,358	0,513
RVC18	0,273	0,494
RVC19	0,166	0,176
RVC20	0,367	0,321
RVC21	0,187	0,189
RVC22	0,362	0,439
RVC24	0,206	0,24
RVC26	0,282	0,414
RVC29	0,21	0,203
RVC30	0,249	0,256
RVC31	0,208	0,326
RVC32	0,219	0,227
RVC35	0,218	0,224
RVC36	0,441	0,47
RVC37	0,531	0,577
RVC39	0,206	0,223
RVC40	0,197	0,258
RVC41	0,275	0,325
RVC42	0,224	0,301
RVC43	0,306	0,35
RVC44	0,406	0,488
RVC46	0,201	0,257
RVC48	0,328	0,347
RVC49	0,227	0,236
RVC51	0,269	0,326
RVC52	0,329	0,442
RVC53	0,288	0,315
RVC54	0,256	0,408
RVC55	0,26	0,292
RVC56	0,231	0,261
RVC57	0,412	0,42
RVC59	0,38	0,413
RVC60	0,336	0,358
RVC61	0,403	0,455
RVC62	0,275	0,427

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XXXIII: Croissance des endophytes exprimée en DO à 10 % du NaCl sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)	
	48 h	72 h
RVC1	0,424	0,512
RVC2	0,17	0,245
RVC3	0,189	0,184
RVC4	0,235	0,31
RVC5	0,323	0,33
RVC7	0,22	0,334
RVC8	0,339	0,465
RVC10	0,343	0,429
RVC14	0,256	0,246
RVC16	0,622	0,706
RVC17	0,358	0,513
RVC18	0,273	0,494
RVC19	0,166	0,176
RVC20	0,367	0,321
RVC21	0,187	0,189
RVC22	0,362	0,439
RVC24	0,206	0,24
RVC26	0,282	0,414
RVC29	0,21	0,203
RVC30	0,249	0,256
RVC31	0,208	0,326
RVC32	0,219	0,227
RVC35	0,218	0,224
RVC36	0,441	0,47
RVC37	0,531	0,577
RVC39	0,206	0,223
RVC40	0,197	0,258
RVC41	0,275	0,325
RVC42	0,224	0,301
RVC43	0,306	0,35
RVC44	0,406	0,488
RVC46	0,201	0,257
RVC48	0,328	0,347
RVC49	0,227	0,236
RVC51	0,269	0,326
RVC52	0,329	0,442
RVC53	0,288	0,315
RVC54	0,256	0,408
RVC55	0,26	0,292
RVC56	0,231	0,261
RVC57	0,412	0,42
RVC59	0,38	0,413
RVC60	0,336	0,358
RVC61	0,403	0,455
RVC62	0,275	0,427

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.2.2- Effet du pH sur les bactéries nodulaires du pois bambara

3.2.2.1- Effet du pH sur les rhizobia

Les résultats de la tolérance aux différents pH des rhizobia sur YEM solide sont présentés dans le tableau XXXIV et l'annexe 13.

Toutes les souches ont été capables de croître à des pH légèrement acides, neutres et basiques (pH =5 à pH= 11) mais à des tolérances différentes, excepté trois souches (RVC11, RVC13 et RVC28) qui ont été sensibles au pH=11. En effet, sur les milieux à pH basique, 80 % et 20 % des souches ont montré respectivement une croissance moyenne et bonne à pH= 9. Moins de la moitié (33,3 %) et 66,7 % des souches ont montré respectivement des croissances moyenne et faible à pH=10. La plupart (80 %) des souches ont présenté une croissance faible à pH=11 et 20 % des souches y ont été sensibles. Sur les milieux à pH acide, 80 %, 7,6 % et 13,3 % des souches ont présenté respectivement des croissances faible, moyenne et bonne à pH = 5. les souches RVC6 et RVC38 (13,3 %) ont montré une bonne croissance, 33,3 % des souches ont montré une croissance faible au pH = 4 et 46,7 % des souches y ont été sensibles.

Tableau XXXIV: Croissance des rhizobia à différents pH sur milieu solide

Souches	pH					
	4	5	6,8	9	10	11
RVC6	+	2+	3+	2+	2+	+
RVC9	+	+	3+	2+	2+	+
RVC11	-	+	3+	2+	+	-
RVC12	+	+	3+	2+	2+	+
RVC13	2+	3+	3+	2+	+	-
RVC15	-	+	3+	2+	+	+
RVC23	+	+	3+	2+	+	+
RVC25	+	+	3+	2+	2+	+
RVC28	-	+	3+	3+	+	-
RVC33	-	+	3+	2+	+	+
RVC34	-	+	3+	3+	2+	+
RVC38	2+	3+	3+	2+	+	+
RVC45	+	+	3+	2+	+	+
RVC47	-	+	3+	2+	+	+
RVC50	-	+	3+	2+	+	+

- : pas de croissance; + : faible croissance; 2+ : bonne croissance; 3+ : très bonne croissance

Les tests sur YEM liquide ont montré une variabilité de réponses des souches à différents pH testés en fonction des intervalles de temps.

Sur le milieu à pH = 3,5, seules les souches RVC13 et RVC38 ont été tolérantes avec des DO > 0,5 à 48 h. En effet, la croissance de toutes les souches a été affectée comparée, à celle

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

observée sur le milieu témoin (Tableau XXXV). Une proportion de 86,7 % des souches a affiché un faible développement avec des $DO < 0,5$.

Tableau XXXV : Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 3,5, sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24 h	48 h	72 h
RVC6	0,103	0,108	0,187
RVC9	0,1	0,066	0,139
RVC11	0,098	0,094	0,122
RVC12	0,058	0,056	0,113
RVC13	0,301	0,577	0,421
RVC15	0,089	0,102	0,156
RVC23	0,08	0,076	0,18
RVC25	0,057	0,056	0,087
RVC28	0,078	0,071	0,064
RVC33	0,107	0,124	0,266
RVC34	0,111	0,109	0,142
RVC38	0,346	0,607	0,432
RVC45	0,082	0,082	0,243
RVC47	0,093	0,104	0,112
RVC50	0,078	0,097	0,119

Sur le milieu à pH = 4, sept souches (RVC6, RVC9, RVC12, RVC13, RVC23, RVC38 et RVC45) ont été tolérantes avec des $DO \geq 0,5$ de 48 h à 72h. En effet, la majorité des souches (53,3 %) ont eu leur croissance ralentie pendant les premières 24 h puis ont affiché des $DO < 0,5$ de 48 h à 72h.

Tableau XXXVI : Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 4, sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24 h	48 h	72 h
RVC6	0,249	0,499	0,562
RVC9	0,243	0,367	0,557
RVC11	0,324	0,494	0,452
RVC12	0,563	0,578	0,64
RVC13	0,447	9,066	0,661
RVC15	0,255	0,288	0,287
RVC23	0,141	0,663	0,64
RVC25	0,131	0,106	0,249
RVC28	0,106	0,101	0,159
RVC33	0,125	0,248	0,375
RVC34	0,147	0,128	0,23
RVC38	0,537	0,943	0,613
RVC45	0,347	0,613	0,629
RVC47	0,111	0,115	0,264
RVC50	0,09	0,099	0,201

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Sur le milieu à pH = 5, toutes les souches ont été tolérantes avec des DO $\geq 0,5$ de 48 h à 72 h (Tableau XXXVII). En effet, 66,7 % des souches ont eu une croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins, ces dernières ont pu se développer de 48 h à 72 h avec des DO $\geq 0,5$ mais avec une croissance affectée négativement. Seulement cinq souches (RVC6, RVC9, RVC13, RVC38 et RVC45) n'ont pas été véritablement affectées avec des légères baisses de DO. La souche RVC45 a été plus tolérante avec des DO ($DO_{24h}=0,719$; $DO_{48h} = 0,804$; $DO_{72h} = 0,873$) qui ont subi de légères baisses comparées aux DO ($DO_{24h} = 0,821$; $DO_{48h} = 0,983$; $DO_{72h} = 0,989$) obtenues avec la croissance de cette souche sur le milieu témoin. La souche RVC9 a été plus sensible avec des DO ($DO_{24h} = 0,362$; $DO_{48h} = 0,967$; $DO_{72h} = 1,168$) qui ont subi de légères baisses comparées aux DO ($DO_{24h} = 0,655$; $DO_{48h} = 1,485$; $DO_{72h} = 1,485$) obtenues avec la croissance de cette souche sur le milieu témoin.

Tableau XXXVII : Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 5 sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24 h	48 h	72 h
RVC6	0,789	1,099	1,187
RVC9	0,362	0,967	1,168
RVC11	0,424	0,594	0,487
RVC12	0,708	0,678	0,713
RVC13	0,566	1,137	0,877
RVC15	0,344	0,588	0,608
RVC23	0,66	0,763	0,72
RVC25	0,519	0,556	0,568
RVC28	0,476	0,571	0,532
RVC33	0,295	0,548	0,537
RVC34	0,681	0,914	0,852
RVC38	0,701	1,047	0,816
RVC45	0,719	0,804	0,873
RVC47	0,607	0,644	0,686
RVC50	0,586	0,747	0,696

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Sur le milieu additionné à pH = 6,8 (témoin), toutes les souches ont pu croître normalement avec des DO > 0,5 (Tableau XXXVIII). La DO en 24 h a varié de 0,555 pour la souche RVC11 à 1,152 pour la souche RVC12 ; la DO en 48 h a varié de 0,593 pour la souche RVC11 à 1,509 pour la souche RVC25 et la DO en 72 h a varié de 0,639 pour la souche RVC11 à 1,485 pour la souche RVC9. La croissance optimale de 73,3 % des souches a été atteinte en 48h et de 26,7 % des souches en 72 h.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XXXVIII: Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 6,8 (Témoin) sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24 h	48 h	72 h
RVC6	0,627	1,222	1,222
RVC9	0,655	1,485	1,485
RVC11	0,555	0,593	0,636
RVC12	1,152	1,398	1,398
RVC13	0,703	1,276	1,008
RVC15	0,69	1,106	1,002
RVC23	0,634	0,723	1,102
RVC25	1,105	1,509	1,322
RVC28	0,973	1,288	1,146
RVC33	0,979	1,449	1,353
RVC34	0,89	1,429	1,322
RVC38	0,859	1,188	1,036
RVC45	0,821	0,983	0,989
RVC47	1,146	1,241	1,394
RVC50	0,874	0,911	0,835

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Sur le milieu à pH = 9, toutes les souches ont été tolérantes avec des DO > 0,5 de 48 h à 72 h (Tableau XXXIX). En effet, 53,3 % des souches ont eu une croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins ces dernières ont affiché des DO \geq 0,5 de 48 h à 72 h mais avec une croissance affectée négativement. Moins de la moitié des souches (46,7 %) n'ont pas été véritablement affectées avec des légères baisses de DO. La souche RVC45 a été plus tolérante avec des DO (DO_{24h} = 0,735 ; DO_{48h} = 0,948 ; DO_{72h} = 0,964) qui ont subi de légères baisses comparées aux DO (DO_{24h} = 0,821 ; DO_{48h} = 0,983 ; DO_{72h} = 0,989) obtenues avec la croissance de cette souche sur le milieu témoin. La souche RVC6 a été plus sensible avec des DO (DO_{24h} = 0,716 ; DO_{48h} = 0,753 ; DO_{72h} = 0,77) qui ont subi de légères baisses comparée aux DO (DO_{24h} = 0,627 ; DO_{48h} = 1,222; DO_{72h} = 1,222) obtenues avec la croissance de cette souche sur le milieu témoin.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XXXIX: Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 9 sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24 h	48 h	72 h
RVC6	0,716	0,753	0,77
RVC9	0,629	1,259	1,175
RVC11	0,457	0,576	0,63
RVC12	0,967	0,817	0,74
RVC13	0,512	0,616	0,435
RVC15	0,584	0,717	0,699
RVC23	0,59	0,72	0,681
RVC25	1,08	1,316	1,181
RVC28	0,879	1,079	1,069
RVC33	0,905	1,357	1,075
RVC34	0,881	1,31	1,309
RVC38	0,741	0,889	0,826
RVC45	0,735	0,948	0,964
RVC47	1,1	1,161	1,205
RVC50	0,847	0,87	0,848

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Sur le milieu à pH = 10, toutes souches ont été tolérantes avec des DO > 0,5 de 48 h à 72 h excepté la souche RVC13 (Tableau XL). En effet, la majorité des souches (93,3 %) a eu sa croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins ces dernières ont pu se développer de 48 h à 72 h atteignant des DO \geq 0,5 mais avec une croissance affectée négativement.

Tableau XL: Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 10 sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24 h	48 h	72 h
RVC6	0,659	0,669	0,622
RVC9	0,621	0,641	0,936
RVC11	0,466	0,539	0,527
RVC12	0,639	0,713	0,661
RVC13	0,458	0,493	0,351
RVC15	0,6	0,641	0,511
RVC23	0,588	0,643	0,541
RVC25	0,98	1,017	0,811
RVC28	0,542	0,548	0,527
RVC33	0,813	0,878	0,764
RVC34	0,848	1,201	1,231
RVC38	0,653	0,933	0,874
RVC45	0,685	0,73	0,663
RVC47	0,659	0,714	0,659
RVC50	0,507	0,804	0,629

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Sur le milieu à pH =11, la majorité des souches ont été tolérantes avec des DO \geq 0,5 de 48 h à 72 h excepté la souche RVC13 (Tableau XLI). En effet, plus de la moitié des souches (60 %) ont eu leur croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins, ces dernières ont affiché des DO \geq 0,5 mais avec une croissance affectée négativement. En outre, six souches (RVC11, RVC12, RVC13, RVC28, RVC45 et RVC47) n'ont pas survécu à cette alcalinité.

Tableau XLI: Croissance des rhizobia exprimée en DO à pH= 11 sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24 h	48 h	72 h
RVC6	0,659	0,669	0,622
RVC9	0,621	0,641	0,936
RVC11	0,466	0,539	0,527
RVC12	0,639	0,713	0,661
RVC13	0,458	0,493	0,351
RVC15	0,6	0,641	0,511
RVC23	0,588	0,643	0,541
RVC25	0,98	1,017	0,811
RVC28	0,542	0,548	0,527
RVC33	0,813	0,878	0,764
RVC34	0,848	1,201	1,231
RVC38	0,653	0,933	0,874
RVC45	0,685	0,73	0,663
RVC47	0,659	0,714	0,659
RVC50	0,507	0,804	0,629

Dans l'ensemble, les rhizobia ont plus toléré pH alcalins que pH acides quel que soit la nature du milieu de culture. En revanche, six souches (RVC6, RVC9, RVC12, RVC23, RVC25, RVC38) ont montré une large gamme de tolérance en milieu solide. Alors que quatre souches (RVC6, RVC9, RVC23, RVC38) en ont montré en milieu liquide. Ces souches ont supporté mieux à la fois les milieux alcalins et les milieux acides. Elles ont pu croître de pH = 4 à pH = 11. Par ailleurs, seules les souches RVC13 et RVC38 ont été tolérantes à pH = 3,5.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.2.2.2- Effet du pH sur les endophytes

Les résultats de la tolérance aux différents pH des endophytes sur YEM solide sont présentés dans le tableau XLII et l'annexe 13.

Toutes les souches ont été capables de croître à des pH légèrement acides, neutres et basiques (pH = 5 à pH= 11) mais avec des tolérances différentes, excepté deux souches (RVC19 et RVC29) qui ont été sensibles au pH=11. En effet, sur les milieux à pH basique, 26,7 %, 57,8 % et 15,5 % des souches ont présenté respectivement des croissances faible, moyenne et bonne à pH=9. Aussi, 80 % et 20 % des souches ont montré respectivement des croissances faibles et moyennes à pH = 10. Les proportions de 91 % et 4,5 % des souches ont présenté respectivement des croissances faibles et moyennes à pH=10 et 4,5 % des souches y ont été sensibles.

Sur les milieux à pH acide, 68,8 %, 26,7 % et 4,5 % ont présenté respectivement des croissances faibles, moyennes et bonnes à pH=5. Les proportions de 11 % et de 49 % des souches ont montré respectivement des croissances moyenne et faible à pH = 4 alors que 40 % des souches y ont été sensibles.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XLII : Croissance des endophytes nodulaires à différents pH sur milieu solide

Souches	pH					
	4	5	6,8	9	10	11
RVC1	2+	2+	3+	2+	+	+
RVC2	2+	3+	3+	2+	+	+
RVC3	+	+	3+	2+	+	+
RVC4	+	+	3+	+	+	+
RVC5	+	+	3+	+	+	+
RVC7	+	+	3+	2+	+	+
RVC8	+	+	3+	2+	+	+
RVC10	+	+	3+	2+	+	+
RVC14	+	+	3+	3+	2+	+
RVC16	2+	3+	3+	+	+	+
RVC17	+	+	3+	2+	+	+
RVC18	-	+	3+	2+	+	+
RVC19	-	-	3+	+	+	-
RVC20	2+	2+	3+	2+	2+	+
RVC21	2+	2+	3+	3+	+	+
RVC22	-	2+	3+	2+	+	+
RVC24	-	+	3+	3+	+	+
RVC26	-	+	3+	3+	+	+
RVC29	+	2+	3+	3+	2+	-
RVC30	+	2+	3+	3+	2+	2+
RVC31	-	+	3+	+	+	+
RVC32	-	+	3+	2+	2+	2+
RVC35	-	2+	3+	2+	2+	+
RVC36	+	+	3+	2+	+	+
RVC37	-	+	3+	+	+	+
RVC39	+	+	3+	2+	+	+
RVC40	+	2+	3+	+	+	+
RVC41	+	2+	3+	3+	+	+
RVC42	-	+	3+	2+	+	+
RVC43	-	+	3+	2+	+	+
RVC44	-	+	2+	+	+	+
RVC46	-	+	3+	2+	+	+
RVC48	-	+	3+	+	+	+
RVC49	+	2+	3+	2+	+	+
RVC51	+	+	3+	2+	+	+
RVC52	+	+	3+	+	+	+
RVC53	+	+	3+	2+	+	+
RVC54	-	2+	3+	2+	+	+
RVC55	+	+	3+	2+	+	+
RVC56	+	2+	3+	+	+	+
RVC57	-	+	3+	2+	2+	+
RVC59	+	+	3+	2+	+	+
RVC60	-	-	3+	+	+	+
RVC61	-	+	3+	2+	2+	+
RVC62	+	+	3+	2+	2+	+

- : pas de croissance; + : faible croissance; 2+ : croissance moyenne; 3+ : bonne croissance

Les tests sur YEM liquide ont montré une variabilité de réponses des souches à différents pH testés en fonction des intervalles de temps.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Sur le milieu à pH = 3,5, seule la souche RVC2 a été tolérante avec des DO = 0,611 en 72 h. En effet une proportion de 97,8 % des souches n'a pas pu se développer en affichant des DO < 0,5 (Tableau XXLIII).

Sur le milieu à pH = 4, plus de la moitié des souches (57,8 %) a été tolérante avec des DO \geq 0,5 de 48 h à 72 h (Tableau XXLIV). En effet, 42,2 % des souches ont eu leur croissance ralentie pendant les premières 24 h puis n'ont pas pu se développer de 48 h à 72 h en affichant des DO < 0,5.

Sur le milieu à pH = 5, toutes les souches ont été tolérantes avec des DO > 0,5 de 48 h à 72 h excepté les souches RVC19 et RVC60 (Tableau XXLV). En effet, la majorité des souches (95,6 %) a eu sa croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins ces dernières ont pu se développer de 48 h à 72 h atteignant des DO \geq 0,5 mais avec une croissance faible.

Sur le milieu à pH = 6,8 (témoin), toutes les souches ont pu croître normalement avec des DO > 0,5 (Tableau XXLVI). La DO en 24 h a varié de 0,536 pour la souche RVC18 à 1,658 pour la souche RVC42 ; la DO en 48 h a varié de 0,746 pour la souche RVC8 à 1,757 pour la souche RVC42 et la DO en 72 h a varié de 0,745 pour la souche RVC8 à 1,611 pour la souche RVC42. La croissance optimale de 53,3 % des souches a été atteinte en 48h econtre 44,4 % des souches en 72 h. Une seule souche (RVC8) a montré une croissance optimale à 24 h.

Sur le milieu à pH = 9, toutes les souches ont été tolérantes avec des DO > 0,5 de 48 h à 72 h (Tableau XXLVII). En effet, 8,9 % des souches ont eu une croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins ces dernières ont pu se développer de 48 h à 72 h atteignant des DO \geq 0,5 mais avec une croissance faible. 91,1 % des souches n'ont pas été véritablement affectées avec des légères baisses de DO. La souche RVC43 a été plus tolérante avec des DO (DO_{24h} = 1,165; DO_{48h} = 1,386 ; DO_{72h} = 1,258) qui ont subi de légères baisses comparées aux DO (DO_{24h} = 1,174; DO_{48h} = 1,455 ; DO_{72h} = 1,374) obtenues avec la croissance de cette souche sur le milieu témoin. La souche RVC39 a été plus sensible avec des DO (DO_{24h} = 0,558 ; DO_{48h} = 0,68 ; DO_{72h} = 0,562) qui ont subi de légères baisses comparée aux DO (DO_{24h}=0,962 ; DO_{48h} = 0,99; DO_{72h} = 1,082) obtenues avec la croissance de cette souche sur le milieu témoin.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XLIII: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 3,5 sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24H	48H	72H
RVC1	0,117	0,122	0,248
RVC2	0,14	0,231	0,611
RVC3	0,097	0,195	0,095
RVC4	0,087	0,082	0,132
RVC5	0,093	0,072	0,146
RVC7	0,112	0,137	0,249
RVC8	0,097	0,178	0,098
RVC10	0,12	0,263	0,179
RVC14	0,09	0,086	0,188
RVC16	0,101	0,122	0,128
RVC17	0,082	0,086	0,171
RVC18	0,079	0,124	0,075
RVC19	0,044	0,051	0,095
RVC20	0,082	0,073	0,121
RVC21	0,128	0,122	0,235
RVC22	0,102	0,113	0,231
RVC24	0,107	0,106	0,184
RVC26	0,08	0,065	0,1
RVC29	0,096	0,144	0,195
RVC30	0,119	0,121	0,22
RVC31	0,122	0,121	0,193
RVC32	0,102	0,095	0,192
RVC35	0,102	0,113	0,202
RVC36	0,081	0,085	0,164
RVC37	0,077	0,114	0,102
RVC39	0,099	0,124	0,234
RVC40	0,106	0,141	0,246
RVC41	0,109	0,111	0,177
RVC42	0,076	0,169	0,093
RVC43	0,057	0,097	0,063
RVC44	0,041	0,044	0,055
RVC46	0,066	0,081	0,131
RVC48	0,102	0,265	0,12
RVC49	0,128	0,124	0,173
RVC51	0,115	0,127	0,219
RVC52	0,119	0,2	0,124
RVC53	0,118	0,24	0,142
RVC54	0,061	0,113	0,074
RVC55	0,124	0,14	0,25
RVC56	0,148	0,183	0,227
RVC57	0,102	0,108	0,17
RVC59	0,066	0,067	0,276
RVC60	0,13	0,17	0,285
RVC61	0,104	0,199	0,11
RVC62	0,131	0,226	0,145

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XLIV: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 4 sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24H	48H	72H
RVC1	0,615	0,621	0,675
RVC2	0,522	0,649	0,746
RVC3	0,134	0,638	0,564
RVC4	0,157	0,351	0,519
RVC5	0,461	0,523	0,519
RVC7	0,496	0,508	0,565
RVC8	0,306	0,496	0,468
RVC10	0,599	0,918	0,572
RVC14	0,338	0,435	0,513
RVC16	0,593	0,679	1,1
RVC17	0,346	0,536	0,554
RVC18	0,225	0,419	0,433
RVC19	0,065	0,076	0,097
RVC20	0,621	0,773	0,884
RVC21	0,486	1,025	1,054
RVC22	0,165	0,179	0,275
RVC24	0,187	0,195	0,291
RVC26	0,081	0,084	0,192
RVC29	0,101	0,152	0,202
RVC30	0,392	0,587	0,642
RVC31	0,101	0,193	0,196
RVC32	0,122	0,15	0,466
RVC35	0,107	0,145	0,205
RVC36	0,31	0,421	0,557
RVC37	0,211	0,409	0,402
RVC39	0,224	0,441	0,654
RVC40	0,114	0,503	0,549
RVC41	0,183	0,604	0,549
RVC42	0,102	0,229	0,206
RVC43	0,077	0,105	0,094
RVC44	0,062	0,076	0,061
RVC46	0,089	0,367	0,25
RVC48	0,495	0,503	0,415
RVC49	0,244	0,543	0,575
RVC51	0,474	0,601	0,63
RVC52	0,531	0,589	0,597
RVC53	0,421	0,633	0,522
RVC54	0,092	0,116	0,098
RVC55	0,517	0,634	0,595
RVC56	0,479	0,614	0,738
RVC57	0,101	0,103	0,198
RVC59	0,349	0,476	0,565
RVC60	0,233	0,287	0,336
RVC61	0,22	0,312	0,223
RVC62	0,216	0,697	0,296

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XLV: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 5 sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24H	48H	72H
RVC1	0,749	0,821	0,925
RVC2	0,687	0,749	0,838
RVC3	0,161	0,886	0,638
RVC4	0,205	0,351	0,759
RVC5	0,631	0,723	0,892
RVC7	0,702	0,808	0,904
RVC8	0,559	0,687	0,687
RVC10	0,651	0,918	0,612
RVC14	0,655	0,735	0,624
RVC16	0,708	0,879	1,106
RVC17	0,598	0,696	0,577
RVC18	0,424	0,65	0,643
RVC19	0,077	0,086	0,282
RVC20	0,657	0,872	0,992
RVC21	0,782	1,035	1,087
RVC22	0,466	0,579	0,514
RVC24	0,723	0,795	0,872
RVC26	0,347	0,674	0,746
RVC29	0,668	0,802	0,922
RVC30	0,656	0,787	0,774
RVC31	0,541	0,793	0,948
RVC32	0,708	0,85	0,645
RVC35	0,625	0,903	1,195
RVC36	0,465	0,521	0,629
RVC37	0,493	0,699	0,517
RVC39	0,574	0,641	0,722
RVC40	0,572	0,703	0,671
RVC41	0,568	0,804	0,733
RVC42	0,584	0,829	0,732
RVC43	0,486	0,705	0,603
RVC44	0,282	0,66	0,63
RVC46	0,502	0,567	0,551
RVC48	0,611	0,703	0,601
RVC49	0,765	0,993	0,947
RVC51	0,761	0,851	1,104
RVC52	0,685	0,689	0,758
RVC53	0,664	0,833	0,741
RVC54	0,664	0,898	0,694
RVC55	0,801	0,895	0,855
RVC56	0,638	0,784	0,873
RVC57	0,634	0,903	1,04
RVC59	0,638	0,777	0,508
RVC60	0,425	0,487	0,419
RVC61	0,735	0,812	0,553
RVC62			

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XLVI: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 6,8 (Témoin) sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24H	48H	72H
RVC1	0,981	1,353	1,343
RVC2	0,932	0,955	1,13
RVC3	0,624	0,981	0,881
RVC4	0,794	0,818	1,018
RVC5	0,815	1,29	1,329
RVC7	1,141	1,228	1,348
RVC8	0,835	0,746	0,746
RVC10	1,283	1,34	1,156
RVC14	0,679	0,891	0,971
RVC16	1,101	1,276	1,416
RVC17	0,651	0,839	0,769
RVC18	0,536	0,845	0,845
RVC19	1,106	1,131	1,201
RVC20	0,952	1,405	1,416
RVC21	1,075	1,307	1,397
RVC22	0,775	1,333	1,033
RVC24	0,885	1,164	1,263
RVC26	0,601	1,416	1,491
RVC29	0,75	0,98	0,973
RVC30	0,787	1,384	1,294
RVC31	0,935	1,626	1,572
RVC32	0,92	1,193	1,393
RVC35	0,939	1,317	1,282
RVC36	1,146	1,274	1,343
RVC37	0,807	1,21	1,062
RVC39	0,99	0,962	1,082
RVC40	1,198	1,49	1,192
RVC41	1,05	1,429	1,097
RVC42	1,658	1,757	1,611
RVC43	1,174	1,386	1,258
RVC44	0,78	0,975	0,856
RVC46	1,175	1,257	1,259
RVC48	1,01	1,099	1,14
RVC49	1,443	1,517	1,282
RVC51	0,839	1,112	1,217
RVC52	1,282	1,3	1,395
RVC53	1,022	1,367	1,134
RVC54	1,296	1,433	1,003
RVC55	1,088	1,225	1,192
RVC56	0,633	0,9	1,04
RVC57	1,181	1,413	1,516
RVC59	1,264	1,511	1,284
RVC60	0,993	1,207	1,196
RVC61	1,273	1,567	1,21
RVC62	1,18	1,469	1,182

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XLVII: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 9 sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24H	48H	72H
RVC1	0,967	1,22	1,206
RVC2	0,914	0,93	1,048
RVC3	0,639	0,765	0,74
RVC4	0,702	0,857	0,948
RVC5	0,747	1,236	1,319
RVC7	1,081	1,09	1,085
RVC8	0,998	1,39	1,273
RVC10	1,254	1,318	1,141
RVC14	0,941	1,176	1,17
RVC16	0,969	1,187	1,387
RVC17	0,651	0,703	0,661
RVC18	0,577	0,647	0,542
RVC19	0,597	0,547	0,587
RVC20	0,982	1,21	1,295
RVC21	0,912	0,971	1,006
RVC22	0,864	1,138	0,897
RVC24	0,801	1,022	1,045
RVC26	0,631	1,357	1,419
RVC29	0,783	0,96	0,965
RVC30	0,495	1,364	1,252
RVC31	0,526	0,714	1,342
RVC32	0,909	1,133	1,224
RVC35	0,83	1,316	1,12
RVC36	0,512	0,748	0,803
RVC37	0,804	0,984	0,956
RVC39	0,558	0,68	0,562
RVC40	0,643	1,084	1,023
RVC41	0,741	1,071	1,063
RVC42	0,693	1,007	0,914
RVC43	1,165	1,455	1,374
RVC44	0,579	0,858	0,782
RVC46	1,287	1,332	1,402
RVC48	1,159	1,35	1,187
RVC49	1,106	1,134	1,075
RVC51	1,097	1,38	1,243
RVC52	1,063	1,215	1,251
RVC53	1,07	1,293	1,287
RVC54	1,153	1,365	1,277
RVC55	0,895	1,201	1,162
RVC56	1,149	1,376	1,27
RVC57	1,126	1,349	1,313
RVC59	0,736	1,222	1,141
RVC60	0,541	0,786	0,809
RVC61	0,923	0,901	0,845
RVC62	0,76	0,859	0,89

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Sur le milieu à pH = 10, toutes les souches ont été tolérantes avec des DO \geq 0,5 de 48 h à 72 h (Tableau XXLVIII). En effet, les souches ont eu leur croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins, ces dernières ont pu se développer de 48 h à 72 atteignant des DO \geq 0,5 mais avec une croissance affectée négativement.

Sur le milieu à pH = 11, 93,3 % des souches ont été tolérantes avec des DO \geq 0,5 de 48 h à 72 h (Tableau XXLIV). En effet, toutes les souches ont exhibé croissance ralentie pendant les premières 24 h. Néanmoins, la majorité des souches a pu se de 48 h à 72 h atteignant des DO \geq 0,5 mais avec une croissance faible. Cependant trois souches (RVC19, RVC39 et RVC60,) n'ont pas survécu en affichant des DO $<$ 0,5.

Dans l'ensemble, les endopytes ont plus toléré pH alcalins que pH acides quel que soit la nature du milieu de culture. Toutefois, sept souches (RVC1, RVC2, RVC16, RVC20, RVC21, RVC29 et RVC30) ont montré une large gamme de tolérance en milieu solide comme en milieu liquide. Ces dernières ont supporté mieux à la fois les milieux alcalins et les milieux acides. Elles ont pu croître de pH = 4 à pH = 11. Par ailleurs, seule la souche RVC2 a été tolérante à pH = 3,5.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XLVIII: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 10 sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24H	48H	72H
RVC1	0,605	0,785	0,811
RVC2	0,766	0,818	0,699
RVC3	0,612	0,696	0,635
RVC4	0,695	0,752	0,93
RVC5	0,808	1,04	0,997
RVC7	0,748	0,749	0,736
RVC8	0,703	0,742	0,629
RVC10	0,718	0,572	0,538
RVC14	0,684	0,8	0,847
RVC16	1,031	1,242	1,31
RVC17	0,564	0,539	0,488
RVC18	0,597	0,702	0,597
RVC19	0,528	0,509	0,375
RVC20	0,947	1,181	1,281
RVC21	0,599	0,602	0,644
RVC22	0,92	0,79	0,698
RVC24	0,744	0,929	0,99
RVC26	0,605	0,801	0,661
RVC29	0,525	0,661	0,776
RVC30	0,63	0,694	1,17
RVC31	0,611	0,872	0,968
RVC32	0,928	1,281	1,134
RVC35	0,806	1,211	1,173
RVC36	0,546	0,533	0,521
RVC37	0,718	0,946	0,936
RVC39	0,494	0,525	0,508
RVC40	0,549	0,61	0,534
RVC41	0,711	0,99	0,951
RVC42	0,753	0,705	0,602
RVC43	0,945	1,232	1,229
RVC44	0,683	0,892	0,808
RVC46	1,163	1,302	1,137
RVC48	0,871	0,953	1,015
RVC49	0,982	1,013	1,1
RVC51	0,705	1,034	1,14
RVC52	0,68	0,711	0,67
RVC53	0,618	1,009	1,025
RVC54	1,09	1,252	1,243
RVC55	0,652	0,687	0,661
RVC56	0,601	0,826	0,978
RVC57	1,126	1,349	1,313
RVC59	0,992	1,206	1,223
RVC60	0,618	0,77	0,546
RVC61	0,973	0,895	0,784
RVC62	0,509	0,713	0,792

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XLIX: Croissance des endophytes exprimée en DO à pH= 11 sur YEM liquide

Souches	Densité optique (DO)		
	24H	48H	72H
RVC1	0,591	0,747	0,764
RVC2	0,692	0,679	0,614
RVC3	0,611	0,634	0,616
RVC4	0,683	0,772	0,836
RVC5	0,811	0,831	0,706
RVC7	0,5	0,764	0,681
RVC8	0,319	0,602	0,582
RVC10	0,558	0,59	0,539
RVC14	0,603	0,753	0,652
RVC16	0,769	0,989	0,839
RVC17	0,687	0,619	0,542
RVC18	0,841	0,751	0,666
RVC19	0,083	0,096	0,166
RVC20	0,619	0,659	0,697
RVC21	0,446	0,518	0,655
RVC22	0,525	0,654	0,654
RVC24	0,469	0,587	0,595
RVC26	0,418	0,651	0,572
RVC29	0,474	0,524	0,528
RVC30	0,449	0,622	1,106
RVC31	0,342	1,196	1,266
RVC32	0,584	0,709	0,707
RVC35	0,758	1,031	1,074
RVC36	0,145	0,612	0,65
RVC37	0,507	0,634	0,85
RVC39	0,356	0,488	0,473
RVC40	0,499	0,544	0,549
RVC41	0,634	0,645	0,589
RVC42	0,939	1,033	1,007
RVC43	0,917	1,038	1,092
RVC44	0,587	0,539	0,533
RVC46	0,933	1,04	0,944
RVC48	0,648	0,634	0,645
RVC49	0,621	1,025	0,962
RVC51	0,591	0,708	0,693
RVC52	0,583	0,661	0,663
RVC53	0,977	0,987	0,909
RVC54	1,047	1,197	1,131
RVC55	0,622	0,6	0,617
RVC56	0,731	0,721	0,731
RVC57	1,073	1,24	1,177
RVC59	0,742	0,739	0,708
RVC60	0,455	0,515	0,519
RVC61	0,645	0,671	0,594
RVC62	0,59	0,675	0,638

NB : les DO > 1 ont été multipliées par un facteur de dilution

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.2.3- Effet de la température sur les bactéries nodulaires du pois bambara

3.2.3.1- Effet de la température sur les rhizobia

Ces souches ont montré des réponses variables vis-à-vis des températures testées (Tableau L, Annexe 14).

Moins de la moitié des souches (26,6 %) ont été tolérantes avec une croissance faible à +4 °C. La majorité des souches (73,4 %) y ont été sensibles .

Toutes les souches ont pu croître à une température de 35 °C mais avec des Tolérances différentes. En effet, 46,7 % et 53,3 % des souches ont présenté respectivement des croissances bonnes et moyennes à cette température.

Toutes les souches ont été tolérantes à 40 °C excepté la souche RVC9 qui y a été sensible. En effet, 93,3 % des souches se sont développées à cette température mais à des degrés différents. Les souches ont présenté des croissances faibles, moyennes et bonnes respectivement aux taux de 20 %, 46,7 % et 26,6 % .

Une seule souche RVC12, 26,6 % et 33,3 % des souches ont présenté des croissances bonne moyennes et faibles alors que 33,3 % des souches n' ont pu croître à 45 °C.

Au-delà de 45 °C, plus de la moitié des souches (58 %) ont été sensibles. Uniquement la souche RVC12 a survécu avec une croissance moyenne à 55 °C.

Dans l'ensemble, les rhizobia ont présenté une bonne thermotolérance. Les souches RVC12, RVC15, RVC25, RVC38 et RVC45 ont présenté une large gamme de tolérance. Elles ont pu croître de 4 à 50 °C. Toutefois, la souche RVC12 reste la seule qui a pu croître de 28 à 55 °C.

Tableau L : Croissance des rhizobia à différentes températures sur milieu solide

Souches	Température (° C)						
	4	28	35	40	45	50	55
RVC6	+	3+	3+	3+	2+	-	-
RVC9	+	3+	2+	-	-	-	-
RVC11	-	3+	2+	2+	+	+	-
RVC12	-	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC13	-	3+	3+	2+	+	-	-
RVC15	+	3+	3+	2+	2+	+	-
RVC23	+	3+	2+	2+	+	-	-
RVC25	+	3+	3+	2+	2+	+	-
RVC28	+	3+	2+	+	-	-	-
RVC33	+	3+	3+	2+	+	-	-
RVC34	+	3+	3+	2+	2+	-	-
RVC38	+	3+	3+	3+	2+	+	-
RVC45	+	3+	3+	2+	2+	+	-
RVC47	+	3+	2+	+	-	-	-
RVC50	+	3+	2+	+	-	-	-

- : pas de croissance; + : faible croissance; 2+ : croissance moyenne; 3+ : bonne croissance

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.2.3.2- Effet de la température sur les endophytes

Les réponses des souches endophytiques aux différentes températures testées sont consignées dans le tableau LI et Annexe 14.

Moins de la moitié (43 %) des souches ont été tolérantes avec une croissance faible à 4 °C. la majorité (67 %) des souches y ont été sensibles.

La quasi-totalité des souches a pu croître à une température de 35 °C mais à des degrés différents. En effet, 8,9 %, 17,8 % et 173,3 % des souches ont présenté respectivement des croissances faibles, moyennes et bonnes à cette température.

Toutes les souches ont été tolérantes à 40 °C excepté trois souches (RVC3, RVC21 et RVC31) qui y ont été sensibles. En effet, 93,3 % des souches se sont développées à cette température mais avec des tolérances différentes. Les proportions de 7,3 %, 33,3 % et 53,3 % des souches ont présenté respectivement des croissances faible, moyenne et bonne. Les taux de 26,7 %, 33,3 % et 22,2 % des souches ont présenté respectivement des croissances bonne, moyenne, et faible à 45 °C. Seulement 17,8 % des souches n' y ont pu croître.

Au-delà de 45 °C, 73,3 % des souches ont été sensibles. Douze souches (26,7 %) ont survécu avec 22,2 % et 4,5 % des souches ayant montré respectivement des croissances moyennes et faibles à 55 °C.

Dans l'ensemble, les endophytes ont présenté une bonne thermotolérance. Les souches RVC1, RVC7, RVC8, RVC34, RVC55, RVC60 et RVC62 ont présenté une large gamme de tolérance. Elles ont pu croître de +4 à 55 °C.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau LI : Croissance des endophytes à différentes températures sur milieu solide

Souches	Température (°)						
	4	28	35	40	45	50	55
RVC1	+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC2	-	3+	3+	3+	2+	-	-
RVC3	-	3+	+	-	-	-	-
RVC4	-	3+	2+	+	-	-	-
RVC5	-	3+	3+	2+	+	-	-
RVC7	+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC8	+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC10	-	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC14	-	3+	3+	2+	2+	-	-
RVC16	+	3+	2+	2+	-	-	-
RVC17	+	3+	+	+	2+	+	-
RVC18	-	3+	3+	3+	2+	+	-
RVC19	-	3+	3+	3+	+	-	-
RVC20	-	3+	3+	3+	2+	-	-
RVC21	+	3+	2+	-	-	-	-
RVC22	+	3+	3+	2+	+	-	-
RVC24	-	3+	3+	3+	2+	+	-
RVC26	-	3+	3+	3+	3+	-	-
RVC29	+	3+	3+	3+	-	-	-
RVC30	+	3+	3+	3+	-	-	-
RVC31	-	3+	3+	3+	+	-	-
RVC32	-	3+	2+	-	-	-	-
RVC35	+	3+	+	3+	2+	+	-
RVC36	-	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC37	-	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC39	-	3+	2+	2+	+	-	-
RVC40	-	3+	2+	2+	+	-	-
RVC41	-	3+	2+	2+	2+	+	-
RVC42	-	3+	3+	3+	3+	-	-
RVC43	-	3+	3+	2+	2+	+	+
RVC44	-	2+	3+	2+	2+	+	+
RVC46	-	3+	+	3+	3+	2+	2+
RVC48	-	3+	3+	2+	2+	-	-
RVC49	+	3+	3+	2+	+	+	-
RVC51	+	3+	3+	2+	-	-	-
RVC52	-	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC53	+	3+	3+	2+	+	+	-
RVC54	+	3+	3+	2+	+	+	-
RVC55	+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC56	+	3+	2+	+	+	-	-
RVC57	+	3+	3+	3+	2+	+	-
RVC59	-	3+	3+	2+	+	+	-
RVC60	+	3+	3+	3+	2+	+	+
RVC61	+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC62	+	3+	3+	3+	2+	-	-

- : pas de croissance; + : faible croissance; 2+ : croissance moyenne; 3+ : très bonne croissance

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.2.4- Effet des engrais sur les bactéries nodulaires du pois bambara

3.2.4.1- Effet des engrais sur les rhizobia

L'effet de six engrais chimiques a été mis en évidence sur la survie des souches isolées du pois bambara (Tableau LII).

Toutes les souches ont été capables de croître aux deux doses d'Urée, de Nutrigofol et de Fertileg puis à la moitié des doses recommandées de KNO_3 et de LDC mais à des degrés différents. En effet, toutes les souches ont présenté une bonne croissance excepté la souche *Rhizobium leguminosarum* L01 qui a montré une faible croissance sur le milieu additionné de la moitié de la dose recommandée (0,15 %) de l'urée. Tandis que 61,1 % des souches en ont montré sur le milieu additionné de la dose recommandée (0,3 %) de l'urée. La majorité (77,8 %) des souches a montré une bonne croissance sur le milieu additionné de la moitié de la dose recommandée (5 μ L/mL) de Nutrigofol contre 61,1 % des souches sur le milieu additionné de la dose recommandée (10 μ L/mL) de cet engrais. Toutes les souches ont présenté une bonne croissance excepté les souches RVC12 et RVC45 qui ont montré une croissance moyenne sur le milieu additionné de la moitié de la dose recommandée (5 μ L/mL) de Fertileg. Par contre, une proportion réduite (72,2 %) des souches a pu croître sur le milieu additionné de la dose recommandée (10 μ L/mL) de ce dernier. Toutes les souches ont présenté une bonne croissance excepté les souches (RVC47 et RVC9) et la souche RVC12 qui ont présenté respectivement une croissance moyenne et une croissance faible sur le milieu additionné de la moitié de la dose recommandée (0,205 %) de LDC. La majorité (77,8 %) des souches a manifesté une bonne croissance sur le milieu additionné de la dose recommandée (0,05 %) de KNO_3 .

Les doses recommandées de LDC, KNO_3 et les deux doses de $NaNO_2$ ont été toxiques pour quelques souches. En effet, la souche RVC12 a été sensible sur le milieu additionné de la dose recommandée de LDC. La souche RVC50 a été sensible sur le milieu additionné de la dose recommandée de KNO_3 . Deux souches (RVC12 et RVC50) ont été sensibles sur le milieu additionné de la moitié de la dose recommandée de $NaNO_2$ contre cinq souches (RVC12, RVC13, RVC33, RVC34 et RVC50) le milieu additionné de la dose recommandée de cet engrais.

La tolérance des rhizobia aux différents engrais testés a varié en fonction de la formulation et de la concentration utilisée. La majorité des souches se sont bien développées en présence des différents engrais testés. Cependant, les souches RVC12 et RVC50 ont été les plus sensibles et le $NaNO_2$ a été le plus toxique des engrais testés.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau LII : Croissance des rhizobia à la dose normale et à la ½ dose des engrais testés

Souches	Engrais											
	UB (%)		LDC(%)		NG (µL/ml)		FL (µL/ml)		KNO ₃ (%)		NaNO ₂ (%)	
	0,15	0,3	0,205	0,41	5	10	5	10	0,025	0,05	0,025	0,05
RVC6	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC9	3+	2+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC11	3+	3+	3+	2+	3+	2+	3+	3+	2+	2+	3+	3+
RVC12	3+	3+	+	-	+	+	2+	2+	+	+	-	-
RVC13	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	-
RVC15	3+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	3+	3+	+	+
RVC23	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	3+	3+	3+	3+
RVC25	3+	2+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC28	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	+	+
RVC33	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	2+	+	-
RVC34	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	-
RVC38	3+	3+	3+	-	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	+
RVC45	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+
RVC47	3+	3+	2+	+	2+	2+	3+	+	2+	3+	3+	2+
RVC50	3+	2+	3+	3+	2+	2+	3+	3+	3+	-	-	-
L01	+	+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
STM	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
M 1021	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
Témoin	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+

UB : Urée ; FI : Fertileg ; Ng : Nutrifol ; KNO₃ : Nitrate de sodium ; NaNO₂ : Nitrite de sodium ; LDC : urée rouge, - : pas de croissance; + : faible croissance; 2+ : croissance moyenne; 3+ : bonne croissance.

3.2.4.2- Effet des engrais sur les endophytes

L'impact de six engrais chimiques a été mis en évidence sur la viabilité des souches d'endophytes isolées du pois bambara (Tableau LIII).

La majorité des souches a été capable de croître aux deux doses testées des différents engrais mais à des degrés différents.

En effet, sur l'ensemble des souches, 95,5 % ont pu croître dont 88,9 % ont présenté une bonne croissance et deux souches (RVC36 et RVC37) n'ont survécu sur le milieu additionné de la moitié de la dose recommandée (0,15 %) de l'urée. Ces mêmes résultats ont été observés sur le milieu additionné de la dose recommandée (0,3 %) de l'urée sauf que le taux des souches ayant une bonne croissance a diminué légèrement de 88,9 à 84,4 %. Sur un total de 95,5 % de souches tolérantes, 86,7 % ont manifesté une bonne croissance sur le milieu additionné de la moitié de la dose recommandée (0,205 %) de LDC tandis que les souches RVC36 et RVC37 (4,5 %) ont été sensibles sur ce milieu. Par ailleurs, 93,3 % des souches ont pu croître dont 77,8 % ont présenté une bonne croissance sur le milieu additionné de la dose recommandée (0,41 %) de LDC tandis que trois souches (RVC36, RVC37 et RVC62) n'ont pas survécu sur ce milieu.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Sur une proportion de 93,3 % de souches tolérantes, 77,8 % ont présenté une bonne croissance en présence des deux doses de Nutrigofol (5 et 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) tandis que trois souches (RVC36, RVC37 et RVC62) n'ont pu survivre en présence de cet engrais. Toutes les souches ont pu croître sur le milieu additionné de la moitié de la dose (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) de Fertileg et 84,4 % de ces souches ont présenté une bonne croissance. Alors qu'à la dose recommandée (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) de cet engrais, 97,8 % des souches ont pu croître dont 82,2 % ont présenté une bonne croissance. Toutefois, la souche (RVC31) n'a pas survécu sur ce milieu. En présence des deux doses (0,025 et 0,05 %) de KNO_3 , 95,5 % de souches ont été tolérantes dont 82,2 % ont présenté une bonne croissance et deux souches (RVC36 et RVC37) n'y ont pas survécu. Sur le milieu additionné de la moitié de la dose recommandée (0,025 %) de NaNO_2 , 84,4 % de souches ont été tolérantes dont 17,8 % ont manifesté une bonne croissance et 15,6 % y ont été sensibles. Tandis que 77,8 % ont pu croître dont 13,3 % ont présenté une bonne croissance et 22,2 % n'ont pas survécu sur le milieu additionné de la dose recommandée (0,05 %).

La tolérance des endophytes aux différents engrais testés a varié en fonction de la formulation et de la concentration utilisée. La majorité des souches s'est bien développée en présence des différents engrais testés quel que soit la dose appliquée. Cependant, les souches RVC36, RVC37 et RVC62 ont été les plus sensibles et le NaNO_2 a été le plus toxique pour les souches.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau LIII : Croissance des endophytes à la dose normale et à la ½ dose des engrais testés

Souches	Engrais											
	UB (%)		LDC(%)		NG (µL/mL)		FL (µL/mL)		KNO ₃ (%)		NaNO ₂ (%)	
	0,15	0,3	0,205	0,41	5	10	5	10	0,025	0,05	0,025	0,05
RVC1	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC2	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC3	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC4	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC5	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
RVC7	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
RVC8	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
RVC10	3+	2+	2+	2+	3+	2+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
RVC14	3+	3+	3+	3+	3+	+	3+	2+	3+	3+	3+	2+
RVC16	3+	3+	3+	3+	2+	+	3+	3+	3+	3+	+	-
RVC17	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC18	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC19	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC20	3+	2+	3+	3+	2+	+	3+	3+	2+	2+	+	+
RVC21	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	-
RVC22	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	-
RVC24	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC26	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC29	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC30	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC31	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
RVC32	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	-	-
RVC35	+	+	2+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
RVC36	-	-	-	-	-	-	2+	2+	-	-	-	-
RVC37	-	-	-	-	-	-	2+	2+	-	-	-	-
RVC39	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC40	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC41	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC42	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RVC43	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC44	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC46	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
RVC48	+	2+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	-	-
RVC49	3+	3+	2+	2+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC51	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC52	3+	3+	3+	2+	3+	2+	3+	2+	2+	3+	+	+
RVC53	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	+	+
RVC 54	3+	3+	3+	3+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
RVC55	3+	3+	3+	3+	2+	3+	2+	3+	3+	3+	+	+
RVC56	3+	2+	3+	2+	2+	2+	2+	+	+	+	-	-
RVC57	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC59	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC60	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	+	+
RVC61	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
RVC62	3+	3+	+	-	-	-	2+	2+	+	+	-	-
Témoin	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+

UB : Urée blanc ; FL : Fertileg ; Ng : Nutrigofol ; KNO₃ : Nitrate de sodium ; NaNO₂ : Nitrite de sodium ; LDC : urée rouge ; - : pas de croissance; + : faible croissance; 2+ : croissance moyenne; 3+ : bonne croissance.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.2.5- Effet des pesticides sur les bactéries nodulaires du pois bambara

3.2.5.1- Effet des pesticides sur les rhizobia

L'effet de six herbicides a été mis en évidence sur la survie des souches isolées du pois bambara (Tableau LIV).

Dans le cas des herbicides, le Roundup (Glyphosate) s'est montré très toxique comparé à Herbo Select (Haloxypop-R methyl). En effet, la majorité des souches (75 %) n'ont pas pu croître sur le milieu additionné de la moitié de la dose recommandée (13,5 µL/mL) du Roundup. Ce taux de sensibilité des souches a augmenté à 85 % lorsque le milieu de culture contenait la dose recommandée (27 µL/mL) de cet herbicide. Toutefois, les souches RVC9, RVC12 et RVC13 y ont pu croître faiblement. Concernant l'Herbo Select, 90 % des souches ont pu croître lorsque le milieu de culture contenait la moitié de la dose recommandée (1,7 µL/mL). Ce taux de survie des souches a chuté à 85 % avec une croissance moyenne lorsque le milieu de culture contenait la dose recommandée (3,4 µL/mL) de cet herbicide. Cependant, cinq souches (RVC11, RVC12, RVC23, RVC47 et RVC50) n'y ont pas pu croître.

Les insecticides Cypercal (Cyperméthrine) et K-optimal (Lambdacyhalotrine+Acétamipride) testés dans cette étude, n'ont pas été très toxiques pour les souches. La plupart des souches (88,9 %) n'a pas pu croître sur le milieu additionné de la moitié de la dose (13,5 µL/mL) recommandée de K-optimal avec une croissance relativement normale. Ce taux de survie a chuté à 55,6 %, avec une croissance moyenne lorsque le milieu de culture contenait la dose recommandée (27 µL/mL) de cet insecticide. Toutefois, les souches RVC11, RVC12, RVC13, RVC23, RVC25, RVC28, RVC33 et RVC34 y ont été sensibles. La majorité des souches (88,9 %) ont été tolérantes avec des croissances relativement bonnes sur le milieu additionné de la moitié de la dose recommandée (1,35 µL/mL) de Cypercal. Ce taux de survie des souches a chuté à 83,3 %, avec une croissance relativement moyenne sur le milieu additionné de la dose recommandée (2,7 µL/mL) de cet insecticide. Cependant, trois souches (RVC11, RVC12 et RVC23) y ont été sensibles.

Les fongicides Antracol (Propinèbe) et Ivory (Mancozèbe) testés ont été très toxiques pour toutes les souches. En effet, la croissance de l'ensemble des souches mises en culture sur le milieu additionné d'Ivory a été inhibée par ce fongicide quel que soit la dose appliquée. Aucune souche n'a pu tolérer la dose recommandée ($6,7 \cdot 10^{-3}$ %) d'Antracol. Seules, deux souches (*Sinorhizobium meliloti* strain 1021 et *Mesorhizobium* sp STM 183) ont manifesté une faible croissance en présence de la moitié de la dose recommandée ($3,35 \cdot 10^{-3}$ %) de ce fongicide.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

La tolérance des rhizobia en présence de différents pesticides a varié en fonction de la nature, de la formulation et de la concentration utilisée du pesticide. Les insecticides et l'herbicide Herbo Select (Haloxypop-R-méthyl) ont été largement tolérés par la majorité des souches. Toutefois, les souches RVC11, RVC12, RVC13, RVC23, RVC25, RVC28, RVC33 et RVC34 ont été sensibles au K-optimal, les souches RVC11, RVC12 et RVC23 ont été sensibles Cypercal, et les souches RVC11, RVC12, RVC23, RVC47 et RVC50 ont été sensibles à l'Herbo Select. Tandis que les fongicides et l'herbicide Roundup (Glyphosate) ont été très toxiques pour les souches. Cependant, les souches *Sinorhizobium meliloti strain* 1021 et *Mesorhizobium sp* STM 183 ont toléré Antracol et les souches RVC9, RVC12 et RVC13 ont toléré le Roundup.

Tableau LIV : Croissance des rhizobia à la dose normale et à la ½ dose des pesticides testés

Souches	Herbicides				Insecticides				Fongicides			
	Rp (µl/ml)		Hs (µl/ml)		KO (µl/ml)		Cc (µl/ml)		Iv (%)		An (%)	
	13,5	27	1,7	3,4	13,5	27	1,35	2,7	2,5.10 ⁻³	5.10 ⁻³	3,35.10 ⁻³	6,7.10 ⁻³
RVC6	-	-	2+	2+	2+	3+	3+	3+	-	-	-	-
RVC9	+	+	2+	+	2+	+	3+	3+	-	-	-	-
RVC11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC12	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
RVC13	2+	+	3+	2+	+	-	3+	3+	-	-	-	-
RVC15	-	-	2+	+	2+	+	3+	3+	-	-	-	-
RVC23	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC25	-	-	2+	2+	3+	-	3+	3+	-	-	-	-
RVC28	-	-	2+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
RVC33	-	-	2+	2+	2+	-	3+	3+	-	-	-	-
RVC34	-	-	2+	2+	2+	-	3+	3+	-	-	-	-
RVC38	-	-	2+	2+	3+	3+	3+	3+	-	-	-	-
RVC45	-	-	2+	2+	3+	2+	3+	3+	-	-	-	-
RVC47	-	-	-	-	+	+	2+	2+	-	-	-	-
RVC50	-	-	-	-	+	+	2+	+	-	-	-	-
L01	-	-	2+	3+	3+	2+	3+	2+	-	-	-	-
STM	-	-	2+	2+	3+	2+	2+	2+	-	-	+	-
S1021	-	-	3+	2+	3+	2+	2+	2+	-	-	+	-
Témoin	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+

Rp : Roundup ; **Hs** : Herbo select ; **KO** : K-Optimal ; **Cc** : Cypercal ; **Iv** : Ivory ; **An** : Antracol ; **Rp** : Roundup ; **Hs** : Herbo select ; **KO** : K-Optimal ; **Cc** : Cypercal ; **Iv** : Ivory ; **An** : Antracol ; **S1021**: *Sinorhizobium meliloti strain* 1021; **STM** : *Mesorhizobium sp* STM 183 - : pas de croissance; + : faible croissance; 2+ : croissance moyenne; 3+ : bonne croissance.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.2.5.2- Effet des pesticides sur les endophytes

Le test de tolérance des endophytes associés au pois bambara a révélé une diversité dans les réponses des endophytes aux différents pesticides testés (Tableau LV).

Dans le cas des herbicides, le Roundup (Glyphosate) s'est montré très toxique comparé à Herbo Select (Haloxypop-R methyl). En effet, la croissance de la presque totalité des souches (88,9 %) a été inhibée en présence de la moitié de la dose recommandée (13,5 µL/mL) du Roundup. Ce taux de sensibilité des souches a augmenté à 95,6 % lorsque le milieu de culture contenait la dose recommandée (27 µL/mL) de cet herbicide. Toutefois, les souches RVC57 et RVC62 y ont pu croître faiblement. Concernant l'Herbo Select, plus de la moitié des souches (57,8 %) ont pu croître lorsque le milieu de culture contenait la moitié de la dose recommandée (1,7 µL/mL). Ce taux de survie des souches a chuté à 53,3 %, avec une croissance allant de moyenne à bonne lorsque milieu de culture contenait la dose recommandée (3,4 µL/mL) de cet herbicide.

Les insecticides Cypercal (Cyperméthrine) et K-optimal (Lambdacyhalotrine+Acétamipride) testés dans cette étude, ont été toxiques pour ces bactéries. Plus de la moitié des souches (53,3 %) ont pu croître sur le milieu additionné de la moitié de la dose recommandée (13,5 µL/mL) de K-optimal avec une croissance allant de faible à bonne. Ce taux de survie a chuté à 48,9 %, avec une croissance variant de faible à moyenne lorsque le milieu de culture contenait la dose recommandée (27 µL/mL) de cet insecticide. Une proportion de 51,1 % des souches a été tolérante avec une croissance allant de moyenne à bonne sur le milieu additionné de la moitié de la dose recommandée ((1,35 µL/mL) de Cypercal. Ce taux de survie des souches a chuté à 48,9 %, avec une croissance relativement moyenne sur le milieu additionné (2,7 µL/mL) de la dose recommandée de cet insecticide. Le Cypercal et K-optimal ont été tous deux toxiques approximativement pour la moitié des bactéries endophytes testées.

Les fongicides Antracol (Propinèbe) et Ivory (Mancozèbe) testés ont été très toxiques pour toutes les souches. En effet, la croissance de l'ensemble des souches mises en culture sur le milieu additionné d'Ivory a été inhibé par ce fongicide quel que soit la dose appliquée. Aucune souche n'a pu tolérer la dose recommandée ($6,7 \cdot 10^{-3}$ %) Antracol. Seules, deux souches (RVC21 et RVC22) ont manifesté une faible croissance en présence de de la moitié de la dose recommandée ($3,35 \cdot 10^{-3}$ %) de ce fongicide.

La tolérance des endophytes vis à vis des différents pesticides a varié en fonction de la nature, de la formulation et de la concentration utilisée du pesticide. Les insecticides et l'herbicide Herbo Select (Haloxypop-R-méthyl) ont été tolérés respectivement par 48,9 % et 53,3 % des

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

souches. Tandis que les fongicides et l'herbicide Roundup (Glyphosate) ont été très toxiques pour les souches. Toutefois, les souches RVC21 et RVC22 ont toléré Antracol (Propinèbe) et les souches RVC57 et RVC62 ont toléré le Roundup.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau LV : Croissance des endophytes à la dose normale et à la 1/2 dose des pesticides testés

Souches	Herbicides				Insecticides				Fongicides			
	Rp (µl/ml)		Hs (µl/ml)		KO (µl/ml)		Cc (µl/ml)		Iv (%)		An (%)	
	13,5	27	1,7	3,4	13,5	27	1,35	2,7	2,5.10 ⁻³	5.10 ⁻³	3,35.10 ⁻³	6,7.10 ⁻³
RVC1	-	-	-	-	2+	+	3+	2+	-	-	-	-
RVC2	-	-	3+	3+	2+	2+	3+	3+	-	-	-	-
RVC3	-	-	3+	3+	2+	2+	3+	3+	-	-	-	-
RVC4	-	-	3+	3+	2+	2+	3+	3+	-	-	-	-
RVC5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC7	-	-	2+	2+	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC8	-	-	2+	2+	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC10	-	-	2+	2+	3+	+	3+	3+	-	-	-	-
RVC14	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RVC16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC20	-	-	+	-	2+	-	3+	2+	-	-	-	-
RVC21	-	-	3+	3+	2+	+	2+	3+	-	-	+	-
RVC22	-	-	3+	3+	2+	+	2+	3+	-	-	+	-
RVC24	-	-	2+	2+	2+	-	3+	2+	-	-	-	-
RVC26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC29	+	-	3+	2+	3+	2+	3+	-	-	-	-	-
RVC30	+	-	3+	2+	3+	2+	3+	-	-	-	-	-
RVC31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC35	-	-	3+	2+	3+	2+	3+	3+	-	-	-	-
RVC36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC39	-	-	3+	2+	3+	2+	2+	2+	-	-	-	-
RVC40	-	-	3+	2+	3+	2+	2+	2+	-	-	-	-
RVC41	-	-	3+	2+	3+	2+	3+	3+	-	-	-	-
RVC42	-	-	-	-	2+	3+	2+	2+	-	-	-	-
RVC43	-	-	-	-	2+	3+	2+	2+	-	-	-	-
RVC44	-	-	3+	2+	3+	2+	3+	2+	-	-	-	-
RVC46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC49	-	-	+	+	+	+	2+	+	-	-	-	-
RVC51	-	-	2+	2+	+	+	2+	+	-	-	-	-
RVC52	-	-	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC53	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
RVC54	-	-	3+	2+	-	-	3+	2+	-	-	-	-
RVC55	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RVC57	+	+	-	-	-	-	2+	-	-	-	-	-
RVC59	-	-	3+	2+	3+	2+	3+	3+	-	-	-	-
RVC60	-	-	3+	3+	2+	+	3+	3+	-	-	-	-
RVC61	-	-	-	-	+	-	2+	+	-	-	-	-
RVC62	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Témoin	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+

Rp : Roundup ; Hs : Herbo select ; KO : K-Optimal ; Cc : Cypercal ; Iv : Ivory ; An : Antracol ; Rp : Roundup ; Hs : Herbo select ; KO : K-Optimal ; Cc : Cypercal ; Iv : Ivory ; An : Antracol ; S1021: *Sinorhizobium meliloti* strain 1021; STM : *Mesorhizobium sp* STM 183 - : pas de croissance; + : faible croissance; 2+ : croissance moyenne; 3+ : bonne croissance

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.3- Caractéristiques promotrices de croissance des plantes des bactéries isolées des nodules du pois bambara

3.3.1- Capacité productrice d'AIA des bactéries nodulaires du pois bambara

La capacité des souches bactériennes à produire de l'AIA a été détectée par l'apparition d'une couleur rose-rougeâtre après l'ajout de réactif Salkowski à la culture (Figure 53).

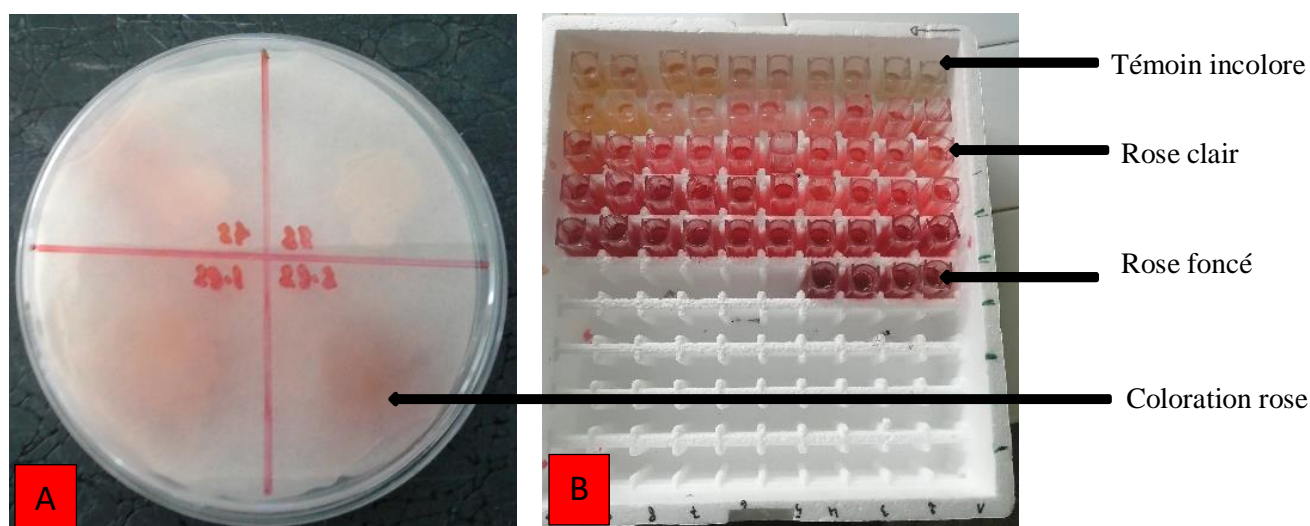


Figure 25 : Production de l'AIA par les bactéries nodulaires de *Vigna subterranea*

(A) : Test qualitatif, YEMA additionné du tryptophane + papier filtre imbibé du réactif salkowski

(B) : Test quantitatif, surnageant de culture additionné du réactif salkowski

3.3.1.1- Capacité productrice d'AIA des rhizobia

Le test qualitatif sur YEMA additionné du tryptophane a montré que 86,7 % des souches ont pu produire l'AIA. Seulement deux souches (RVC12 et RVC34) soit 13,3 % des souches ont donné des réactions négatives (Tableau LVI et Figure 53 A).

Le test quantitatif a montré une variabilité de quantités d'AIA produites par les rhizobia. L'analyse de la variance a montré une différence significative à $P < 0,05$ (Tableau LVI). En effet, toutes les souches ont été capables de produire des quantités détectables d'AIA sur YEM additionné du tryptophane. Ces quantités ont varié de 19,75 $\mu\text{g/mL}$ pour la souche RVC34 à 231,08 $\mu\text{g/mL}$ pour la souche RVC13. Les souches RVC13 et RVC45 (13,3 %) ont produit des quantités supérieures à 200 $\mu\text{g/mL}$. En effet, la souche RVC13 a été la plus grande productrice d'AIA (231 $\mu\text{g/mL}$) suivie de la souche RVC45 (221 $\mu\text{g/mL}$).

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau LVI: Capacité des rhizobia isolés du pois bambara à produire l'AIA

Souches	Quantité AIA (µg/ml)	Couleur rose de colonie
RVC6	62,00±6,00 e	+
RVC9	104,50±6,062 d	+
RVC11	52,70±1,47 f	+
RVC12	28,63±6,88 g	-
RVC13	231,08±6,00 a	+
RVC15	63,00±0,50 e	+
RVC23	115,88±1,62 c	+
RVC25	97,88±5,38 d	+
RVC 28	57,63±1,63 ef	+
RVC33	64,27±3,25 e	+
RVC34	19,75±1,75 h	-
RVC38	119,00±3,00 c	+
RVC45	221,00±1,00 b	+
RVC47	60,33±2,25 ef	+
RVC50	100,08±4,00 d	+

Dans chaque colonne les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ (test de Newman-Keuls). + : Présence - : Absence

3.3.1.2- Capacité productrice d'AIA des endophytes

Le test qualitatif sur YEMA additionné du tryptophane (Figure 53 A) a montré que 86,7 % des souches ont pu produire l'AIA. Seulement six souches (RVC7, RVC14, RVC17, RVC18, RVC21 et RVC26) soit 13,3 % des souches ont donné des réactions négatives (Tableau LVII).

Le test quantitatif (Figure 53 B) a montré une variabilité significative des quantités d'AIA produites par les rhizobia à $P < 0,05$ (Tableau LVII). En effet, toutes les souches ont été capables de produire des quantités détectables d'AIA. Ces quantités variaient de 16,3 µg/mL pour la souche RVC19 à 275,5 µg/ml pour la souche RVC41. Par ailleurs, les souches RVC36, RVC37, RVC39, RVC40, RVC41 et RVC60 (13,3 %) ont produit des grandes quantités, [AIA]>200 µg/mL et étaient les meilleures productrices.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau LVII : Capacité des endophytes isolés du pois bambara à produire l'AIA

Souches	Quantité AIA (µg/ml)		Couleur rose de colonie
RVC1	106,5±11,5	op	+
RVC2	92,25±12,75	q	+
RVC3	58,13±1,875	v	+
RVC4	129,8±3,12	kl	+
RVC5	119,0±1,75	mn	+
RVC7	26,36±2,37	x	-
RVC8	116,25±2,00	mn	+
RVC10	112,50±0,87	on	+
RVC14	21,00±1,5	yx	-
RVC16	152,5±2,50	h	+
RVC17	23,50±1,5	xy	-
RVC18	19,58±1,28	xy	-
RVC19	16,3±0,62	y	+
RVC20	104,37±6,37	op	+
RVC21	39,67±1,15	w	-
RVC22	174,62±4,12	g	+
RVC24	136,13±1,87	kj	+
RVC26	26,00±3,25	x	-
RVC29	82,75±2,75	r	+
RVC30	122,38±3,12	ml	+
RVC31	69,5±3,0	ut	+
RVC32	85,50±1,75	r	+
RVC35	51,25±1,75	v	+
RVC36	212,00±4,76	d	+
RVC37	246,00±3,46	c	+
RVC39	272,00±6,5	a	+
RVC40	254,0±4,50	b	+
RVC41	275,5±1,5	a	+
RVC42	196,12±4,13	e	+
RVC43	181,88±0,63	f	+
RVC44	104,42±1,66	op	+
RVC46	146,08±2,24	ih	+
RVC48	74,83±1,37	st	+
RVC49	97,58±3,75	qp	+
RVC51	79,25±1,01	sr	+
RVC52	66,00±2,16	u	+
RVC53	93,75±1,51	q	+
RVC54	145,63±3,13	ih	+
RVC55	150,25±7,25	ih	+
RVC56	103,87±2,62	op	+
RVC57	141,75±6,75	ij	+
RVC59	54,87±5,13	v	+
RVC60	273,00±2,6	a	+
RVC61	154,75±0,75	h	+
RVC62	79,38±1,63	sr	+

Dans chaque colonne les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ (test de Newman-Keuls). + : Présence - : Absence

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.3.2- Capacité solubilisatrice du phosphate des bactéries nodulaires du pois bambara

La capacité de solubilisation du phosphate par les souches bactériennes est marquée par la formation de halos clairs autour des colonies sur milieu Phikovskaya solide contenant du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3\text{P}(\text{O}_4)_2$) additionnée de bleu de bromophénol et par l'apparition de la coloration jaune en milieu Phikovskaya liquide contenant du phosphate naturel après l'ajout du réactif de Vanadate-molybdate (Figure 54).

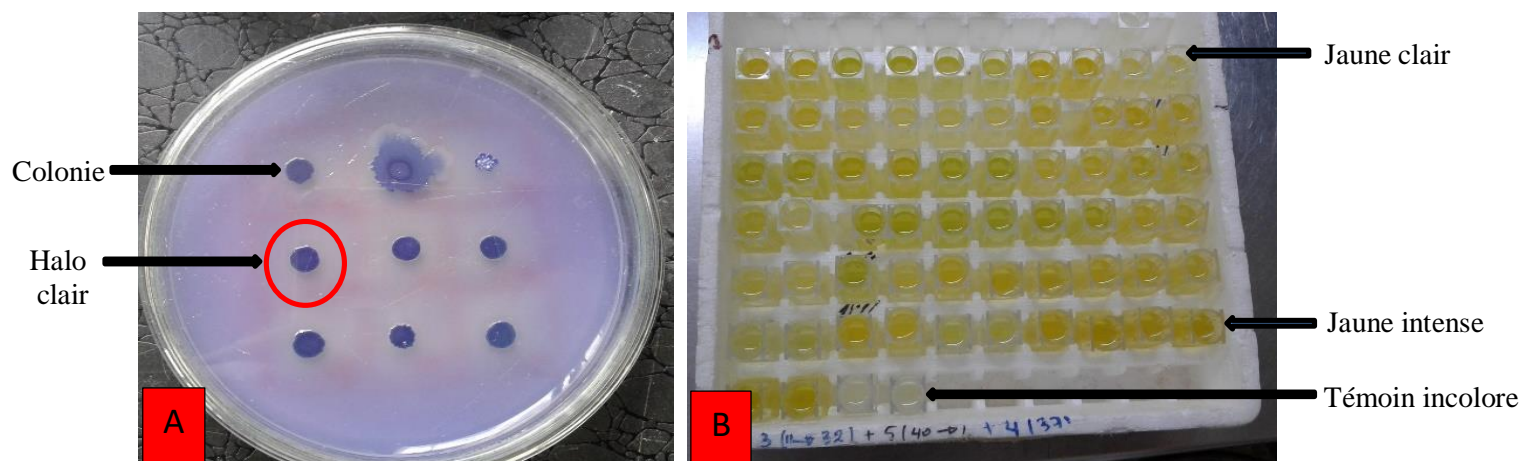


Figure 26: Solubilisation du phosphate par les bactéries nodulaires de *Vigna subterranea*

(A) : Test qualitatif, PVK solide additionné de bleu bromophénol

(B) : Test quantitatif, surnageant de culture additionné du réactif de Vanadate-molybdate

3.2.2.1- Capacité solubilisatrice du phosphate des rhizobia

Le test qualitatif a permis de détecter la capacité solubilisatrice des 15 souches de rhizobium. En effet, ces souches ont été capables de solubiliser le phosphate en milieu solide (Figure 54 A et Tableau LVIII).

Le test quantitatif a révélé une variabilité dans la capacité à solubiliser le phosphate des souches. (Tableau LVIII, Figure 54 B). En effet, 40 % des souches ont solubilisé des quantités supérieures à 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($[\text{P}] > 200 \mu\text{g}/\text{mL}$). Par ailleurs, l'analyse de la variance a montré une différence significative à $P < 0,05$ entre les quantités de phosphates solubilisées par les souches (Tableau LVIII). En fait, La plage de phosphate solubilisée était de 66,90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour la souche RVC28 à 339,84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour la souche RVC12. Le phosphate a été solubilisé à des pH acides allant de $\text{pH} = 3,54$ à $\text{pH} = 4,97$. Les souches de rhizobium ont présenté des grandes capacités solubilisatrices du phosphate et les meilleures P-solubilisatrices ont été les souches RV12 (339,84 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et RVC45 (303,57 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau LVIII : Capacité solubilisatrice de phosphate des rhizobia isolés du pois bambara

Souches	Quantité de phosphate ($\mu\text{g/ml}$)	pH de solubilisation	halo clair
RVC6	172,30 \pm 3,07 f	4,17	+
RVC9	201,72 \pm 6,03 e	4,00	+
RVC11	225,74 \pm 5,51 c	3,71	+
RVC12	339,84 \pm 4,92 a	3,54	+
RVC13	204,48 \pm 8,45 e	4,20	+
RVC15	148,88 \pm 0,86 g	4,16	+
RVC23	146,64 \pm 4,31 g	4,20	+
RVC25	136,03 \pm 2,84 h	4,28	+
RVC 28	66,90 \pm 1,81 j	4,89	+
RVC33	107,33 \pm 3,10 i	4,66	+
RVC34	71,29 \pm 0,35 j	4,93	+
RVC38	214 \pm 4,74 d	4,56	+
RVC45	303,57 \pm 4,74 b	3,81	+
RVC47	144,22 \pm 3,11 gh	4,89	+
RVC50	136,45 \pm 3,80 h	4,97	+

Dans chaque colonne les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ (test de Newman-Keuls). + : Présence - : Absence

3.2.2.2- Capacité solubilisatrice du phosphate des endophytes

Le test qualitatif a permis de détecter la capacité solubilisatrice de toutes les souches testées. En effet, ces souches ont été capables de solubiliser le phosphate en milieu solide (Figure 54 A, Tableau LIX).

Le test quantitatif a révélé une variabilité dans la capacité à solubiliser le phosphate des souches. (Tableau LIX et Figure 54 B). En effet, 31,1 % des souches ont solubilisé des quantités supérieures à 200 $\mu\text{g/mL}$ ($[\text{P}] > 200 \mu\text{g/ml}$). Par ailleurs, l'analyse de la variance a montré une différence significative à $P < 0,05$ entre les quantités de phosphates solubilisées par les souches (Tableau LIX). En fait, La plage de phosphate solubilisée était de 9 $\mu\text{g/ml}$ pour la souche RVC39 à 435,45 $\mu\text{g/mL}$ pour la souche RVC29. Le phosphate a été solubilisé à des pH acides et neutres allant de pH = 3,77 à pH = 6,29). Les bactéries endophytes ont montré des capacités à solubiliser des concentrations élevées de phosphate. Les souches RVC29, RVC1 et RVC4 ont solubilisé des quantités supérieures à 400 $\mu\text{g/mL}$ ($[\text{P}] > 400 \mu\text{g/ml}$). En effet, la souche RVC29 (453,45 $\mu\text{g/mL}$) a été la meilleure solubilisatrice de phosphate, suivie de RVC4 (439,66 $\mu\text{g/mL}$) et RVC1 (408,61 $\mu\text{g/mL}$).

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau LIX : Capacité solubilisatrice de phosphate des endophytes isolés du pois bambara

Souches	Quantité de phosphate ($\mu\text{g/ml}$)		pH de solubilisation	halo clair
RVC1	408,63 \pm 6,9	c	3,77	+
RVC2	201,64 \pm 17,59	ji	4,10	+
RVC3	126,23 \pm 5,40	on	4,99	+
RVC4	439,66 \pm 3,45	b	3,78	+
RVC5	81,72 \pm 1,90	rs	5,49	+
RVC7	77,98 \pm 5,73	rst	6,07	+
RVC8	94,28 \pm 8,39	rq	6,29	+
RVC10	233,6 \pm 9,89	h	4,14	+
RVC14	161,58 \pm 12,68	m	4,28	+
RVC16	104,41 \pm 2,91	qp	4,67	+
RVC17	255,71 \pm 21,16	g	3,81	+
RVC18	167,53 \pm 9,21	ml	3,78	+
RVC19	251,10 \pm 1,77	g	3,77	+
RVC20	136,29 \pm 7,14	n	4,36	+
RVC21	111,01 \pm 5,93	okp	5,46	+
RVC22	125,78 \pm 7,1	on	4,67	+
RVC24	185,76 \pm 9,12	jkl	4,34	+
RVC26	60,83 \pm 1,47	ut	4,90	+
RVC29	453,45 \pm 4,135	a	3,87	+
RVC30	387,94 \pm 5,69	d	4,16	+
RVC31	316,63 \pm 3,97	f	4,03	+
RVC32	16,47 \pm 1,64	v	5,02	+
RVC35	73,95 \pm 1,64	st	4,95	+
RVC36	212,77 \pm 4,13	i	4,14	+
RVC37	313,37 \pm 5,43	f	4,17	+
RVC39	9,29 \pm 0,25	v	5,01	+
RVC40	68,23 \pm 0,12	ust	4,62	+
RVC41	361,64 \pm 1,12	e	3,97	+
RVC42	229,70 \pm 1,10	h	4,16	+
RVC43	48,97 \pm 0,67	u	4,65	+
RVC44	51,29 \pm 1,20	u	4,63	+
RVC46	304,68 \pm 2,50	f	4,07	+
RVC48	160,29 \pm 1,69	m	4,39	+
RVC49	67,73 \pm 0,99	ust	4,85	+
RVC51	132,155 \pm 1,22	n	4,29	+
RVC52	160,11 \pm 4,081	m	4,16	+
RVC53	135,40 \pm 2,21	n	4,21	+
RVC54	84,05 \pm 0,89	rs	4,71	+
RVC55	190,26 \pm 4,65	jk	4,15	+
RVC56	49,23 \pm 2,41	u	5,06	+
RVC57	178,45 \pm 5,18	mkl	4,23	+
RVC59	115,95 \pm 3,27	onp	4,24	+
RVC60	116,73 \pm 6,29	onp	5,15	+
RVC61	299,07 \pm 24,14	f	5,03	+
RVC62	179,44 \pm 6,84	mkl	4,11	+

Dans chaque colonne les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ (test de Newman-Keuls). + : Présence - : Absence

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.3.3- Capacité productrice de sidérophores des bactéries nodulaires du pois bambara

La production de sidérophore a été détectée sur milieu CAS solide. Le changement de couleur des colonies vers l'orange après 48 heures d'incubation indiquait la capacité des souches à produire du sidérophore (Figure 55).

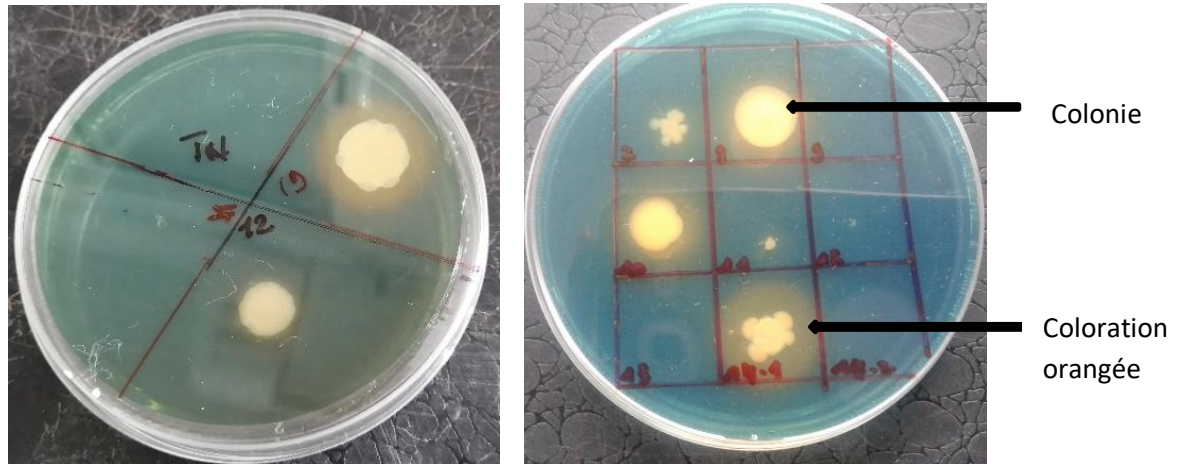


Figure 27 : Production de sidérophores par les bactéries nodulaires de *Vigna subterranea* sur LB solide + CAS

3.3.3.1- Capacité productrice de sidérophores des rhizobia

Toutes les souches ont pu produire du sidérophore à l'exception de deux souches (RVC6 et RVC12) (Figure 55). Par ailleurs, une différence significative a été révélée entre les diamètres puis entre les indices de production à $P < 0,05$ (Tableau LX). Les diamètres des halos ont varié de 11 pour la souche RVC15 à 33 mm pour la souche RVC28 et les indices ont varié de 2,03 pour la souche RVC47 à 3,69 pour la souche RVC28. Les souches qui ont montré de grandes capacités de production de sidérophore sont RVC28 (3,69), RVC25 (3,53), RVC23 (3,32), et RVC50 (3,22).

Les rhizobia ont montré de grandes capacités de production de sidérophores.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau LX : Capacité productrice de sidérophore des rhizobia isolés du pois bambara

Souches	Diamètre du halo (DH) (mm)	Indice de production (IPS)
RVC6	-	-
RVC9	19,33±1,53 d	2,09±0,17 ef
RVC11	19,33±0,76 d	2,07±0,09 ef
RVC12	-	-
RVC13	18,50±0,50 d	2,180±0,07 def
RVC15	11,00±2,00 e	1,60±0,18
RVC23	28,67±0,76 b	3,32±0,2 ab
RVC25	31,00±2,00 a	3,53±0,57 a
RVC 28	33,00±1,00 a	3,69±0,30 a
RVC33	20,00±2,00 d	2,57±0,40 cde
RVC34	25,33±1,04 c	2,86±0,38 bcd
RVC38	19,00±0,50 d	2,72±0,13 bcde
RVC45	25,33±1,53 c	2,74±0,28 bcde
RVC47	20,00±2,00 d	2,03±0,21 ef
RVC50	25,00±2,00 c	3,22±0,57 abc

Dans chaque colonne les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ (test de Newman-Keuls). + : Présence - : Absence

3.3.3.2- Capacité productrice de sidérophores des endophytes

Toutes les souches ont pu produire du sidérophore à l'exception des souches RVC1, RVC5 et RVC18 (Figure 55). Par ailleurs, une différence significative a été révélée entre les diamètres puis entre les indices de production à $P < 0,05$ (Tableau LXI). Les diamètres des halos sont rangés de 7,06 pour la souche RVC7 à 40 mm pour la souche RVC21 et les indices ont varié de 1,07 pour la souche RVC16 à 5,36 pour la souche RVC29. Les souches RVC29 (5,36), RVC22 (4,3) et RVC21 (3,65) ont montré les plus grandes productions de sidérophore. Les endophytes ont montré de grandes capacités de production de sidérophores

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau LXI : Capacité productrice de sidérophore des endophytes isolés du pois bambara

Souches	Diamètre du halo (DH) (mm)	Indice de production (IPS)
RVC1	-	-
RVC2	17,0±1,0 qr	2,45±0,2 gjfih
RVC3	7,5±1,3 u	1,08±0,01 l
RVC4	7,5±1,3 u	1,08±0,02 l
RVC5	-	-
RVC7	7,06±0,3 u	1,06±0,00 l
RVC8	23,0±1,0 klmn	2,1±0,1 jikh
RVC10	8,0±1,0 u	1,16±0,17 l
RVC14	12,5±0,5 t	1,32±0,02 l
RVC16	15,83±1,0 rs	1,07±0,00 l
RVC17	23,0±2,0 klmn	2,3±0,27 gjikh
RVC18	-	-
RVC19	18,0±0,5 pqr	2,00±0,05 jik
RVC20	14,0±2,0 st	1,68±0,16 lk
RVC21	40,0±1,0 a	3,65±0,24 c
RVC22	36,5±0,5 b	4,3±0,19 b
RVC24	35,0±1,0 bcd	3,5±0,25 dce
RVC26	31,0±1,5 efg	3,22±0,2 dfce
RVC29	32,0±0,5 def	5,36±0,36 a
RVC30	27,0±2,0 hij	2,50±0,27 gjfih
RVC31	29,0±1,0 fgh	2,92±0,19 gdfceh
RVC32	27,0±0,5 hij	3,00±0,11 gdfce
RVC35	28,0±2,0 ghi	2,85±0,38 gdfeh
RVC36	27,0±1,0 hij	2,46±0,13 gjfih
RVC37	22,0±0,5 klmno	2,75±0,11 gfieh
RVC39	21,83±1,8 klmno	2,51±0,31 gjfih
RVC40	21,0±2,6 lmnop	2,77±0,22 gfieh
RVC41	23,33±1,5 klmn	2,84±0,33 gdfeh
RVC42	24,83±0,8 ijkl	2,3±0,1 gjfih
RVC43	21,83±1,7 klmno	2,51±0,31 gjfih
RVC44	23,66±2,0 jklmn	2,49±0,29 gjfih
RVC46	20,83±0,8 mnop	1,76±0,05 jlk
RVC48	30,0±1,0 efg	2,51±0,12 gjfih
RVC49	33,0±2,0 cde	3,05±0,37 gdfce
RVC51	20,0±1,5 nopq	2±0,004 jik
RVC52	18,5±4,0 opqr	2,40±0,74 gjfih
RVC53	20,0±1,0 nopq	1,67±0,05 lk
RVC54	35,0±1,0 bcd	3,52±0,25 dce
RVC55	19,0±1,5 opqr	2,78±0,39 gfieh
RVC56	19,0±0,5 opqr	2,72±0,12 gfieh
RVC57	23,0±1,0 klmn	2,57±0,17 gfih
RVC59	25,0±1,5 ijk	3,6±0,58 dc
RVC60	24,0±1,0 jklm	3,02±0,25 dfce
RVC61	28,0±2,0 ghi	3,61±0,67 dc
RVC62	36,0±0,5 bc	3,60±0,13 dc

Dans chaque colonne les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ (test de Newman-Keuls). + : Présence - : Absence

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

3.4- Discussion

La caractérisation phénotypique a été réalisée pour mettre en évidence d'une part l'étendue des variations phénotypiques qui existent entre les souches et d'autre part exploiter ces variations pour la sélection de candidats efficaces pouvant supporter les stress abiotiques.

En premier lieu, La caractérisation physiologique et symbiotique des rhizobia a été effectuée pour évaluer la diversité phénotypique existant entre les rizobia isolés des nodules du pois bambara afin de sélectionner les plus efficaces.

Les différents rhizobia se distinguent par leurs vitesses de croissance, par la nutrition carbonée et par la différence enzymatique (Martinez-romero *et al.*, 1990).

La majorité des souches (86,7 %) testées a montré des croissances rapides alors que 13,3 % des souches ont montré des croissances lentes. En effet, la majorité des souches a acidifié les milieux de culture en changeant la couleur de YEMA additionné au BTB en jaune pendant les 3 premiers jours d'incubation. Tandis que les souches RVC45 et RVC11 ont alcalinisé les milieux de culture en changeant la couleur de YEMA additionné au BTB en bleu.

La croissance des souches a été variable selon l'hydrate de carbone. En effet, 86,7 % des souches ont pu assimiler tous les sucres testés mais à des degrés différents. Mais les souches RVC45 et RVC11 (13,3 %) n'ont pas pu croître en présence du Tréhalose et Maltose. La croissance de 67 % des souches a été affectée négativement en présence des hydrates de carbone testés autre que le mannitol (référence).

Cette différence d'assimilation de ces sucres et de croissance sur YEMA+ BTB observée chez les souches testées pourrait être due à la diversité génétique des souches mise en évidence lors de l'analyse moléculaire. En effet, le groupe des rhizobia est constitué des membres de *Rhizobium* (80 %), *Bradyrhizobium* (13,3 %) et *Ensifer* (6,7 %).

Les espèces des genres *Rhizobium* et *Ensifer* sont des bactéries à croissance rapide et les espèces du genre *Bradyrhizobium* sont des bactéries à croissance lente (pagano, 2008).

Selon Jordan (1984), les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient entraîner le virage de la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture.

Jida *et al.* (2012) ont étudié des souches qui ont changé la couleur de YEMA additionné au BTB pendant les 3 premiers jours d'incubation indiquant qu'ils sont des producteurs d'acide et donc

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

possible de les classer comme des rhizobia à croissance rapide. Les travaux de Lyra *et al.* (2013) ont montré que les rhizobia à croissance rapide sont capables d'acidifier le milieu de culture. Il avait été rapporté aussi que les rhizobia à croissance rapide utilisent une grande diversité de substrats carbonés, parmi les hexoses, les pentoses, les di et les trisaccharides et les acides organiques. Par contre, les *Bradyrhizobium* n'utilisent pas les disaccharides ni les acides organiques (Allen & Allen, 1950). Martinez de Drets & Arias (1972) ont montré que ces différences dans la nutrition carbonée des rhizobia sont reliées à leur capacité de transport des substrats et à la présence d'enzymes pouvant les métaboliser. L'enzyme clé de la voie des pentoses phosphate le NADP-6-phosphogluconate deshydrogénase n'a été observée que chez les espèces à croissance rapide. La présence de cette enzyme leur permet d'utiliser la voie des pentoses phosphate ce qui les différencie des *Bradyrhizobium* qui ne peuvent pas utiliser cette voie pour la dégradation des hexoses. En plus, les *Rhizobium* possèdent l'enzyme invertase qui leur permet de briser les disaccharides. Cette enzyme est absente chez les *Bradyrhizobium* qui ne peuvent donc pas croître sur ces substrats. Struffi *et al.* (1998) ont constaté également une différence dans l'assimilation des hydrates de carbone. Tan *et al.* (1999) ont trouvé que tous leurs isolats utilisent le mannitol comme seule source de carbone. Egalement dans le cas présent, l'on remarque que le mannitol a été le substrat carboné le mieux dégradé par les souches testées et elles ont affiché une très bonne croissance en présence de ce dernier.

La caractérisation symbiotique a été effectuée afin d'évaluer la diversité des rhizobia isolés du pois bambara par leur potentiel infectieux et fixateur puis de repérer les souches les plus efficaces. Un des caractères important pour identifier les isolats nodulaires comme étant des rhizobia est de prouver leur capacité à réinfecter et former des nodosités sur leur plante hôte en conditions bactériologiques contrôlées (Graham *et al.*, 1991).

Les 15 bactéries testées ont pu réinfecter et reformer les nodules fonctionnels tant avec les plantes de leur cultivar d'origine qu'avec le cultivar Ci3 du pois bambara. Cette plasticité d'infection a été mise en évidence chez les souches de Lupin étudiées par El-Hilali (2006).

Une différence marquée dans la morphologie a été observée entre les plantes inoculées avec les souches testées. En effet, les plantes inoculées présentaient des racines allant de blanchâtres à brunes claires de longueur variant de 21,17 cm à 34,63 cm, des longueurs de tige allant de 16,37 cm à 19,63 cm avec des feuilles vertes claires à foncées quelques fois nécrosées.

Une grande variabilité de la capacité infective des souches du pois bambara a été mise en évidence dans cette étude. En effet, même si l'inoculation de chaque plante a été réalisée avec 1 mL de bouillon bactérien, le nombre moyen de nodules a varié de 1887 nodules/plante à 87

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

nodules/plante. La matière sèche de nodules quant à elle a varié de 21,67 mg/plante à 289 mg/plante.

Il y a eu une différence significative dans l'impact des souches sur les biomasses engendrées par l'inoculation. En fait, La biomasse fraîche aérienne a varié de 2,53 g/plante à 4,11 g/plante. Le poids frais racinaire a varié de 3,32 g/plante à 6,50 g/plante. Le rendement en matière sèche de la partie aérienne de la plante hôte différait considérablement entre les souches testées, avec des valeurs allant de 0,51 g/plante à 1 g/plante. La biomasse sèche racinaire issue de l'inoculation a varié de 0,27 g/plante à 0,50 g/plante.

La mesure indirecte des contributions de la fixation de l'azote via la matière sèche des parties aériennes variaient considérablement entre les souches testées. L'indice relatif (IR) et l'efficacité symbiotique relative (ER) ont évolué dans le même sens que les différences observées dans la nodulation et le rendement en matière sèches des plantes. Les souches RVC45 et RVC28 ont été les moins efficaces avec IR = 1,1 et ER = 42 % contrairement à la RVC25 qui a été la plus efficace avec IR = 2,17 et ER = 83 %.

Cette grande variabilité des souches observée sur tous les caractères évalués pourrait être liée à la diversité génétique des souches révélée par l'analyse phylogénétique du gène de l'ARNr 16S.

Il confirme les résultats rapportés par Ibny *et al.* (2019), Puozaa *et al.* (2017) qui ont authentifié les rhizobia isolés du pois bambara. En effet, ces chercheurs ont montré que la diversité phénotypique observée était étroitement liée à la diversité génétique.

Il est important de signaler que le nombre de nodules des souches isolées des cultivars autres que le cultivar Ci3 a considérablement varié de l'authentification à l'évaluation de la performance symbiotique. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les cultivars d'origine ont été utilisés pour l'authentification alors que le cultivar Ci3 a été utilisé pour l'évaluation de la performance. Or, il a été démontré lors du piégeage que le cultivar utilisé a un impact significatif sur la nodulation. De plus, Kumari *et al.* (2010) qui ont authentifié les rhizobia isolés des espèces d'*Indigofera* ont rapporté que le nombre de nodules variait selon les espèces.

Ces différences dans la nodulation et dans le rendement en poids sec des plantes étaient accompagnées de variations marquées dans l'efficacité symbiotique relative et de l'index relatif des souches testées. Divers auteurs ont trouvé de fortes corrélations entre la biomasse aérienne, la biomasse racinaire et le nombre et la masse de nodules (Ibny *et al.*, 2019; Karaboneye, 2013). Par contre, certains auteurs (Guei *et al.*, 2019; Belay & Fassil, 2010; Maâtallah *et al.*, 2001) ont rapporté l'absence de corrélation entre les paramètres symbiotiques en général.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Il faut noter que 20, 60 et 20 % des souches isolées du cultivar Ci3 ont été des fixateurs respectivement faibles, moyens et très efficaces. Alors que 40 et 60 % des souches qui n'ont pas été isolées du cultivar Ci3 étaient des fixateurs respectivement inefficaces et moyennement efficaces. Cependant, El-hilali (2006) a montré que toutes les souches qui n'ont pas été isolées de *L. Luteus* ont montré une efficacité supérieure à 60%. Alors que les souches isolées de cette espèce présentaient des pourcentages variant de 35 % à 87 %.

En deuxième lieu, l'étude de l'impact *in vitro* des facteurs abiotiques sur la viabilité des bactéries associées au pois bambara a été menée en vue de mettre en évidence leur diversité phénotypique et ensuite sélectionner les plus tolérantes.

Dans l'ensemble, toutes les bactéries de la collection ont toléré les concentrations élevées de NaCl. Cependant, la tolérance de souches diminuait progressivement avec l'augmentation de la concentration du NaCl quel que soit la nature du milieu. En effet, Tous les rhizobia ont été capables de tolérer 5 % de NaCl et tous les endophytes ont été capables de tolérer jusqu'à 6 % de NaCl. La souche RVC15 a été la plus tolérante de tous les rhizobia et les souches (RVC16 et RVC37) ont été les plus tolérantes des endophytes en milieu solide tandis qu'une seule souche (RVC16) a été plus la tolérante des endophytes en milieu liquide. Le seuil de tolérance a été de 10 % de NaCl pour 6,7 % des rhizobia et 2,2 à 4,4 % des endophytes respectivement sur milieu liquide et solide.

La tolérance de ces souches (RVC) à des concentrations élevées de sel pourrait s'expliquer par le fait que la concentration intracellulaire en NaCl des racines à partir desquelles ont été isolées les bactéries soit déjà élevée. En effet, le pois bambara (*Vigna subterranea*) figure parmi les légumineuses cultivées les plus tolérantes à la salinité (Suwanprasert *et al.*, 2006; Taffouo *et al.*, 2010). Généralement, la tolérance au sel qui caractérise les souches bactériennes pourrait être en rapport avec le taux de salinité du site d'isolement. Des résultats similaires ont été rapportés par Maâtallah *et al.* (2002) pour des souches de *Mesorhizobium* nodulant le pois chiche au Maroc et par Mohammed *et al.* (2000) pour des souches nodulant *Acacia* en Libye. La tolérance aux concentrations élevées en NaCl de certaines souches de rhizobia a été associée à leur capacité à limiter les effets négatifs causés par l'accumulation des osmolytes organiques de protection tels que des acides aminés (proline, la bétaine et le glutamate) ou les hydrates de carbone (Vriezen *et al.*, 2007). Ces derniers présenteraient un mécanisme d'accumulation intracellulaire de solutés organiques de faibles poids moléculaires permettant aux bactéries de surmonter l'effet du stress salin. Toutefois, certains auteurs ont attribué la tolérance des souches rhizobiales aux concentrations élevées de sel par la synthèse des exopolysaccharides (Hung *et*

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

al., 2005). En effet, certains exopolysaccharides synthétisés par certaines bactéries peuvent également se lier aux cations, y compris le Na^+ . Ils atténuent ainsi le stress de salinité en réduisant la teneur en Na^+ disponible pour l'absorption des plantes (Arora *et al.*, 2013).

Abdul-Wahab & Zahran (1979) et Zerhari *et al.* (2000) ont rapporté que les rhizobia, en général, supportent bien des concentrations de NaCl comprises entre 3 et 5 %. Belay & Fassil (2010) ont étudié des souches capables de croître à 5 % de NaCl. Hmaeid *et al.* (2018) ont isolé des RPCP de l'habitat naturel de *Sallua carmona* qui ont été capables de croître toutes à 5 % de NaCl. Par ailleurs, des rhizobia nodulant le funegreck ont été capables de croître à une concentration de NaCl aussi élevée que 2380 Mm (14 %) (Abdelmoumen *et al.*, 1999). Mais, Missbah *et al.* (1996) avaient isolé des rhizobia de *Ceratonia siliqua* qui ont eu une croissance normale seulement à 2 % de NaCl

Ibny *et al.* (2019) ont trouvé une concentration maximale de croissance de 7 % en NaCl pour les bactéries isolées de nodules de *Vigna subteraranea*. De plus, Hamaeid *et al.* (2018) ont étudié certaines souches de RPCP dont la croissance a été possible jusqu'à 10 % de NaCl. Pour certains auteurs, les limites de tolérance à la salinité entre les rhizobia peuvent varier considérablement d'une espèce à une autre et même entre les souches de la même espèce (Kassem *et al.*, 1985, Elsheikh & Wood, 1990 ; Rai, 2012).

Cette capacité de croissance des souches indigènes à des concentrations élevées de solution de chlorure de sodium peut donner une valeur concurrentielle de survie forte dans la rhizosphère et de nodulation des plantes hôtes en particulier à des concentrations élevées de sel dans le sol (Hung *et al.*, 2005 ; Singh *et al.*, 2008).

Siddikee *et al.* (2011), Chanratana *et al.* (2017) et León *et al.* (2018)) ont montré que l'utilisation des bactéries PCP peut améliorer la tolérance au sel en induisant la synthèse d'osmolytes.

L'étude de la tolérance au pH a révélé que l'ensemble des souches évaluées ont plus toléré les pH alcalins que les pH acides quel que soit la nature du milieu de culture. En effet, toutes les souches ont été capables de croître à des pH acides modérés, des pH neutres et des pH basiques (5 à 10), 60 % des rhizobia et 93,3 % des endophytes ont pu croître à un pH de l'ordre de 11. Toutefois, 46,7 % des rhizobia et 57,8 % des endophytes puis 13,3 % des rhizobia et 2,2 % des endophytes ont pu croître respectivement à des pH de l'ordre de 4 et 3,5. Dans l'ensemble, la gamme de tolérance a été de pH = 4 à pH = 11. Les souches rhizobiales RVC6, RVC9, RVC12, RVC23, RVC25 et RVC38) ont supporté mieux à la fois les milieux alcalins et les milieux acides en milieu solide alors que quatre souches (RVC6, RVC9 RVC23, RVC38) en

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

ont montré en milieu liquide. Les souches endophytiques RVC1, RVC2, RVC16, RVC20, RVC21, RVC29 et RVC30 ont supporté mieux à la fois les milieux alcalins et les milieux acides quel que soit le milieu de culture.

Cette gamme de tolérance au pH des souches locales pourrait être liée aux pH des différents sites sur lesquels ces bactéries ont été piégées et isolées. En effet, Cheriet (2016) a rapporté que la gamme de tolérance des souches au pH serait en rapport avec le pH du site de l'isolement des souches. Pour Graham *et al.* (1994), la tolérance des rhizobia aux pH acides pourrait être liée à la composition et à la structure de la membrane externe du rhizobium.

Des résultats similaires ont aussi été rapportés par El-Hilali (2006), Belay & Assefa (2010) et Cheriet (2016). En effet, ces auteurs ont étudié des bactéries qui avaient une très bonne croissance aux pH neutres, étaient majoritairement tolérantes aux pH alcalins et très sensibles aux pH acides. De plus, Gnanou *et al.* (2019) ont rapporté que les souches rhizobiales isolées des nodules de *Vigna subterranea*, piégées sur des sols provenant du Nord de la Côte d'Ivoire étaient capables de croître à des pH compris entre de 5,8 et 8,8. La différence de la gamme de tolérance au pH entre les souches étudiées par Gnanou *et al.* (2019) et les souches testées dans la présente étude serait liée à la localisation des sites de piégeage et d'isolement des bactéries. En effet, les souches étudiées par Gnanou *et al.* (2019) ont été piégées sur des sols provenant du Nord de la Côte d'Ivoire alors que les souches testées dans la présente étude ont été piégées sur des sols provenant de différents sites de la zone Daloa, située au Centre Ouest de la Côte d'Ivoire. Leite *et al.* (2018) ont testé deux souches de *Bradyrhizobium* qui ont été capables de croître à un intervalle de pH de 4-10. Aussi, Missbah *et al.* (1996) ont-ils isolé des rhizobia de *Ceratonia siliqua* qui n'ont pu croître qu'à des pH inférieur à 7, c'est-à-dire de 4,5 à 6.

Dans l'ensemble, les bactéries de la collection ont présenté une bonne thermotolérance. En effet, La majorité des souches ont présenté une bonne thermotolérance tant aux basses températures qu'aux hautes températures. Elles ont montré une bonne croissance entre 4 °C et 45 °C. En outre, 6,6 % des rhizobia et 26,7 % des endophytes ont survécu à 55 °C. Les souches rhizobiales (RVC12, RVC15, RVC25, RVC38, RVC45) et les souches endophytiques (RVC1, RVC7, RVC8, RVC55, RVC60, RVC61) ont été sélectionnées pour leur large gamme de tolérance. En fait, ces souches rhizobiales ont pu croître de +4 à 50 °C sauf la souche RVC12 qui a pu croître de 28 à 55 °C. Ces souches endophytiques quant à elles, ont pu croître de +4 à 55 °C.

Cette thermotolérance des souches aux températures extrêmes serait due à leur capacité à produire des protéines de stress thermique ou HSP (Heat Shock Proteins) de poids compris

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

entre 38 et 68 KDa. Ces protéines joueraient un rôle important dans la protection des organismes contre le stress thermique (Abou-Shanab, 2007). En revanche, l'inhibition de la croissance de certaines souches bactériennes locales à des températures élevées serait due à la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique. Alors que l'inhibition de la croissance d'autres souches à basses températures pourrait s'expliquer par la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes (Cloutier *et al.*, 1992)

Les souches bactériennes isolées de *Vigna subterranea* testées par Gnangu *et al.* (2019) ont présenté une température maximale de croissance de l'ordre de 45 °C. Des résultats similaires ont été rapportés par El-Hilali (2006) qui a étudié des souches nodulant le lupin ayant une thermotolérance allant de 4 à 42 °C. Aussi, De Lajudie *et al.* (1994), Zahran *et al.* (1994) et Missbah *et al.* (1996) ont-ils démontré que les rhizobia nodulant des arbres légumineux ont l'aptitude de tolérer une température de 40 °C.

Les rhizobia peuvent conserver une bonne performance quand ils sont utilisés dans un environnement aux conditions climatiques similaires à leur site d'origine. Cependant, plusieurs auteurs ont signalé qu'il n'existe aucune corrélation entre la température du site d'isolement et la tolérance des souches au stress thermique (Zahran *et al.*, 1994; Mohammed *et al.*, 2000 ; El-Hilali , 2006).

La variation dans les résultats sur milieux de culture (solide et liquide) lors de ces trois tests phénotypiques pourrait être dû au mode d'évaluation sur milieu solide. En effet, l'évaluation en milieu solide se fait par observation directe et dépend d'une part de l'appréciation du manipulateur. Elle a donc un caractère relatif contrairement au test sur milieu liquide dont les résultats sont donnés par lecture des densités optiques.

L'étude de la tolérance des souches testées aux engrais a montré que la tolérance des souches bactériennes aux différents engrais testés a varié en fonction de la formulation et de la concentration utilisée. En effet, La majorité des souches bactériennes se sont bien développées en présence des différents engrais testés quel que soit la dose appliquée mais à des degrés différents. Cependant, les souches rhizobiales (RVC12, RVC50) et les souches endophytiques (RVC36, RVC37, RVC62) ont été les plus sensibles et le NaNO₂ a été l'engrais le plus toxique.

La grande tolérance des souches vis-à-vis des engrais pourrait être due à leur capacité à dégrader différentes formes d'azote, de phosphore et de potassium contenues dans ces engrais grâce à la sécrétion d'enzymes spécifiques. Ces éléments (azote, phosphore et potassium) sont utilisés par ces bactéries pour leur croissance. Les degrés de développement sur le milieu de culture des colonies seraient liés à la production d'exopolysaccharides qui sont fonction de la souche, de

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

l'engrais et de la concentration considérée. La sensibilité des souches au nitrite de sodium (NaNO_2) pourrait s'expliquer par l'incapacité des souches à le dégrader et à l'utiliser comme source d'azote pour leur croissance.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par El-Hilali (2006) et Hajjam (2017) qui ont testé la capacité des souches bactériennes à hydrolyser l'urée et à réduire le nitrate. En général, il a été révélé que plus de la moitié des souches ont pu hydrolyser l'urée. Des différences de croissance ont été mises en évidence entre les souches isolées de la même région et à partir de la même espèce végétale, en particulier entre les souches de l'amas nodulaire. Pour le nitrate, la majorité des souches a pu le réduire contre certaines souches. La variabilité de l'aptitude à réduire le nitrate a été également rapportée chez différents rhizobia (Zahran, 1991). Munns (1968) a rapporté que la présence du nitrate dans le sol affecte la capacité de l'adsorption des rhizobia aux racines des plantes et inhibe leur capacité infective. Des travaux de Gibson & Harper (1985) ont montré que la sensibilité au nitrate peut varier entre les différentes souches de *Bradyrhizobium*, alors que les travaux de Martensson *et al.* (1989) ont montré que le nitrate affecte la compétition des souches de *Bradyrhizobium japonicum* pour infecter le soja.

L'aptitude à hydrolyser l'urée et à réduire le nitrate est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte pour la sélection d'une souche particulière. En fait, un excès de nitrate dans le sol peut exercer un effet inhibiteur sur l'adsorption des rhizobia sur la surface des racines (Sherwood *et al.*, 1984) ainsi que sur leur capacité infective et effective (Arreseigor *et al.*, 1997).

L'évaluation de l'effet des pesticides sur des bactéries dans la présente étude a montré que les pesticides utilisés ont affecté négativement la survie des souches excepté les insecticides qui ont été moins nocifs pour la viabilité des souches. Toutefois, la sensibilité des souches a varié en fonction de la nature du pesticide, de la formulation du pesticide et de la concentration utilisée. En effet, l'addition des herbicides aux milieux de cultures a révélé que le Roundup (Glyphosate) est extrêmement toxique pour les souches bactériennes quel que soit la dose appliquée contrairement à Herbo Select (Haloxypop-R-méthyl) qui a été toléré. Toutefois, les souches rhizobiales (RVC9, RVC12, RVC13) et les souches endophytiques (RVC57, RVC62) ont toléré le Roundup. Aussi, les souches rhizobiales (RVC11, RVC12, RVC23, RVC47, RVC50) et 51,1 % des endophytes ont été sensibles à l'Herbo Select.

Des résultats similaires ont été rapportés par Konaté *et al.*, (2015) qui ont montré que le Roundup était extrêmement toxique pour les Rhizobactéries. Cependant, Haney *et al.*, (2000) ont signalé que dans certains cas, le glyphosate peut stimuler l'activité microbienne en

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

augmentant le carbone et la minéralisation de l'azote par les bactéries. En plus, Araújo *et al.*, (2003) ont suggéré que certains micro-organismes dans le sol sont capables d'utiliser le glyphosate comme une source facilement disponible en Carbone. D'autre part, le glyphosate, ou ses sous-produits, pourrait engendrer une perturbation dans l'équilibre trophique qui freine la concurrence pour les nutriments parmi les microbes du sol (Yu *et al.*, 2010).

Les fongicides appliqués dans cette étude ont été très toxiques pour les souches. Toutefois, la toxicité du fongicide Ivory (Mancozèbe) a été plus élevée par rapport à celle d'Antracol (Propineb), quel que soit les doses appliquées. Les souches rhizobiales S1021 et STM 183 et les souches endophytiques RVC21 et RVC22 ont toléré Antracol (Propinèbe). Ces résultats corroborent ceux de Drouin *et al.* (2010) qui ont rapporté que différents types de fongicides inhibé la croissance des souches de *Bradyrhizobium*. Les travaux de Mohamed, (2018) stipulent que les bactéries fixatrices d'azote ont une grande sensibilité vis-à-vis des fongicides. Par ailleurs, Curley & Burton, (1975) ont montré que le fongicide Thiran n'affecte pas la survie de *Bradyrhizobium japonicum*. Ces auteurs ont suggéré qu'en condition de champ, une concentration optimale de fongicides augmenterait la nodulation chez le soja.

Les insecticides Cypercal (Cyperméthrine) K-optimal (Lambdacyhalotrine+Acétamipride) ont été moins toxiques que les fongicides pour les souches. Toutefois, les endophytes ont été plus sensibles ((51,1 %) aux deux insectides que les rhizobia dont les RVC11, RVC12, RVC13, RVC23, RVC25, RVC28, RVC33 et RVC34 (44,4 %) ont été sensibles au K-optimal et les souches RVC11, RVC12 et RVC23 (16,7 %) ont été sensibles au Cypercal.

Selon les lignes directrices pour l'approbation des pesticides, l'information sur les effets des pesticides sur les microorganismes du sol et la fertilité du sol est nécessaire. Mais les relations entre différentes structures de pesticides et la croissance de divers groupes de micro-organismes du sol ne sont pas facilement prédites (Ahmed & Ahmad, 2006). Certains pesticides peuvent stimuler la croissance des micro-organismes. C'est le cas des insecticides appliqués dans cette étude. Ils ont été largement tolérés par les différentes souches. Ces résultats confirment ceux de Ramdani & Hadroug, (2017) qui ont montré la faible toxicité des insecticides sur un grand nombre de Rhizobia.

Enfin, pour sélectionner les souches efficaces ayant des activités PCP performantes afin de les proposer comme bio-fertilisants, leurs capacités à solubiliser le phosphate inorganique, à produire l'Acide Indole-3-Acétique et les sidérophores ont été évaluées.

L'étude de la production de l'AIA par les souches bactériennes isolées des nodules du pois bambara a montré une grande variabilité entre les quantités produites. En effet, 100 % des

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

souches ont été capables de produire les quantités détectables d'AIA et 13,3 % ont produit des quantités supérieures à 200 µg/mL. Les quantités d'AIA produites ont varié de 19,75 à 231,08 µg/mL chez les rhizobia et de 16,3 à 275,5 µg/mL chez les endophytes. Ces souches sont des grandes productrices de l'AIA. Les meilleures productrices d'AIA sont les souches rhizobiales RVC13 (*Rhizobium sp.*) et RVC45 (*Badyrhizobium yanmingense*) et les souches endophytiques RVC36 (*Pseudomonas sp.*), RVC37 (*Bacillus sp.*), RVC39 (*Brevibacillus*), RVC40 (*Curtobacterium*), RVC41 (*Bacillus cereus*) et RVC60 (*Bacillus subtilis*).

Cette aptitude des souches testées à produire l'AIA pourrait être en rapport avec le fait que les nodules des racines des plantes légumineuses contiennent des quantités appréciables d'AIA. En effet, cette phytohormone est impliquée dans le développement de la symbiose légumineuse-rhizobia (Desbrosses & Stougaard 2011 ; Duca *et al.*, 2014). Il a été signalé que cette hormone agirait comme une molécule de signal impliquée dans l'attachement des bactéries dans la racine qui aide à l'établissement de la symbiose légumineuse-*Rhizobium* (Spaepen *et al.*, 2007)

Ibny *et al.* (2019) ont étudié des souches de *Vigna subterranea* dont la plus grande productrice était la souche proche de *Badyrhizobium elkanii* et *Badyrhizobium pachyrhizi* avec une concentration d'AIA de 69,71 µg.mL⁻¹. Cette grande différence dans la production de l'AIA par les souches testées dans la présente étude et les souches étudiées par Ibny *et al.* (2019), toutes isolées des nodules du pois bambara pourrait s'expliquer par le fait que la production d'AIA par les RPCP peut varier selon la nature des espèces et des souches (Compant *et al.*, 2010).

Kumar *et al.* (2012) ont trouvé une plage de production d'AIA de 0,2 à 213 µg/mL. Ces mêmes observations ont été faites par Bouchiba (2018) avec des souches isolées de *Scorpiurus muricatus* ssp. *Sulcatus* qui ont présenté des taux de production d'AIA, très variables, allant de 1,8 µg/mL à 135 µg/mL. La production de cette auxine a été rapportée pour différents genres de rhizobia tels que : *Rhizobium* (Flores-Félix *et al.*, 2013), *Ensifer* (Dubey *et al.*, 2010), *Mesorhizobium* (Wdowiak-Wróbel & Małek, 2016), *Bradyrhizobium* (Valdez *et al.*, 2016) et *Allorhizobium* (Ghosh *et al.*, 2015). Cette capacité de production d'AIA a été aussi signalée pour les endophytes de nodules de légumineuses (Subramanian *et al.*, 2015 ; de Almeida Lopes *et al.*, 2016).

Dans l'exploitation de leur capacité à solubiliser le phosphate, notons que les souches bactériennes testées ont montré une variabilité dans leur capacité à solubiliser le phosphate. En effet, 40 % des rhizobia et 31,1 % des endophytes ont solubilisé des quantités supérieures à 200 µg/mL. Cependant les trois meilleures P-solubilisatrices endophytiques RVC29 (*Pseudomonas poae*), RVC1 (*Bacillus subtilis*), RVC4 (*Bacillus ginsengisoli*) ont solubilisé des quantités

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

supérieures à 400 µg/mL contre la meilleure P-solubilisatrice rhizobiale RVC12 (*Rhizobium sp.*) qui a solubilisé 339,84 µg/mL. La plupart des souches a manifesté de grandes capacités solubilisatrices de phosphate. Ainsi, la plage de phosphate solubilisé était de 66,90 à 339,84 µg/ml chez les rhizobia et de 9 à 435,45 µg/ml chez les endophytes.

Cette grande aptitude de solubilisation du phosphate de certaines souches serait liée à leurs caractéristiques intrinsèques. En effet, certains genres sont réputés pour leur capacité à solubiliser le phosphate. Ainsi, Rivas *et al.* (2006) et Dudeja (2016) ont rapporté que les espèces appartenant aux genres *Bacillus*, *Rhizobium* et *Pseudomonas* sont considérées comme les espèces solubilisatrices de phosphate les plus efficaces. Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux d'Ibny *et al.* (2019), qui ont testé des isolats de *Vigna subterranea* ayant des grandes capacités de solubilisation de phosphate dont la taille de la zone de halo produite a varié de 20 mm à 100 mm. De plus, Ferchichi *et al.* (2019) ont trouvé des résultats similaires en montrant que les isolats de lupin ont pu solubiliser le phosphate jusqu'à une quantité de 320,27 µg/mL. Par ailleurs, la capacité des rhizobia à solubiliser le phosphate est bien connue depuis longtemps (Chabot *et al.*, 1996; Peix *et al.*, 2001). Aussi, la capacité à solubiliser le phosphate a été largement observée dans les endophytes de nodules de légumineuses (Saïdi *et al.*, 2013 ; Pandya *et al.*, 2015 et Saini *et al.*, 2015).

La solubilisation du phosphate inorganique est l'un des principaux mécanismes de promotion de la croissance des plantes par les bactéries associées (Oteino *et al.*, 2015). En effet, les micro-organismes du sol sont impliqués dans une série de processus qui affectent la transformation de phosphate et influencent la disponibilité subséquente de phosphate aux racines des plantes (Ahemad & Kibret, 2014; Gupta *et al.* 2015).

Pour la recherche de la production de sidérophore, il faut savoir que la majorité des souches ont pu produire les siderophores. En effet, 86,7 % des rhizobia et 93,3 % des endophytes ont été capables de produire des sidérophores. Les diamètres des halos sont compris entre 11 et 33 mm chez les rhizobia puis entre 7,06 et 40 mm chez les endophytes. Les indices sont de 2,03 à 3,69 chez les rhizobia puis de 1,07 à 5,36 chez les endophytes. Les bactéries testées ont montré de grandes capacités de production de sidérophores et les meilleures productrices de sidérophore sont les souches rhizobiales RVC28 (*Rhizobium sp.*), RVC25 (*Rhizobium alamii*), RVC23 (*Rhizobium sp.*) et RVC50 (*Rhizobium sp.*) et les souches endophytiques souches RVC29 (*Pseudomonas poae*), RVC22 (*Pseudomonas libanensis*), RVC21 (*Pseudomonas azotoformans*).

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Diverses études ont mis en évidence des bactéries productrices de sidérophore appartenant aux genres *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Streptomyces* de la rhizosphère et à d'autres groupes de micro-organismes (Kuffner *et al.*, 2008; Omidvari *et al.*, 2010 ; Sayed *et al.*, 2005). Le fer est un élément de croissance essentiel pour tous les organismes vivants. La rareté du fer dans les habitats du sol et à la surface des plantes suscite une très grande concurrence (Whipps, 2001). Les sidérophores ont été impliqués dans l'amélioration directe et indirecte de la croissance des plantes par des RPCP (Mehnaz, 2013; Sujatha & Ammani, 2013).

La majorité des souches isolées des nodules du pois bambara ont montré de grandes potentialités capables de favoriser la croissance des plantes par la production d'AIA, la production de sidérophore et la solubilisation du phosphate. En effet, Parmi les souches testées, certaines ont présenté des résultats appréciables dans chacune des trois activités PCP évaluées. Ainsi, Les souches RVC4, RVC13, RVC22, RVC29, RVC30, RVC36, RVC37, RVC38, RVC41, RVC42, RVC45, RVC60 et RVC61 ont présenté de bons résultats aussi bien dans la solubilisation du phosphate, la production de l'AIA que dans la production de sidérophore. Cette étude confirme les résultats rapportés par Kuklinsky-Sobral *et al.* (2004) qui ont étudié des endophytes nodulaires isolés du soja.

Les interactions entre les plantes et les bactéries se traduisent par des processus symbiotiques, endophytiques ou pathogènes avec des sources microbiennes distinctes se trouvant à proximité autour des racines et à partir du sol environnant. Ces microorganismes procurent à la plante beaucoup d'avantages et contribuent à l'amélioration de sa croissance à travers plusieurs mécanismes tels que la synthèse des phytohormones comme l'Acide Indole-3-Acétique, (Naureen *et al.*, 2017) l'amélioration de la nutrition minérale par la solubilisation du phosphate (Alori *et al.*, 2017) et la sécrétion des sidérophores (Glick, 2012). Ainsi, l'utilisation d'inoculum bactérien favorisant la croissance des plantes comme bio-fertilisants microbiens vivants, constitue une alternative prometteuse aux engrais chimiques et aux pesticides (Oteino *et al.*, 2015).

3.5- Conclusion partielle

La majorité des rhizobia (86,7 %) sont des bactéries à croissance rapide et ont assimilé tous les sucres testés. Les souches RVC11 et RVC45 (13,3 %) sont des bactéries à croissance lente et n'ont pas pu croître en présence du Tréhalose et Maltose. Ces bactéries ont pu réinfecter et reformer les nodules fonctionnels tant avec les plantes de leur morphotype d'origine qu'avec le morphotype Ci3. Les rhizoba nodulant le pois bambara ont présenté une grande variabilité dans leur capacité infective et fixatrice impactant ainsi les caractères morpho-agronomiques.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

L'inoculation a amélioré la croissance et le développement des plantes par rapport aux témoins négatifs et même les témoins positifs pour certaines. Cependant l'effet de l'inoculation a varié en fonction de la souche rhizobiale révélant ainsi une grande diversité phénotypique entre ces rhizobia. Les souches RVC50, RVC38, RVC25, RVC13 et RVC28 ont été identifiées comme les plus efficaces.

L'ensemble des bactéries de la collection a montré une très bonne tolérance aux concentrations élevées de NaCl et le seuil de tolérance a été de 10 % de NaCl. La souche rhizobiale RVC15 pourrait survivre puis préserver sa capacité infective sous stress salin. Aussi les souches endophytiques RVC16 et RVC37 pourraient-elles survivre puis améliorer leurs activités PCP sous stress salin.

Les souches rhizobiales et endophytiques évaluées ont plus toléré les pH alcalins que les pH acides. Toutes les souches ont présenté une tolérance de 100% aux pH variant entre 5 et 10. Par conséquent, la sélection de souches tolérantes à un pH neutre ou alcalin est très large. Parallèlement, les souches rhizobiales (RVC13, RVC38) et la souche endophytique RVC2 pourraient survivre sur des sites à pH très bas. Les souches rhizobiales (RVC6, RVC9, RVC23, RVC38) et les souches endophytiques (RVC1, RVC2, RVC16, RVC20, RVC21, RVC29, RVC30) ont présenté une grande plasticité dans la tolérance au pH allant de pH = 4 à pH = 11. Les souches bactériennes testées ont montré une large gamme de tolérance à la température. Ainsi, les souches rhizobiales RVC15, RVC25, RVC38 et RVC45 ont pu croître de +4 à 50 °C et la souche rhizobiale RVC12 qui a pu croître de 28 à 55 °C. Les souches endophytiques RVC1, RVC7, RVC8, RVC55, RVC60 et RVC61 ont pu croître de +4 à 55 °C. D'après les résultats des tests aux stress environnementaux, une grande plasticité de tolérance au pH, à la salinité et à la température a été observée pour l'ensemble des souches dans cette étude. Par conséquent, la sélection de souches hautement tolérantes est très large. La plupart des souches bactériennes s'est bien développée en présence des différents engrais testés. Cependant, les souches rhizobiales (RVC12, RVC50) et les souches endophytiques (RVC36, RVC37, RVC62) ont été les plus sensibles. Le NaNO₂ a été l'engrais le plus toxique pour les souches étudiées. Les insecticides et l'herbicide Herbo Select (Haloxypop-R-méthyl) ont été largement tolérés par les souches tandis que les fongicides et l'herbicide Roundup (Glyphosate) ont été très toxiques pour les souches. Toutefois, les souches rhizobiales (RVC9, RVC12, RVC13) et les souches endophytiques (RVC57, RVC62) ont toléré Roundup (Glyphosate). Les souches de référence (S1021, STM) et les souches endophytiques (RVC21 et RVC22) ont toléré l'Antracol (Propineb).

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Les rhizobia et les endophytes isolés des nodules du pois bambara ont montré dans l'ensemble de grandes capacités à solubiliser le phosphate et à produire l'AIA et les sidérophores. Cependant, elles ont montré une différence dans leur capacité à solubiliser le phosphate, à produire l'AIA et les sidérophores, leur conférant des potentialités variables dans la promotion de la croissance des plantes. Ainsi, les quantités d'AIA produites ont varié de 19,75 µg/mL à 231,08 µg/mL chez les rhizobia et de 16,3 à 275,5 µg/mL chez les endophytes. Les souches rhizobiales (RVC45, RVC13) et les souches endophytiques (RVC36, RVC37, RVC39, RVC40, RVC41, RVC60) ont été les meilleures productrices d'AIA. La plage de phosphate solubilisé a varié de 66,90 µg/mL à 339,84 µg/mL chez les rhizobia et de 9 µg/mL à 435,45 µg/mL chez les endophytes. Les souches rhizobiales (RVC12, RVC45) et les souches endophytiques (RVC1, RVC4, RVC29) ont été les meilleures solubilisatrices de phosphate. Les diamètres des halos de production de sidérophore sont compris entre 11 mm et 33 mm chez les rhizobia puis entre mm 7,06 et 40 mm chez les endophytes. Les indices de production de sidérophore sont rangés de 2,03 à 3,69 chez les rhizobia puis de 1,07 à 5,36 chez les endophytes. Les souches rhizobiales (RVC23, RVC25, RVC28) et les souches endophytiques (RVC21, RVC22, RVC29) ont été les meilleures productrices de sidérophores. Les souches RVC4, RVC13, RVC22, RVC29, RVC30, RVC36, RVC37, RVC38, RVC41, RVC42, RVC45, RVC60 et RVC61 ont présenté de bons résultats aussi bien dans la solubilisation du phosphate, la production de l'AIA que dans la production de sidérophore.

Ces souches pourraient contribuer à améliorer la culture et la production du pois bambara et bien d'autres plantes.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 4: EFFETS DE QUELQUES SOUCHES BACTERIENNES ET ENGRAIS CHIMIQUES SUR LE DEVELOPPEMENT ET LA PRODUCTION DES PLANTES DU POIS BAMBARA

Les effets de l'inoculation sur le développement et la production des plantes du pois bambara ont été évalués par comparaison des caractères des plantes inoculées avec ceux des plantes fertilisées et du témoin non inoculé et non azoté (N-).

Au total, les effets de 19 souches locales (8 rhizobia et 11 endophytes) ayant présenté les meilleurs effets stimulateurs de croissance *in vitro*, trois souches étrangères et cinq engrais chimiques ont été évalués.

4.1- Effets quelques souches bactériennes et engrais chimiques sur le développement des plantes du pois bambara

Les effets de l'inoculation et la fertilisation sur la croissance des plantes sont consignés dans le tableau LXII. L'analyse de la variance (ANOVA) a montré une différence significative ($P < 0,05$) entre les hauteurs de plante, les nombres de feuilles, les surfaces foliaires et les biomasses des plantules.

Les plantes inoculées ont toutes présenté des tailles plus grandes que celles du témoin négatif puis souvent des tailles égales à celles des plantes fertilisées (témoin positif). Toutefois, la plante inoculée avec la souche RVC25 (26,97 cm) a présenté la plus grande taille. En effet, les hauteurs des plantules inoculées ont varié de 23,90 cm pour les plantes inoculées avec la souche RVC40 à 26,97 cm pour les plantes inoculées avec la souche RVC25. Les hauteurs des plantules fertilisées ont varié de 22 cm pour les plantes fertilisées avec l'Urée rouge à 25,95 cm pour les plantes fertilisées avec le Nutrigofol. La hauteur du témoin négatif était de 19,33 cm.

Les plantes inoculées ont toutes présenté des nombres de feuilles élevés que celui du témoin négatif mais similaires dans l'ensemble à ceux des plantes fertilisées. Toutefois, les plantes inoculées avec les souches RVC25, RVC41, RVC45, S1021 et L01 ont présenté les plus grands nombres de feuilles que les plantes fertilisées avec les engrais autre que le KNO_3 . En effet, Les nombres de feuilles des plantules inoculées ont varié de 20 pour les plantes inoculées avec la souche RVC4 à 30 pour les plantes inoculées avec les souches RVC25, RVC41, RVC45, S1021 et L01. Les nombres de feuilles des plantules fertilisées ont varié de 22 pour les plantes fertilisées avec le Fertileg à 33 pour les plantes fertilisées avec KNO_3 . Le nombre de feuilles du témoin négatif était de 18.

Les plantes inoculées ont toutes présenté des surfaces foliaires plus grandes que celle du témoin négatif puis souvent des tailles plus grandes que celles des plantes fertilisées. L'urée a induit

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

le meilleur résultat avec 17,86 cm². En effet, les surfaces foliaires des plantules inoculées ont varié de 9,96 cm² pour les plantes inoculées avec la souche RVC36 à 15,39 cm² pour les plantes inoculées avec la souche RVC45. Les surfaces foliaires des plantules fertilisées ont varié de 11,63 cm² pour les plantes fertilisées avec l'Urée rouge à 17,86 cm² pour les plantes fertilisées avec l'Urée. La surface foliaire du témoin négatif était de 0,39 cm².

Les plantes inoculées ont toutes obtenu des biomasses sèches racinaires élevées que celle du témoin négatif mais similaires dans l'ensemble que celles des plantes fertilisées sauf la plante fertilisée avec l'urée qui a induit le meilleur résultat avec 1,1 g/plante. En effet, les poids secs racinaires des plantules inoculées ont varié de 0,51 g/plante pour les plantes inoculées avec la souche RVC40 à 0,88 g/plante pour les plantes inoculées avec la souche S1021. Les poids secs racinaires des plantules fertilisées ont varié de 0,42 g/plante pour les plantes fertilisées avec l'Urée rouge à de 1,1 g/plante pour les plantes fertilisées avec l'Urée. Le poids sec racinaire du témoin négatif était de 0,39 g/plante.

Les plantes inoculées ont toutes présenté des biomasses sèches aériennes élevées que celle du témoin négatif mais similaires en général à celles des plantes fertilisées sauf la plante fertilisée avec le KNO₃ qui a obtenu un résultat de 2,50 g/plante. Toutefois, les plantes inoculées avec les souches RVC25, RVC45 et L01 ont présentés les meilleures biomasses sèches aériennes que les plantes fertilisées avec les autres engrais. En effet, Les poids secs aériens des plantules inoculées ont varié de 1,27 g/plante pour les plantes inoculées avec la souche RVC36 à 2,30 g/plante pour les plantes inoculées avec la souche RVC25. Les poids secs aériens des plantules fertilisées ont varié de 1,47 g/plante pour les plantes fertilisées avec l'Urée rouge à de 2,50 g/plante pour les plantes fertilisées avec le KNO₃. Le poids sec aérien du témoin négatif était de 1 g/plante.

Dans l'ensemble, Toutes les souches testées ont amélioré la taille, la surface foliaire, le nombre de feuilles, la biomasse des plantes inoculées comparativement aux témoins non inoculés et non azotés et même aux témoins azotés pour certaines. Toutefois, l'effet de l'inoculation a varié en fonction de la souche et l'effet de la fertilisation en fonction de la formulation de l'engrais. Ainsi, les souches RVC25, RVC41, RVC45, S1021 et L01 ont été identifiées comme les meilleures stimulatrices de croissance.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau LXII : Paramètres de croissance des plantes inoculées et des plantes fertilisées du cultivar Ci3 du pois bambara

Traitement	Hauteur plante (cm/pl)	Nombre de foliole	Surface foliaire (cm ²)	Poids sec racinaire (g/pl)	Poids sec aérien (g/pl)
RVC1	24,13±1,83cdef	25±2cde	11,63±1,2cdef	0,68±0,15bce	1,73±0,46bcd
RVC4	24,53±1,79bce	28±4abd	14,16±2,6bc	0,86±0,21ab	1,98±0,38bcd
RVC12	25,77±1,88bcd	20±1ef	12,89±1,33bcd	0,81±0,17ab	1,64±0,51bce
RVC13	25,43±1,54bce	29±2abc	15,26±2,5ab	0,86±0,21ab	2,08±0,38bcd
RVC21	25,11±2,08bcde	29±4abc	11,23±2,1cdef	0,61±1,3bcde	1,85±0,25bcd
RVC22	26,47±0,89abcd	24±3cde	12,36±1,23cdef	0,72±0,12bc	1,67±0,41bcde
RVC23	26,17±2,47bcd	25±2cde	11,88±2,5cdef	0,60±0,09bce	1,87±0,28bcd
RVC25	26,97±1,22a	30±3ab	12,89±1,33bcd	0,82±0,19ab	2,30±0,26b
RVC28	26,10±0,73bcd	25±2cde	14,16±2,6bc	0,73±0,13bc	1,75±0,24bcd
RVC29	25,41±1,54bce	29±2abc	15,26±2,5ab	0,83±0,21ab	2,14±0,38bc
RVC36	25,3±0,77bcde	24±2cde	9,96±1,77gdef	0,80±0,14ab	1,27±0,21de
RVC37	24,53±1,79bce	26±5cd	14,11±1,33bc	0,53±0,15cde	1,54±0,25cde
RVC38	24,33±1,89bce	27±4bcd	13,14±1,8bcd	0,63±0,22bce	1,89±0,54bcd
RVC39	24,00±1,85efg	26±3cd	12,80±1,77bcde	0,65±0,08	1,43±0,45de
RVC40	23,90±2,1efg	29±3abc	11,57±2,08cdef	0,51±17cde	1,42±0,31de
RVC41	26,67±1,89ab	30±6ab	14,11±1,33bc	0,81±0,21ab	1,88±0,34bcd
RVC45	26,46±1,22abcd	30±3ab	15,39±2,4ab	0,84±0,19ab	2,28±0,26b
RVC50	26,57±2,03abc	28±4abd	12,38±1,44cdef	0,80±0,21ab	1,96±0,34bcd
RVC60	24,10±1,9defg	25±2cde	10,05±0,64ef	0,52±0,11cde	1,33±0,33de
L01	25,70±2,34bcd	30±2ab	12,72±1,34bcde	0,82±0,17ab	2,28±0,62b
S1021	26,33±1,77abcd	30±4ab	12,60±0,96cdef	0,88±0,19ab	2,00±0,46bcd
STM	24,13±1,83cdef	26±1cd	11,63±1,2cdef	0,66±0,15bce	1,73±0,47bcd
FL	24,43±2,11bce	22±3def	12,01±2,3cdef	0,76±0,16bc	1,56±0,37cde
NG	25,93±1,33bcd	23±5def	13,17±2,55bcd	0,53±0,12cdef	1,82±0,44bcd
LDC	22,93±1,66g	27±2bcd	11,16±1,55def	0,42±0,07ef	1,47±0,36cde
UB	23,23±1,5fg	26±4cde	17,86±2,33a	1,11±0,25a	2,12±0,62bc
KNO3	24,93±1,3bcde	33±3a	13,45±2,03bcd	0,44±0,09ef	2,50±0,45a
N-	19,33±0,9h	18±3f	7,05±0,13g	0,39±0,1f	1,00±0,2 ^e

Dans chaque colonne les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ (test de Newman-Keuls). **UB** : Urée blanche ; **FL** : Fertileg ; **Ng** : Nutrigofol ; **LDC** : urée rouge ;

L'efficacité de l'inoculation sur le développement a été évaluée par comparaison de la biomasse sèche des plantes inoculées avec celle du témoin non inoculé et non azoté (N-) et celles des plantes fertilisées.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

Toutes les souches testées ont amélioré la croissance des plantes inoculées et des plantes fertilisées comparativement aux témoins non inoculés et non azotés et même aux témoins azotés pour certaines (Figure 56).

Les résultats du calcul d'indice d'efficacité de l'inoculation et de la fertilisation, ont permis de classer les souches bactériennes et les engrais en trois catégories ; inefficace, moyennement efficace et hautement efficace selon les proportions.

En effet, la plupart (63,15 %) des souches locales, la souche de référence STM et trois engrais (Urée rouge, Nutrigofol et Fertileg) ont présenté des valeurs comprises entre 25 et 75 %. Alors, ces bactéries et engrais ont été considérés comme étant moyennement efficaces. L'Urée, deux souches de référence (S1021 et L01) et sept souches autochtones (RVC25, RVC13, RVC45, RVC4, RVC29, RVC41, et RVC50) ayant montré des indices supérieurs à 75 % ont été considérées comme hautement efficaces. De plus, les souches autochtones RVC25 (114 %), RVC45 (112 %), RVC29 (103 %), RVC13 (100 %), la souche de référence L01 (112 %) et Urée (121 %) qui ont montré des indices supérieurs à 100 % avaient induit les meilleurs impacts sur la croissance des plantes du pois bambara.

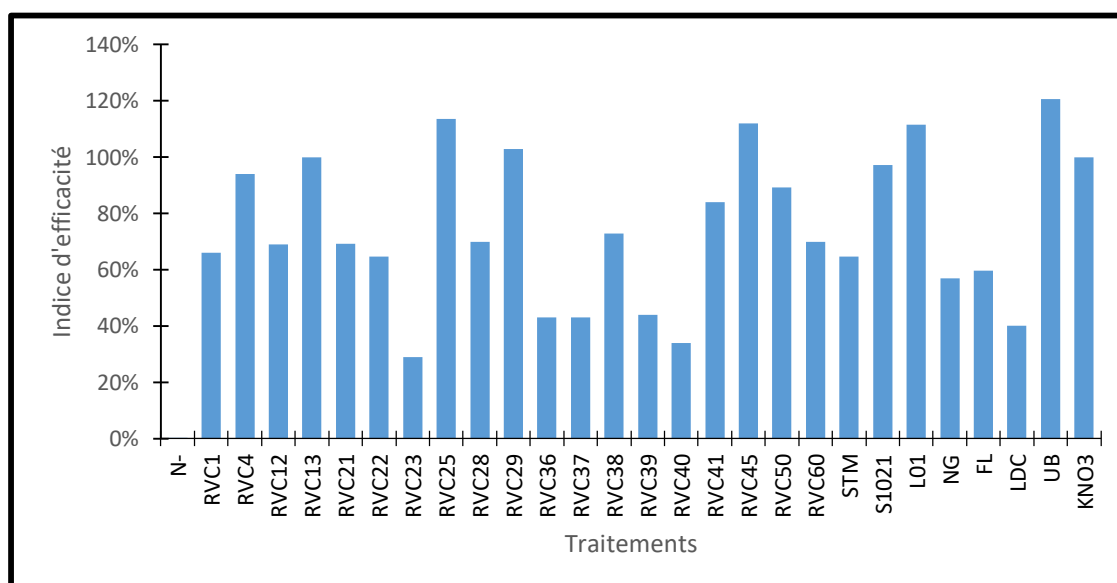


Figure 28 : Efficacité des inocula bactériens et des engrais sur la croissance des plantes du cultivar Ci3 du pois bambara

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

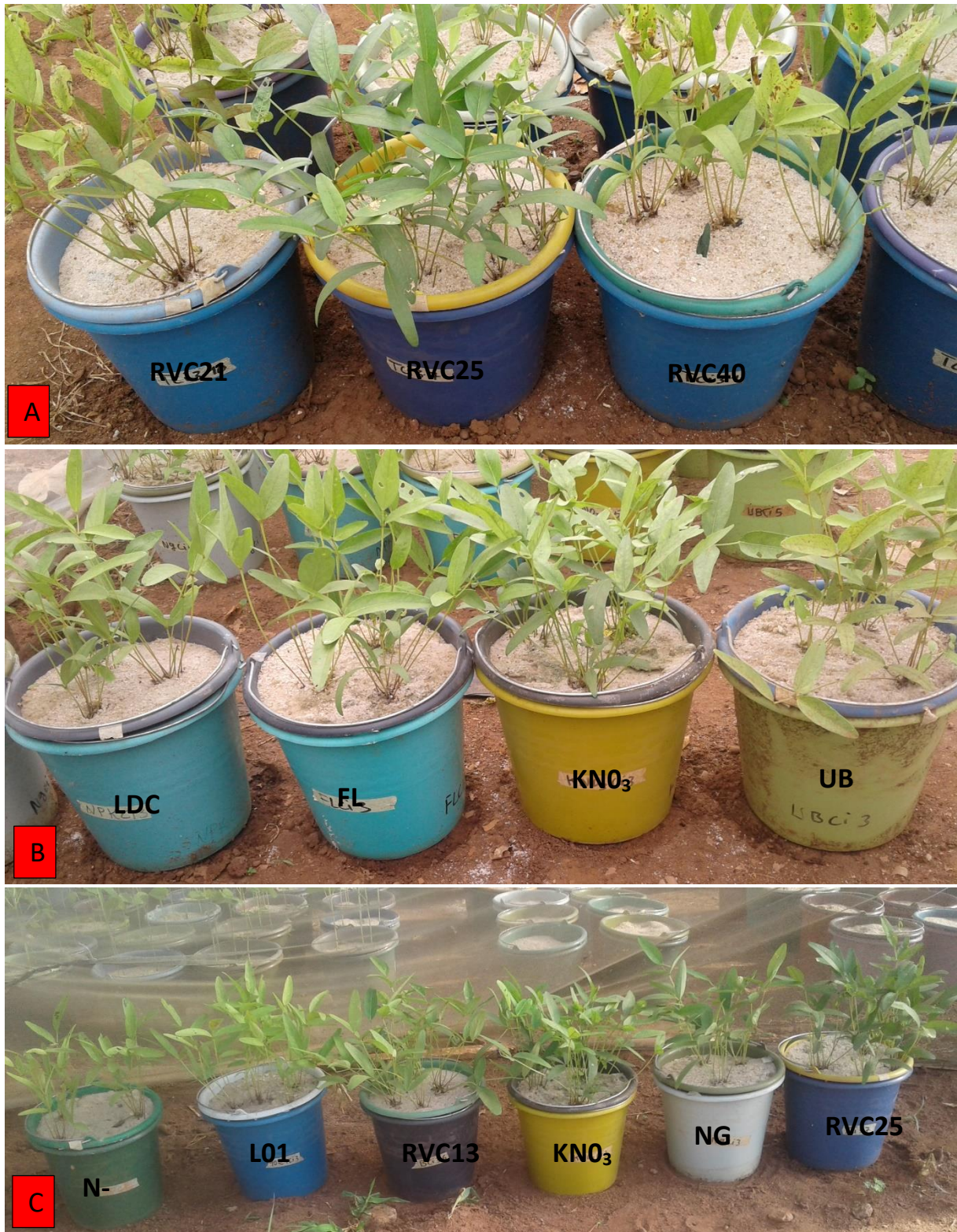


Figure 29 : Croissance des plantes inoculées et des plantes fertilisées du cultivar Ci3 du pois bambara 28 jours après inoculation

(A) : plantes inoculées, (B) : plantes fertilisées, (C) : effet comparé de l'inoculation et de la fertilisation sur la croissance des plantes

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

4.2- Effets de quelques souches bactériennes et engrais chimiques sur le rendement en gousses des plantes du pois bambara

Les effets de l'inoculation et la fertilisation sur la production en gousses des plantes sont consignés dans le tableau LXIII. L'analyse de la variance (ANOVA) a montré une différence significative ($P < 0,05$) entre les nombres de gousses et les poids secs de nodules.

Les plantes inoculées ont toutes présenté des nombres, des poids frais et poids secs de gousses plus élevés que ceux du témoin négatif mais similaires en général à ceux et les plantes fertilisées. Toutefois, les souches RVC22, RVC36, RVC37, RVC39 et RVC40 ont induit des gousses moins nombreuses et moins grosses comparées à celles des plantes fertilisées. En effet, la souche RVC38 et l'Urée rouge ont induit des gousses plus nombreuses et plus grosses que celles de toutes les souches de référence testées. La souche RVC41 deux engrais (Urée et Fertileg) ont généré des gousses plus nombreuses et plus grosses que de 57,9 % des souches autochtones, des trois souches de référence. Les souches RVC4, RVC13, RVC25, RVC29 et RVC45 ont induit des gousses plus nombreuses et plus grosses que celles de trois engrais (Urée rouge, Urée et Fertileg). Uniquement le Nutrigofol a été plus performant que toutes les souches bactériennes. Il faut noter que 14 souches autochtones et toutes les souches de référence ont été plus performantes que le nitrate de sodium (KNO_3). Cependant les souches de référence ont montré des résultats peu satisfaisants. Les plantes inoculées avec la souche RVC39 et les plantes non inoculées et non fertilisées ont présenté les gousses plus petites et les moins nombreuses. Les nombres de gousses des plantes inoculées ont varié de 2 pour les plantes inoculées avec la souche RVC39 à 22 pour les plantes inoculées avec la souche RVC45. Les nombres de gousses des plantes fertilisées ont varié de 5 pour les plantes fertilisées avec le KNO_3 à 25 pour les plantes fertilisées avec le Nutrigofol. Le nombre de gousses du témoin négatif était de 2. Les poids frais de gousses des plantes inoculées ont varié de 7,1 g/plante pour les plantes inoculées avec la souche RVC39 à 134,85 g/plante pour les plantes inoculées avec la souche RVC29. Les poids frais de gousses des plantes fertilisées ont varié de 9,65 g/plante pour les plantes fertilisées avec le KNO_3 à 140,85 g/plante pour les plantes fertilisées avec le Nutrigofol. Le poids frais de gousses du témoin négatif était de 6,30 g/plante. Les poids secs de gousses des plantes inoculées ont varié de 1,21 g/plante pour les plantes inoculées avec la souche RVC39 à 24,47 g/plante pour les plantes inoculées avec la souche RVC29. Les poids secs de gousses des plantes fertilisées ont varié de 4,85 g/plante pour les plantes fertilisées avec le KNO_3 à 27,05 g/plante pour les plantes fertilisées avec le Nutrigofol. Le poids frais de gousses du témoin négatif était de 1,1 g/plante.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

D'une manière générale, l'inoculation amélioré le rendement en gousses des plantes par rapport à celui du témoin négatif (N-) et à celui des plantes fertilisées pour certaines. Toutefois, l'effet de l'inoculation a varié en fonction de la souche et l'effet de la fertilisation en fonction de la formulation de l'engrais chimique. Les souches RVC4, RVC13, RVC25, RVC29, RVC38, RVC41 et RVC45 se sont démarquées en induisant les rendements similaires ou plus importants que les engrais.

Tableau LXIII : Paramètres du rendement en gousses des plantes inoculées et des plantes fertilisées du cultivar Ci3 du pois bambara

Traitements	Nombre gousses	Poids frais gousse (g/pl)	Poids sec gousse (g/pl)
RVC1	8±3fghi	46,33±18,2 fghi	7,58±1,5 fghi
RVC4	18±4b	94,60±9,77b	14,91±2,9 bcd
RVC12	7±3fghij	37,07±11,3 ghijk	6,07±1,55 fghik
RVC13	20±3ab	104,60±9,77b	15,11±2,9 bcd
RVC21	10±4 efg	55,60±17,4 cdefg	9,10±2,1 cdefg
RVC22	4±2 ghij	22,24±7,2 hijk	3,64±0,45 ghik
RVC23	6±1 fghij	35,21±9,1ghijk	5,76±1,78 fghik
RVC25	20±6ab	128±15,2ab	21,12±0,41 ab
RVC28	8±3fghi	46,33±18,2 fghi	7,58±1,5 fghi
RVC29	21±6ab	134,85±27,8ab	24,47±2,55 ab
RVC36	5±3 ghij	27,80±8,3 hijk	4,55±0,32 ghik
RVC37	3±1 hij	14,83±5,78 ijk	2,43±0,21±0,56 hik
RVC38	16±3 c	85,16±17,3 bcde	14,16±1,44 bcde
RVC39	2±1hij	7,41±2,2k	1,21±0,55 k
RVC40	4±1ghij	20,39±7,2 hijk	3,34±0,73 ghik
RVC41	17±5 bc	88,96±23 bcd	14,56±2,66 bcd
RVC45	22±6ab	133,85±27,8ab	23,22±2,35 ab
RVC50	13±def	70,43±12,5 bcdef	11,53±3,23 bcdef
RVC60	13±def	70,43±12,5 bcdef	11,53±3,23 bcdef
L01	14±2 def	73,21±11,3 bcde	5,76±1,2 fghik
STM	8±3fghi	46,33±18,2 fghi	7,58±1,5 fghi
S1021	9±4efgh	50,04±13,2 efgh	8,19±2,3 efgh
LDC	16±3 c	87,11±17,3 bcde	14,26±1,44 bcde
FL	17±5 bc	92,67±12,4 bc	15,17±3,2bc
UB	17±4 bc	94,52±9,1b	15,47±2,55b
NG	25±3a	140,85±27,8a	27,05±3,25a
N+	5±2ghij	9,65±3,5 hijk	4,85±0,33 ghik
N-	2±1hij	6,30±2,1l	1,11±0,23 l

Dans chaque colonne les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ (test de Newman-Keuls). **UB** : Urée blanche ; **FL** : Fertileg ; **Ng** : Nutrigofol ; **LDC** : urée rouge

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION



Figure 30 : Rendement en gousses des plantes inoculées et des plantes fertilisées du cultivar Ci3 du pois bambara

(A) : plantes inoculées, (B) : plantes fertilisées, (C) : effet comparé de l'inoculation et de la fertilisation sur la production des plantes

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

4.3- Discussion

Cette étude a été menée afin de déterminer l'efficacité des souches bactériennes (engrais biologiques) par rapport aux engrais azotés de synthèse sur le développement et le rendement de *Vigna subterranea* L (pois bambara).

Dans l'ensemble, toutes les souches bactériennes testées ont amélioré la taille, la surface foliaire, le nombre de feuilles, la biomasse des plantes inoculées comparativement aux témoins non inoculés et non azotés et même aux des plantes fertilisées pour certaines.

En effet, pour les plantules inoculées, les hauteurs ont varié de 23,90 à 26,97 cm, Les nombres de feuilles sont rangés de 20 à 30, les surfaces foliaires sont comprises de 9,96 à 15,39 cm², les poids secs racinaires ont varié de 0,51 à 0,88 g/plante et les poids secs aériens ont varié de 1,27 à 2,30 g/plante. Tandis que pour des plantules fertilisées, les hauteurs sont compris entre 22 à 25,95 cm, les nombres de feuilles sont rangés de 22 à 33, les surfaces foliaires ont varié de 11,63 à 17,86 cm², les poids secs racinaires ont varié de 0,42 à 1,1 g/plante et les poids secs aériens ont varié de 1,47 à 2,50 g/plante. Ainsi, les souches RVC25, RVC41, RVC45, S1021 et L01 ont été identifiées comme les meilleurs stimulateurs de croissance. Par ailleurs, le calcul de l'indice d'efficacité de l'inoculation et de la fertilisation a permis d'identifier les souches autochtones RVC25 (114 %), RVC45 (112 %), RVC29 (103 %), RVC13 (100 %), la souche de référence L01 (112 %) et Urée (121 %) comme étant les meilleurs stimulateurs au niveau de la biomasse sèche.

Dans l'ensemble, la majorité des souches bactériennes (95,45 %) testées ont amélioré le rendement des plantes inoculées comparativement aux des témoins non inoculés et même aux ceux des plantes fertilisées pour certaines. En effet, pour des plantes inoculées, les nombres de gousses ont varié de 2 à 22, les pois frais de gousses sont rangés de 7,1 à 134,85 g/plante et les pois secs de gousses sont compris entre 1 et 24,47 g/plante. Tandis que pour les plantes fertilisées, les nombres de gousses ont varié de 5 à 25, les pois frais de gousses sont rangés de 9,65 à 140,85 g/plante et les pois sec de gousses ont varié de 4,85 à 27,05 g/plante. Les souches RVC4, RVC13, RVC25, RVC29, RVC38, RVC41 et RVC45 se sont démarquées en induisant les rendements similaires ou plus importants que les engrais chimiques.

Cette aptitude des souches autochtones à améliorer la croissance des plantes serait dû à leurs grandes capacités de production d'AIA, de sidérophore, de solubilisation du phosphate et fixation d'azote pour certaines. En effet, certaines des souches ont présenté de bons résultats aussi bien dans la solubilisation du phosphate, la production de l'AIA que dans la production de sidérophore. En plus, de ces trois activités PCP, d'autres souches rhizobiales ont montré de

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

bonnes capacités fixatrices d'azote. En effet, les souches RVC45, RVC13, RVC41 font partie des meilleures productrices d'AIA. Les souches RVC4 et RVC45 et RVC29 sont dans le lot les meilleures solubilisatrices de phosphate. Les souches RVC23, RVC25 RVC38 ont été dans le groupe les meilleures productrices de sidérophores. Les souches RVC38, RVC25, RVC13 faisaient partie des meilleures fixatrices d'azote. La performance moins reluisante des souches de référence (étrangères) par rapport aux souches autochtones pourrait s'expliquer par le fait que les souches introduites n'ont pas pu s'adapter totalement aux nouvelles conditions environnementales et écologiques.

Des résultats contraires ont été observés par Diagne (1992), qui a montré que la souche de *Rhizobium* introduite au Sénégal a été plus efficace que les souches autochtones isolées de *Prosopis*.

Palaniappan *et al.* (2010) ont montré la capacité des souches endophytes à améliorer la croissance de *Lespedeza* sp. cultivé en Corée du Sud. Des résultats similaires ont été rapportés pour les souches endophytes de *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Klebsiella* isolées des nodules d'arachide capables d'améliorer la croissance de leur plante hôte (Ibáñez *et al.*, 2009). En effet, les PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) peuvent servir de biofertilisants et de biopesticides dans les cultures agricoles en améliorant la croissance des plantes directement et indirectement (Glick, 2012, Ferchichi *et al.*, 2019).

Certaines souches, certains engrais chimiques et le témoin fertilisé (KNO_3) qui avaient induit une bonne production de biomasse ont montré des résultats peu satisfaisants pour le rendement. Pourtant, Okogun & Sanginga (2003) et Tefera *et al.* (2009; 2010) ont observé une forte association entre la biomasse et le rendement en grain. De plus, la biomasse aérienne et le phénotype de la nodulation chez les rhizobia semblent être couplés dans la sélection et le développement des lignées à haut rendement (Karaboneye, 2013).

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

4.4- Conclusion partielle

Dans l'ensemble, les souches bactériennes testées ont amélioré la croissance des plantes inoculées comparativement aux témoins non inoculés et même aux plantes fertilisées pour certaines. Ainsi, les souches locales rhizobiales (RVC25, RVC45), la souche endophytique RVC41, les souches introduites S1021 et L01 ont été les meilleures stimulatrices de croissance. Par ailleurs, les souches locales rhizobiales (RVC13, RVC25) et les souches endophytiques (RVC45, RVC29), la souche de référence L01 ont été identifiées comme étant les meilleures stimulatrices de biomasse sèche.

La majorité des souches bactériennes (95,45 %) testées ont amélioré le rendement des plantes inoculées comparativement aux témoins non inoculés et non azotés et même et aux plantes fertilisées. Les souches indigènes rhizobiales (RVC13, RVC25, RVC38, RVC45) et les souches endophytiques (RVC4, RVC29, RVC41) se sont démarquées en induisant les rendements similaires ou plus importants que les engrais chimiques.

CONCLUSIONS GENERALE
ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette étude a été réalisée afin d'isoler, identifier et sélectionner de potentielles bactéries autochtones efficaces adaptées aux conditions édapho-climatiques et capables d'améliorer la productivité du pois bambara [*Vigna subterranea* (L.)].

Dans l'ensemble, le cultivar Ci3 a été le plus compatible avec les rhizobia indigènes sur les échantillons de sols utilisés. Par ailleurs, le sol d'UJLoG a été moins riche en rhizobia nodulant le pois bambara. Le sol et le cultivar du pois bambara ont influencé la formation de nodules sur les systèmes racinaires des plantes au cours du test de piégeage. Cent-vingt-trois (123) bactéries isolées des nodules du pois bambara et purifiées ont montré des caractères morphologiques différents et très variés. Ainsi soixante (60) isolats codés RVC (Rhizobactéries associées à *Vigna subterranea* Côte d'Ivoire) ont été présélectionnés sur la base de leur diversité morphologique pour constituer une collection hétérogène de bactéries indigènes associées au pois bambara.

Les bactéries isolées des nodules du pois bambara ont présenté une grande diversité génétique. Cette collection de bactéries autochtones est composée de rhizobia (25 %) et d'endophytes (75%) et ont été identifiées comme membres de 13 genres à savoir *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Rahnella*, *Paenibacillus*, *Mitsuaria*, *Lysobacter* et *Brevibacillus*) inclus dans trois (3) phyla (Proteobactérie, Firmicutes et Actinobactérie). Le genre bactérien le plus prédominant trouvé dans les nodules du pois bambara est *Bacillus* (41,7 %).

Par ailleurs, 25 % des souches appartenant aux rhizobia, ont présenté en majorité (86,7 %) des croissances rapides et ont assimilé tous les sucres testés tandis que les souches RVC11 et RVC45 (13,3 %) ont montré des croissances lentes et n'ont pas pu croître en présence de Tréhalose et Maltose.

Ces bactéries ont pu réinfecter et reformer les nodules fonctionnels tant avec les plantes de leur cultivar d'origine qu'avec le cultivar Ci3. Les rhizobia nodulant le pois bambara ont présenté une grande variabilité dans leur capacité infective et fixatrice qui a impacté également les caractères morpho-agronomiques. L'inoculation a amélioré la croissance et le développement des plantes par rapport aux témoins négatifs et même les témoins positifs pour certaines. Cependant l'effet de l'inoculation a varié en fonction de la souche rhizobiale révélant ainsi une grande diversité phénotypique entre ces rhizobia. Les souches RVC50, RVC38, RVC25, RVC13 et RVC28 ont été identifiées comme les plus efficaces.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'ensemble des bactéries de la collection a montré une très bonne tolérance aux concentrations élevées de NaCl et le seuil de tolérance a été de 10 % de NaCl. La souche rhizobiale RVC15 pourrait survivre puis préserver sa capacité infective sous stress salin. Aussi les souches endophytiques RVC16 et RVC37 pourraient-elles survivre puis améliorer leurs activités PCP sous stress salin.

Les souches rhizobiales et endophytiques évaluées ont plus toléré les pH alcalins que les pH acides. Toutes les souches ont présenté une tolérance de 100% au pH variant entre 5 et 10. Par conséquent, la sélection de souches tolérantes à un pH neutre ou alcalin est très large. Parallèlement, les souches rhizobiales (RVC13, RVC38) et la souche endophytique RVC2 pourraient survivre sur des sites à pH très bas (pH = 3,5). Les souches rhizobiales (RVC6, RVC9, RVC23, RVC38) et les souches endophytiques (RVC1, RVC2, RVC16, RVC20, RVC21, RVC29 RVC30) ont présenté une grande plasticité dans la tolérance au pH allant de pH = 4 à pH = 11.

Les souches bactériennes testées ont montré une large gamme de tolérance à la température. Ainsi, les souches rhizobiales RVC15, RVC25, RVC38 et RVC45 ont pu croître entre +4 à 50 °C et la souche rhizobiale RVC12 a pu croître entre 28 à 55 °C. Les souches endophytiques RVC1, RVC7, RVC8, RVC55, RVC60 et RVC61 ont pu croître entre +4 à 55 °C. D'après les résultats des tests aux stress environnementaux, une grande plasticité de tolérance au pH, à la salinité et à la température a été observée pour l'ensemble des souches dans cette étude. Par conséquent, la sélection de souches hautement tolérantes est très large.

La plupart des souches bactériennes se sont bien développées en présence des différents engrais testés. Cependant, les souches rhizobiales (RVC12, RVC50) et les souches endophytiques (RVC36, RVC37, RVC62) ont été les plus sensibles. Le NaNO₂ a été l'engrais le plus toxique pour ces souches. Les insecticides et l'herbicide Herbo Select (Haloxypop-R-méthyl) ont été largement tolérés par les souches tandis que les fongicides et l'herbicide Roundup (Glyphosate) ont été très toxiques pour les souches. Toutefois, les souches rhizobiales (RVC9, RVC12, RVC13) et les souches endophytiques (RVC57, RVC62) ont toléré le Roundup (Glyphosate) puis les souches de référence (S1021, STM) et les souches endophytiques (RVC21 et RVC22) ont toléré l'Antracol (Propineb).

Les rhizobia et les endophytes isolés des nodules du pois bambara ont montré dans l'ensemble de très bonnes capacités à solubiliser le phosphate, à produire l'AIA et les sidérophores. Cependant, elles ont montré des différences dans leur capacité à solubiliser le phosphate, à produire l'AIA et les sidérophores. Cette variabilité leur confère des potentialités variables dans

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

la promotion de la croissance des plantes. Ainsi, les quantités d'AIA produites ont varié de 19,75 à 231,08 $\mu\text{g/mL}$ chez les rhizobia et de 16,3 à 275,5 $\mu\text{g/mL}$ chez les endophytes. Les souches rhizobiales (RVC45, RVC13) et les souches endophytiques (RVC36, RVC37, RVC39, RVC40, RVC41, RVC60) ont été les meilleures productrices d'AIA.

La plage de phosphate solubilisé a varié de 66,90 à 339,84 $\mu\text{g/mL}$ chez les rhizobia et de 9 à 435,45 $\mu\text{g/mL}$ chez les endophytes. Les souches rhizobiales (RVC12, RVC45) et les souches endophytiques (RVC1, RVC4, RVC29) ont été les meilleures solubilisatrices de phosphate.

Les diamètres des halos de production de sidérophore sont compris entre 11 et 33 mm chez les rhizobia puis entre 7,06 et 40 mm chez les endophytes. Les indices de production de sidérophore sont rangés de 2,03 à 3,69 chez les rhizobia puis de 1,07 à 5,36 chez les endophytes. Les souches rhizobiales (RVC23, RVC25, RVC28) et les souches endophytiques (RVC21, RVC22, RVC29) ont été les meilleures productrices de sidérophores. Les souches RVC4, RVC13, RVC22, RVC29, RVC30, RVC36, RVC37, RVC38, RVC41, RVC42, RVC45, RVC60 et RVC61 ont présenté de bons résultats aussi bien dans la solubilisation du phosphate, la production de l'AIA que dans la production de sidérophore. Ces souches pourraient contribuer à améliorer la culture et la production du pois bambara et bien d'autres plantes.

Dans l'ensemble, les souches bactériennes testées ont amélioré la croissance des plantes inoculées comparativement aux témoins non inoculés et même aux plantes fertilisées pour certaines. Ainsi, les souches locales rhizobiales (RVC25, RVC45), la souche endophytique RVC41, les souches étrangères S1021 et L01 ont été les meilleures stimulatrices de croissance. Par ailleurs, les souches locales rhizobiales (RVC13, RVC25) et les souches endophytiques (RVC45, RVC29), la souche de référence L01 ont été identifiées comme étant les meilleures stimulatrices de biomasse sèche.

La majorité des souches bactériennes (95,45 %) testées ont amélioré le rendement en gousse des plantes inoculées comparativement aux témoins non inoculés et non azotés et même et aux plantes fertilisées. Les souches indigènes rhizobiales (RVC13, RVC25, RVC38, RVC45) et les souches endophytiques (RVC4, RVC29, RVC41) se sont démarquées en induisant les rendements similaires ou plus importants que les engrais chimiques.

Les souches RVC13, RVC29, RVC38 et RVC45 sont des souches prometteuses. Elles sont à la fois adaptées aux conditions environnementales locales, présentant des traits PGP plus intéressants, performantes sur le plan agronomique et efficaces sur le plan symbiotique pour certaines. Ces souches pourraient être utilisées pour améliorer la productivité du pois bambara et aider à promouvoir cette culture.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En perspective, cette étude pourrait se poursuivre en élucidant les aspects :

- ✓ Etudier les gènes de ménage de l'ensemble des bactéries de la collection et les gènes symbiotiques des rhizobia ;
- ✓ Réaliser des essais de co-inoculation de rhizobia et d'endophytes performants identifiés dans cette étude ;
- ✓ Comparer quelques paramètres biochimiques de plantes et de graines de pois bambara obtenues à partir de l'inoculum des souches bactériennes autochtones et des engrais azotés ;
- ✓ évaluer les apports des souches bactériennes autochtones en éléments nutritifs au sol après la récolte du pois bambara
- ✓ faire des essais en conditions de champ avec les engrais et pesticides testés *in vitro* afin de proposer aux agriculteurs les moins toxiques ;
- ✓ Enrichir la collection de bactéries associées au pois bambara en prospectant des sols de différentes régions de la Côte d'Ivoire.

REFERENCES

REFERENCES

- Abdelmoumen H., Filali-Maltouf A., Neyra M., Belabed A. & Missbah El Idrissi M. (1999). Effect of high salt concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *Journal of Applied Microbiology*, 86 : 886-898.
- Abdulsalami M.S. & Sheriff R.B. (2010). Effect of processing on the proximate composition and mineral content of Bambara groundnut (*Voandzeia Subterranean*). *Bayera Journal of Pure and Applied Sciences*, 3 (1): 188- 190.
- Abdul-Wahab S.H. & Zahran H.H. (1979). Salt tolerance of Rhizobium species in broth culture. *Zeitschrift fur allgemeine Mikrobiologie*, 19: 681-685.
- Abou-Shanab R.A.I. (2007). Characterization and 16S rDNA Identification of thermotolerant bacteria Isolated from Hot Springs. *Journal of Applied Sciences Research*, 3 (10) : 994-1000.
- Ahemad M. & Kibret M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- Ahmed S. & Ahmad M.S. (2006). Effect of insecticides on the total number of soil bacteria under laboratory and field conditions. *Pakistani Entomologie*, 28 (2) : 63–68.
- Ajayi F.A. & Lale N.E.S. (2001). Susceptibility of unprotected seeds and seeds of local Bambara groundnut cultivars protected with insecticidal essential oils to infestation by *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 37: 47-62.
- Aktar Md. W., Dwaipayan S. & Ashim C. (2009). Impact of pesticides use in agriculture : their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 15 p.
- Allen E. K. & Allen O.N. (1950). Biochemical and Physiological properties of the rhizobia. *Bacteriology Reviews*, 14 : 173-330.
- Alori E.T., Glick B.R. & Babalola O.O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>.

REFERENCES

- Amani K., Fondio L., Konate I., N’Gbesso M. F. D. P., Maxwell B. G. A., Sanogo T. A. & Filali-Maltouf A. (2020). Response of Indigenous Rhizobia to the Inoculation of Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] Varieties Cultivated under Controlled Conditions in Côte d’Ivoire. *Advance in Microbiology*, 10:110-122. <https://doi.org/10.4236/aim.2020.103010>.
- Ameyaw G.C.E. & Doku E.V. (1983). Effect of soil moisture stress on the reproductive efficiency and yield of the bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*). *Crop Science Journals*, 28 : 23-29.
- Andrews M. & Andrews M.E. (2017). Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>.
- Anjum M.A., Zahir A. Z., Asharaf M. & Asharaf M. (2011). Isolation and screening of rhizobia for auxin biosynthesis and growth promotion of mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings under axenic conditions. *Soil & Environment*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012062429>.
- Anne-Antonella S. (2015). Réponses écophysiologicals et moléculaires des plantes aux stress xénobiotiques complexes de faible intensité : implications dans les capacités de protection environnementale des bandes enherbées. Thèse de doctorat de Préparation à l’unité de recherche UMR CNRS 6553 ECOBIO. Université De Rennes 1, France, 302 p.
- Anyika J.U., Obizola I.C. & Nwamarah J.U. (2009). Effect of processing on the protein quality of African Yam bean and Bambara groundnut supplemented with sorghum or crayfish in rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8: 1623 - 1628.
- Araújo A. S. F., Monteiro R. T. R. & Abarkeli R. B. (2003). Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemos*, 52: 799–804.
- Ardley J.K., Reeve W.G., O’Hara G.W., Yates R.J., Dilworth M.J. & Howieson J.G. (2013). Nodule morphology, symbiotic specificity and association with unusual rhizobia are distinguishing features of the genus *Listia* within the southern Africa crotalarioid clade *Lotononis* s.l. *Annals of Botany*, 112:1-15.

REFERENCES

- Arora N.K., Tewari S., Singh S., Lal N. & Maheshwari D.K. (2012). PGPR for protection of plant health under saline conditions. In: Maheshwari DK (ed.) *Bacteria in agrobiolgy: Stress management*, pp. 239-258.
- Arora N.K., Tewari S. & Singh R. (2013). Multifaceted Plant-Associated Microbes and Their Mechanisms Diminish the Concept of Direct and Indirect PGPRs. *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*, pp 411-449.
- Arrese-Igor C., Esther M.G., Daniel M., Ruben L., Estibaliz L. & Erena G.Q. (2011). Physiological response of legume nodules to drought. *Plant stress*, 5 : 24-31.
- Arreseigor C., Minchin F. R., Gordon A. J. & Nath A. K. (1997). Possible cause of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in response to nitrate. *Journal of Experimental Botany*, 48 : 905-913.
- Avis T.J., Gravel V., Antoun H. & Tweddell R.J. (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1733-1740.
- Aydi S., Sassi S. & Abdelly C. (2008). Growth, nitrogen fixation and ion distribution in *Medicago truncatula* subjected to salt stress. *Plant and Soil*, 312 : 59-67.
- Azevedo J.L., Maccheroni W.J.R., Pereira J.O. & de Araujo W.L. (2000). Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1):e1–e4.
- Bado V. B. (2002). Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina Faso. Thèse de doctorat. Département des sols et de génie agroalimentaire, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université Laval, Québec, Canada. 184 p.
- Bai Y., D'Aoust F., Smith D.L., Driscoll B.T. (2002). Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 230–238.

REFERENCES

- Basu S., Roberts J.A., Azam-Ali S.N. & Mayes S. (2007). Vouandzou. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. In: Kole, C. (ED), Pulses Sugar and Tuber Crops. *Springer Berlin Heidelberg*, pp. 159-173.
- Bationo A. & Ntare B.R. (2000). Rotation and nitrogen fertilizer effects on pearl millet, cowpea and groundnut yield and soil chemical properties in a sandy soil in the semiarid tropics. *Journal of Agricultural Science*, 134:277–284.
- Baudoin J.P. (2001). Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 5 (4) : 221–230.
- Beck D.P., Materon L.A. & Afandi F. (1993). Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. ICARDA. Syria.
- Begemann F. (1988). Ecogeographic differentiation of Bambara groundnut (*Vigna subterranea*). In : Collection of International Institute of Tropical Agriculture (IITA). Dr. Fleck Niederkleen, Wissenschaftlicher Fachverlag, Germany, 153 p.
- Begum A. & Gafur M.A. (2001). Studies on the root distribution and their effect on growth performance of fast growing tree species. *Bengladesh journal of botany*, 18(1):51-56.
- Beijerinck M (1888). Die Bacterien der papilionaceenknollchen. *Botanische Zeitung*: 46:797-804.
- Belay Z. & Assefa F. (2010). Symbiotic and phenotypic diversity of Zerihun *Rhizobium leguminosarum* bv.viciae from Northern Gondar, Ethiopia, *African Journal of Biotechnology*, 10: 4372-437. DOI: 10.5897/AJB10.431.
- Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia L.M.P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents, *Genetic and Molecular Biology*, 35: 1044–1051.
- Benhamou N. & Picard K. (1996). La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*, 80 :3 DOI : <https://doi.org/10.7202/706189ar>

REFERENCES

- Berg G., Alavi M., Schmidt C.S., Zachow C., Egamberdieva D., Kamilova F. & Lugtenberg B. (2013). Bio-control and osmoprotection for plants under saline conditions. In: *de Bruijn Frans J (ed) Molecular microbial ecology of the Rhizosphere*, Wiley, New York. <https://doi.org/10.1002/9781118297674>.
- Bergey D.H. & Breed R.S. (1957). *Bergey's manual of determination bacteriology*, American Society for Microbiology. Baltimore, Williams and Wilkins Company 1957.
- Bergey D.H. (2001). *Bergey's manual of determination bacteriology*, American Society for Microbiology. Baltimore, Williams and Wilkins Company 1957.
- Beukes C.W., Venter S.N., Law I.J., Phalane F.L., & Steenkamp E.T. (2013). South African Papilionoid Legumes Are Nodulated by Diverse Burkholderia with Unique Nodulation and Nitrogen-Fixation Loci. *PLoS*, 1 : 8 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068406>.
- Bhardwaj D., Ansari M.W., Sahoo R.K. & Tuteja N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13: 66.
- Bhattacharyya P.N & Jha D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1327-1350.
- BioEdit v7.0.5 General Information. s. d. Consulté le 19 octobre 2019. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>.
- Björklund M. (1990). Reconstructing the Past. Parsimony, Evolution, and Inference. MIT Press, Cambridge (Mass), London, 265 Pp., \$37.25. *Journal of Evolutionary Biology*, 3 (5-6): 477-477. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1990.3050477.x>.
- Bliefert C. & Perraud R. (1997). *Chimie de l'environnement : Air, Eau, Sols, Déchets*. 1ère éd. Espagne. 477 p.
- Bohme L. & Bohme F. (2006). Soil microbiological and biochemical properties affected by plant growth and different long term fertilization. *European Journal of soil biology*, 2 : 37-55.

REFERENCES

- Booker M.A. & DeLong A. (2015). Producing the Ethylene Signal: Regulation and Diversification of Ethylene Biosynthetic Enzymes1. *Plant Physiology*, 169 (1): 42-50. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00672>.
- Bordeleau L.M. & Prevost D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil*, 161 : 115-124.
- Borget M. (1989). Les Légumineuses Vivrières Tropicales. Paris : MAISONNEUVE et LAROSE, 161p.
- Bouchiba Z. (2018). Diversité des rhizobia associés à *Scorpiurus muricatus* ssp. *Sulcatus* et leur utilisation pour la réhabilitation des zones dégradées. Doctorat 3ème cycle LMD, Exploitation Des Interactions Plantes-Microorganismes, Université Oran1, 148p.
- Bournaud C., de Faria S.M., dos Santos F.M.J., Tisseyre P., Silva M., Chaintreuil C., Gross E., James E.K., Prin Y, & Moulin. (2013). Burkholderia Species Are the Most Common and Preferred Nodulating Symbionts of the Piptadenia Group (Tribe Mimoseae). *PLoS One*, 8 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063478>.
- Brencic A. & Winans S.C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 : 155-194.
- Brenner D.J., Staley J.T. & Krieg N.R. (2005). Classification of Procaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Speciation. Vol. 2 (Brenner DJ, Krieg NR & Staley JT, eds, 2005, *Springer*, New York. Édition.
- Brewin N.J., Downie J.A. & Young J.P.W. (1992). Nodule formation legumes. *Encyclopedia of microbiology*, Rockefeller University New York, 3 : 239-248.
- Brewin N.J. (2004). Plant cell remodelling in the Rhizobium-Legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23 : 293-316.
- Brink M., Ramolemana G.M. & Sibuga K.P. (2006). *Vigna subterranea* (L.) Verdc. In: Brink, M. & Belay, G. (Editors). *PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale)*, Wageningen, Netherlands. Consulté le 3 mars 2020.

REFERENCES

- Brou Y.T. (2010). Variabilité climatique, déforestation et dynamique agrodémographique en Côte d'Ivoire. *Sécheresse*, 21 (1) : 1-6.
- Brou Y.T., Akindès F. & Bigot S. (2005). La variabilité climatique en Côte d'Ivoire : entre perceptions sociales et réponses agricoles. *Cahiers Agricultures*, 14 (6) : 533-540.
- Brough. T. & Azam-Ali. (1993). The potential of Bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc.] in Vegetable milk production and basic protein functionality systems. *Food chemistry*, 47: 227-283.
- Broughton W. J. & Dilworth M. J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical Journal*, 125 (4): 1075-80.
- Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit P., Charnay M.P. & Coquet Y. (2005). Les pesticides dans le sol : Conséquences agronomiques et environnementales. *France Agricole*, France, 637 p.
- Capella-Gutierrez S., Kauff F. & Gabaldón T. (2014). A phylogenomics approach for selecting robust sets of phylogenetic markers. *Nucleic Acids Research*, 42 (7): e54. <https://doi.org/10.1093/nar/gku071>.
- Carpenter S.R., Caraco N.F., Correll D.L., Howarth R. W., Sharpley A.N. & Smith V.H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Application*, 8 : 559-568.
- Cavalli-Sforza L. L. & Edwards A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19 (3 Pt 1): 233-57.
- Chabot R., Antoun H. & Cescas M .P. (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Plant and Soil*, 84 : 311- 321.
- Chanratana M., Han G.H., Roy Choudhury A., Sundaram S., Halim M.A., Krishnamoorthy R., Kang Y. & Sa T. (2017). Assessment of *Methylobacterium oryzae* CBMB20 aggregates for AMB. *Express* ,7 (1) : 1–10.

REFERENCES

- Chen W. & Tsong-teh K. (1993). A Simple and Rapid Method for the Preparation of Gram-Negative Bacterial Genomic DNA. *Nucleic Acids Research.*, 21: 2260-2260. <https://doi.org/10.1093/nar/21.9.2260>.
- Chen W., Moulin L., Bontemps C., Vandamme P., Béna G. & Boivin-Masson C. (2003). Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by Beta-Proteobacteria Is Widespread in Nature. *Journal of Bacteriology*, 185 (24): 7266-72.
- Chen W. M., Laevens S., Lee T. M., Coenye T., De Vos P., Mergeay M., & Vandamme P. (2001). *Ralstonia Taiwanensis* Sp. Nov., Isolated from Root Nodules of Mimosa Species and Sputum of a Cystic Fibrosis Patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51 (5) : 1729-35. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1729>.
- Chen W.M., de Faria S.M., Stralioetto R., Pitard R.M., Simões-Araújo J.L., Chou H.J., Chou Y.J., Chou J.Y., Barrios E., Prescott R.A., Geoffrey N. Elliott N.G., Sprent I.J., Young W.P.J., Euan K., James K.E. (2005). Proof That Burkholderia Strains Form Effective Symbioses with Legumes: A Study of Novel Mimosa-Nodulating Strains from South America. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11): 7461-71. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7461-7471.2005>.
- Chen W. X., Yan G. H. & Li J. L. (1988). Numerical Taxonomic Study of Fast-Growing Soybean Rhizobia and a Proposal that *Rhizobium fredii* be Assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38 (4): 392-97. <https://doi.org/10.1099/00207713-38-4-392>.
- Cheriet, D. (2016). Etude des bactéries symbiotiques de la luzerne (*Medicago ciliaris* L.) fixatrices d'Azote. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, 117p.
- Chi F., Shen S., Cheng H., Jing Y., Yanni Y. & Dazzo F. (2005). Ascending migration of endophytic rhizobia, From roots to leaves, inside rice plants and assesment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7271-7278.
- Chibeba A. M., Kyei-Boahen S., de Fátima G. M., Nogueira M. A. & Hungria M. (2018). Feasibility of transference of inoculation related technologies: A case study of evaluation of soybean rhizobial strains under the agro-climatic conditions of Brazil and

REFERENCES

- Mozambique. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 261 : 230-240.
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.037>.
- Chidebe I. N., Jaiswal S. K., Dakora F. D. (2018). Distribution and phylogeny of microsymbionts associated with cowpea (*Vigna unguiculata*) nodulation in three agroecological regions of Mozambique. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 :1712–17.
- Christensen H. & Olsen J. E. (1998). Phylogenetic Relationships of Salmonella Based on DNA Sequence Comparison of AtpD Encoding the Beta Subunit of ATP Synthase. *FEMS Microbiology Letters*, 161 (1): 89-96.
- Christensen H., Olsen J. E & Magne B. (2004). Comparative Phylogenies of the housekeeping Genes *AtpD*, *InfB* and *RpoB* and the 16S RNA Gene within the Pasteurellaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (5): 1601-9.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.03018-0>.
- Clériveret A., Alami I., Breton F., Garcia D. & Sanier C. (1996). Les composés phénoliques et la résistance des plantes aux agents pathogènes. *Acta Botanica Gallica*, 3: 531-38.
- Cleyet-Marel J.C. (1989). Protocole de prélèvement et de conservation de nodosités récoltés sur les racines de Légumineuses. In : fichier technique de fixation symbiotique de l'azote, II RHIZ 1C Rome : FAO, pp 2.
- Cloutier J., Prévost D., Nadeau P. & Antoun H. (1992). Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9) : 2846-2853.
- Clúa J., Roda C., Zanetti E.M., & Blanco F.A. (2018). Compatibility between Legumes and Rhizobia for the Establishment of a Successful Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Genes*, 9 (3): 125-134. <https://doi.org/10.3390/genes9030125>.
- Compant S., Clément C. & Sessitsch A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42 : 669–678.

REFERENCES

- Compant S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clément C. & Ait Barka E. (2005a). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain 45. *PsJN. Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1685-1693. DOI: 10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005.
- Compant S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clément C. & Ait Barka E. (2005b). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principales Mechanisms of Action, and Future Prospect. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9) : 4951–4959. DOI: 10.1128 / AEM.71.9.4951-4959.2005.
- Conn H.J. (1942). Validity of the Genus *Alcaligenes*. *Journal of Bacteriology* , 44 (3): 353-60.
- Cook A. (1978). Bambara groundnut: *Voandzeia subterranea*. In: “Diseases of tropical and subtropical vegetables and other plants. *Hafner Press*, New York, USA, 459 p.
- CORAF / WECARD (2008). Construire une agriculture durable pour le développement de l’Afrique de l’Ouest et du Centre. Rapport annuel 2008 du CORAF / WECARD, 60 p.
- Costa R. R., De Sousa A. H., Faroni L. R. D’A., Dhingra O. D. & Pimentel M. A. G. (2006). Toxicity of mustard essential oil to larvae and pupas of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection, 908-913.
- Costerousse B., Mauclaire L.S., Frossard E. & Thonar C. (2018). Identification of heterotrophic zinc mobilization processes among bacterial strains isolated from wheat rhizosphere (*Triticum aestivum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 84:1–16.
- Crespo J.L., García-Domínguez M., & Florencio F.J. (1998). Nitrogen Control of the GlnN Gene That Codes for GS Type III, the Only Glutamine Synthetase in the cyanobacterium *Pseudanabaena* Sp. PCC 6903. *Molecular Microbiology*, 30 (5): 1101-12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01143.x>.
- Curley R.L. & Burton J.C. (1975). Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectants. *Agronomy Journal*, 67 : 807-808.

REFERENCES

- Czernic P., Gully D., Cartieaux F., Moulin L., Guefrachi I., Patrel D., Pierre O., Fardoux J., Chaintreuil C., Nguyen P., Gressent F., Da Silva C., Poulain J, Wincker P., Rofidal V., Hem S., Barrière Q., Arrighi J., Mergaert P & Giraud E. (2015). Convergent evolution of endosymbiont differentiation in dalbergioid and inverted repeat-lacking clade legumes mediated by nodule-specific cysteine-rich peptides. *Plant Physiology*, 169: 1254-1265.
- Dakora F.D. & Muofhe L.M. (1997). Nitrogen Fixation and nitrogen nutrition in symbiotic voandzou (*Vigna suterranea* (L.) Verdc.) and Kersting's bean (*Macrotyloma geocarpum* (Harms) Maréchal. Et Baud). Proceedings of the workshop on Conservation and Improvement of voandzou (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.), 14–16 November 1995, Harare, Zimbabwe. p. 72-77.
- Dall'Agnol, Fuzinato R., Ribeiro A.R., Ormeño-Orrillo E., Rogel A.R., Delamuta R.J.M., Andrade D.S., Martínez-Romero E. & Hungria M. (2013). *Rhizobium freirei* Sp. Nov., a Symbiont of *Phaseolus vulgaris* That Is Very Effective at Fixing Nitrogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63 (11): 4167-73. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.052928-0>.
- Dalziel J.M. (1935). Voandzeia Thou. Ln : The useful plants of west tropical Africa. Crown Agents, London. Pp 269 – 271.
- Darlu P., & Tassy P. (1993). Reconstruction phylogénétique: concepts et méthodes. Paris, France.
- De Almeida Lopes K.B., Carpentieri-Pipolo V., Oro T.H., Stefani Pagliosa E. & Degraasi G. (2016). Culturable endophytic bacterial communities associated with field-grown soybean. *Journal of Applied Microbiology*, 120:740–755.
- De Bruyn A., Martin D. & Lefeuvre p. (2014). Phylogenetic Reconstruction Methods: An Overview. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1115 (janvier): 257-77. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_13.
- De Faria, S.M., Hay, G. T., Sprent, J. I. (1988). Entry of rhizobium into roots of *Mimosa scabrella* Benth occurs between epidermal cells. *Journal of Genetic and Microbiology*, 134 : 229 1-2296.

REFERENCES

- De Lajudie P., Willems A., Pot B. & 7 other authors. (1994). Polyphasic taxonomy of Rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44 : 715-733.
- De Lajudie P. Laurent-Fulele E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M.D., Kersters K., Dreyfus B. & Gillis M. (1998). *Allorhizobium undicola* Gen. Nov., Sp. Nov., Nitrogen-Fixing Bacteria That Efficiently Nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1277-90. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1277>.
- De Meyer S.E/, De Beuf K/, Vekeman B. & Willems A. (2015). A large diversity of nonrhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 83 : 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.002>
- Degefu T., Wolde-meskel E. & Frostegård A. (2013). Phylogenetic Diversity of Rhizobium Strains Nodulating Diverse Legume Species Growing in Ethiopia. *Systematic and Applied Microbiology*, 36 (4): 272-80. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.004>.
- Delamuta J.R.M., Menna P, Ribeiro A.R. & Hungria M. (2017). Phylogenies of symbiotic genes of Bradyrhizobium symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. *Systematic and Applied Microbiology*, 40 (5): 254-65. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.04.005>.
- Delsuc F. & Douzery E. (2004). Les méthodes probabilistes en phylogénie moléculaire : (2) L'approche bayésienne. *Biosystema*, Société Française de Systématique, 22, pp.75-86. [ffhalsde00193038f](https://doi.org/10.1007/s00193038f).
- Dénarié J., Debelle F. & Promé J.C. (1996). Rhizobium Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 503-35. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002443>.
- Deng Z.S., Zhao L.F., Xu L. Zhao-Yu Kong Z., Zhao P., Wei Qin W., Jia-Li Chang J., Ge-Hong Wei G. (2011). *Paracoccus sphaerophysae* spp. nov. a siderophore-producing,

REFERENCES

- endophytic bacterium isolated from root nodules of *Sphaerophysa salsula*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 665–669.
- Desbrosses G.J. & Stougaard J. (2011). Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell Host & Microbe*, 10:348–358.
- Deschodt C. C. & Strijdom B. W. (1976). Effective Nodulation of *Aspalathus Linearis* Ssp. *Linearis* by Rhizobia from Other *Aspalathus* Species, *Phytophylactica*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301254736>.
- Diagne O. (1992). Isolement et caractérisation de souches de rhizobium de prosopis provenant de différentes zones écologiques, rapport chercheurs associés ORSTOM, direction des recherches sur les productions forestières, ministère du développement rural et de l'hydraulique, institut sénégalais de recherches agricoles, 52 p.
- Dike M.C. (1997). Effect of insect pests on pod and seed yields of Bambara groundnut, *Vigna subterranea* L. verde in Nigeria. *International Journal of Pest Manage*, 43: 191-192.
- Dixon R.O.D. & Wheeler C.T. (1986). Nitrogen Fixation in Plants. *Chapman & Hall Press*, New York, 45p.
- Djè Y., Béket S.B. & Zoro Bi I. A. (2005). Observations préliminaires de la variabilité entre quelques morphotypes de voandzou [*Vigna subterranea* (L.) Verdc., Fabaceae] de Côte d'Ivoire. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 9(4) : 249-258.
- Djedidi, S., Yokoyama T., Tomooka N., Ohkama-Ohtsu N., Risal C.P., Abdelly C. & Sekimoto H. (2011). Phenotypic and genetic characterization of rhizobia associated with alfalfa in the Hokkaido and Ishigaki regions of Japan. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(6) : 453–461. doi:10.1016/j.syapm.2011.04.006.
- Dommergues Y. et Mangenot F. (1970). *Ecologie Microbienne du Sol*. Masson & Cie, Paris.
- Dommergues Y., Duhaux E. & Hoang G.D. (1999). Les arbres fixateurs d'azote : Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Y. Dommergues (ed.), Édition espaces 34, Paris, 475 p.

REFERENCES

- Dommergues Y.R. & Bosco M. (1998). The contribution of N₂ fixing trees to soil productivity and rehabilitation in tropical, subtropical and Mediterranean regions. *Microbial interactions in agriculture and forestry*, (eds) Oxford & Illness Publishing : 65-96.
- Doornbos R.F., van Loon L.C., Peter A.H.M. & Bakker A. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. *Agronomy for Sustainable Development*, 32: 227-243.
- Drabo I., Sérémé P. & Dabire C. (1997). Bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verde.]. In : Heller, J., Begemann, F. and Mushonga, J. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 9. Proceeding of the workshops on conservation and Tmprovement of Bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verde.], 14-16 November 1995, Harare, Zimbabwe. Pp 19 – 26.
- Dreyfus B., Garcia J. L. & Gillis M. (1988). Characterization of Azorhizobium caulinodans gen. nov., sp. nov., a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from Sesbania rostrata ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38 (1): 89-98. <https://doi.org/10.1099/00207713-38-1-89>.
- Drouin P., Sellami M., Prevost D., Fortin J. & Antoun H. (2010). Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of Rhizobiaceae. *Journal of Environmental Science and Health*, 45 (8) : 757-765.
- Dubey R.C., Maheshwari D.K., Kumar H. & Choure K. (2010). Assessment of diversity and plant growth promoting attributes of rhizobia isolated from *Cajanus cajan* L. *African Journal of Biotechnology*, 9: 8619–8629.
- Duca D., Lorv J., Patten C. L., Rose D. & Glick B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in *plant–microbe interactions*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106: 85-125.
- Ducroquet H., Tillie P., Louhichi K. & Gomez-Y. S. (2017). L'agriculture de la Côte d'Ivoire à la loupe : Etat des lieux des filières de production végétales et animales et revue des politiques agricoles. Union Européenne, Luxembourg. 244 p.
- Dudeja S.S. & Nidhi (2014). Molecular diversity of rhizobial and non rhizobial bacteria from nodules of cool season legumes. In: *Biotechnology: Prospects and applications* (Editors:

REFERENCES

- R.K.Salar, S.K.Gahlawat, P. Siwach and J.S.Duhan) published by *Springer-Verlag, Germany*. doi: 10.1007/978-81-322-1683-4_10, Springer India.
- Dudeja S.S. (2016). Beneficial effects and molecular diversity of endophytic bacteria in legume and non legumes. In *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*. Vol. 1. Edited by D.P. Singh, H.B. Singh, and R. Prabha. *Springer*, New Delhi. pp. 245–256. doi:10.1007/978-81-322-2647-5_14.
- Duke J.A., Okigbo. & Werder. (1977). *Voandzeia subterranea* (L.). *Tropical Grain Legumes Bulletin*, 10: 8-11 .
- Duteurtre G. & Dieye P.N. (2010). Agriculture sénégalaise à l'épreuve du marché, books.google.com, pp 408- 414.
- Egamberdieva D., Jabborova D. & Berg G. (2016). Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum* and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila* and their effects on growth, nodulation and nutrition of soybean under salt stress. *Plant Soil*, 405:35–45.
- Egamberdieva D., Wirth S.J., Shurigin V.V., Hashem A. & Allah E.F. (2017). Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 8:1–13.
- Ehmann A. (1977). The van Urk-Salkowski Reagent--a Sensitive and Specific Chromogenic Reagent for Silica Gel Thin-Layer Chromatographic Detection and Identification of Indole Derivatives. *Journal of Chromatography* 132 (2): 267-76.
- Eisen J.A. (1995). The RecA Protein as a Model Molecule for Molecular Systematic Studies of Bacteria: Comparison of Trees of RecAs and 16S RRNAs from the Same Species. *Journal of Molecular Evolution*, 41 (6): 1105-23.
- El Habib E.L. (2013). Processus Physico-chimiques d'élimination des pesticides dans l'environnement : Cas de l'Imazéthapyr. Thèse doctorat de Chimie Physique. Université Mohammed V-Agdal, Faculté Des Sciences, Rabat, 108 p.

REFERENCES

- El-Hilali I. (2006). La symbiose rhizobium-lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *lupinus luteus*. Thèse De Doctorat de Biologie, Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohamed V, Rabat (Maroc), 231p.
- El Sheikh E.A.E. & Wood M. (1990). Rhizobia and Bradyrhizobia under salt stress: possible role of trehalose in osmoregulation. *Letters in Applied Microbiology*, 10 : 127-129.
- Ellah M.M & Singh A. (2008). Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verde.) yield as influence by phosphorus and cultivars in the Semi-Arid Savanna of Nigeria. *Journal of Piani Sciences*, 3 (2): 176-181.
- Eyzaguirre P., Thormann I., Goli A. E. & Attere A. F. (1997). Strategies for the conservation and use of neglected and under-utilized crops in the African savannah: fonio and Bambara groundnut. In A. Begic (Ed). Actes du colloque "Gestion des ressources génétiques des plantes en Afrique des savanes", 24–28 février, 1997, IER-BRGSolagral, Bamako, Mali, p. 315–322.
- Ezedinma F. O. C. & Maneke F. O. (1985). Preliminary studies on Bambara groundnut (*Vigna subterranea* Verdc.) in the derived savanna belt of Nigeria. *Tropical Grain Legumes Bulletin*, 31 : 39-44.
- Fabres E., Muller H., Therizols P., Lafontaine I., Dujon B. & Fairhead C. (2005). Comparative genomics hemiascomycete yeasts : evolution of sex, silencing, and subtelomeres. *Molecular Biology and Evolution*, 22 : 856-873.
- Faghire M., Bargaz A., Farissi M., Palma F., Mandri B., Lluch C., Tejera García N.A., Herrera-Cervera J.A., Oufdou K. & 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.
- Felsenstein J. (1981). Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17 (6): 368-76.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.

REFERENCES

- Felsenstein J. (1988). Phylogenies from Molecular Sequences: Inference and Reliability. *Annual Review of Genetics*, 22 (1): 521-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.002513>.
- Felsenstein J. (1989). PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5: 164-66.
- Fening J. O., Ewusi-Mensah N., Safo E.Y. (2011). Short-term effects of cattle manure compost and NPK application on maize grain yield and soil chemical and physical properties. *Agricultural Science Research Journal*, 1(3): 69- 83.
- Ferchichi N., Toukabri W., Boularess M., Smaoui A., Mhamdi R. & Trabelsi D. (2019 a). Inoculation of *Lupinus albus* with the nodule-endophyte *Paenibacillus glycanilyticus* LJ121 improves grain nutritional quality, *Archives of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01745-6>.
- Ferchichi N., Toukabri W., Boularess M., Smaoui A., Mhamdi R., Trabelsi D., (2019 b). Isolation, identification and plant growth promotion ability of endophytic bacteria associated with lupine root nodule grown in Tunisian soil. *Archives Microbiology*. [//doi.org/10.1007/s00203-019-01702-3](https://doi.org/10.1007/s00203-019-01702-3)
- Fernandez-Lopez 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 : 12724-12728.
- Ferreira E. M. & Marques J.F. (1992). Selection of Portuguese *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Trifolii* strains for production of legume inoculants. *Plant Soil*, 147:151–158.
- Flores-Félix J.D., Menéndez E., Rivera L.P., Marcos-García M., Martínez-Hidalgo P., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Velázquez E., García-Fraile P. & Rivas R. (2013). Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *Journal of Plant Nutritional Soil Sciences*, 176: 876–882.
- Flores-Félix J.D., Silva L.R., Rivera L.P., Marcos-García M., García-Fraile P., Martínez-Molina E, Mateos P.F., Velázquez E., Andrade P. & Rivas R. (2015). Plants probiotics as a tool to produce highly functional fruits: the case of *Phyllobacterium* and vitamin C in strawberries. *PLoS One*, 10: e0122281.

REFERENCES

- Fonseca M. B., Peix A., Miana de Faria S., Mateos P.F., Rivera L.P., Simões-Araujo J. L., França M.G.C. Isaias D.S. M.R., Cruz C., Velázquez E., Scotti R.M., Janet I. Sprent I.J., James E.K. (2012). Nodulation in *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (Caesalpinioideae), a Threatened Species Native to the Brazilian Cerrado, *PLOS One* 7 (11): e49520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049520>.
- Frank B. (1889). Ueber Die Pilzsymbiose Der Leguminosen. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 7 (8): 332-46. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1889.tb05711.x>.
- Fred E.B., Baldwin L.I & McCoy E. (1932). Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants UW Digital Collections. 1932. <https://uwdc.library.wisc.edu/collections/histscitech/rootnodule/>.
- Gaby J.C. & Buckley D.H. (2012). A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PLoS One*, 7: e42149.
- Gaebewe M.R. (1999). The phosphorus and nitrogen nutrition of Bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verde.] in Botswana soils. An exploration study. Tropical Resource Management Papers. Also published as thesis Wageningen Agricultural University. 101 p.
- 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 : 280-300.
- Gagné S., Richard C., Rouseau H. & Antoun H. (1987). Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 996-1000.
- Gaiero J.R., McCall C.A., Thompson K.A., Day N.J., Best A.S. & Dunfield K.E. (2013). Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100 (9) : 1738–1750. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200572>.
- Galibert F., Finan T. M., Long S. R., Puhler A., Abola P., Ampe F., Barloy-Hubler F. et 61 autres auteurs (2001). The Composite Genome of the Legume Symbiont *Sinorhizobium meliloti* ». *Science* 293 (5530): 668-72. <https://doi.org/10.1126/science.1060966>.

REFERENCES

- Garrity G. M., Lilburn T.G., Cole J.R., Harrison S. H., Euzéby J. & Tindall B.J. (2007). Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea. mars. <http://www.taxonomicoutline.org/>.
- Gaunt M.W., Turner S.L., Rigottier-Gois L., Lloyd-Macgilp S.A. & Young J.P. (2001). Phylogenies of AtpD and RecA Support the Small Subunit rRNA-Based Classification of Rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51 (Pt 6): 2037-48. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2037>.
- Geetanjali M. & Neera G. (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30 : 595-618.
- Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackebrandt E. et al. (2005). Opinion: Re-Evaluating Prokaryotic Species. *Nature Reviews Microbiology* ,3 (9): 733-39. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1236>.
- Ghosh P.K., De T.K. & Maiti T.K. (2015). Production and metabolism of indole acetic acid in root nodules and symbiont (*Rhizobium undicola*) isolated from root nodule of aquatic medicinal legume *Neptunia oleracea* Lour. *JBot* 2015:ID 5750673.
- Gibson A. H. & Harper J. E. (1985). Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Science*, 25: 497-501.
- Glaeser S.P. & Kämpfer P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*, Taxonomy in the age of genomics, 38 (4): 237-45. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>.
- Glenn A.R & Dilworth M.J. (1994). The life of root nodule bacteria in the acid underground. *FEMS Microbiology letters*, 123 : 1-10.
- Glick B.R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* (Cairo), 2012: 963401. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>.
- Gnangui E. L. S, Kouadjo Z. G. C. & Zeze A. (2019). First report of *Rhizobium pusense* within Voandzou (*Vigna subterranea* L.) Verdc.) rhizosphere in Côte d'Ivoire. *Microbiology and Nature*, 1:55-65. <https://doi.org/10.26167/CZTB-1P42>.
- Gnat S., Małek W., Oleńska E., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Łotocka B. & Wójcik M. (2015). Phylogeny of Symbiotic Genes and the Symbiotic Properties of Rhizobia

REFERENCES

- Specific to *Astragalus glycyphyllos* L. *PLoS One*, 10 (10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141504>.
- Goli A.E. (1997). Missions de matériel génétique de collecte en Afrique dans les années 1980. *Bulletin des ressources phylogénétiques*. 111: 1-18.
- Goormachtig S., Capoen W. & Holsters M. (2004). Rhizobium infection : lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends in Plant Science*, 9 : 518-522.
- Gopalakrishnan S., Srinivas V., Alekhya G. & Prakash B. (2015). Effect of plant growth-promoting *Streptomyces* sp on growth promotion and grain yield in chickpea (*Cicer arietinum* L). *Biotechnology*, 5 (5): 799-806. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0283-8>.
- Gordon S.A. & Weber R.P. (1951). Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiology*, 26 (1): 192-95.
- Goswami D., Thakker N. J. & Pinakin Dhandhukia C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Édité par Manuel Tejada Moral. *Cogent. Food & Agriculture*, 2 (1): 1127500. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>.
- Graham P.H. (1965). Extracellular Polysaccharides of the Genus *Rhizobium*. *Antonie van Leeuwenhoek* 31 (1): 349-54. <https://doi.org/10.1007/BF02045914>.
- Graham P.H., Sadowsky MJ & Keyser H.H. (1991). Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 582–587.
- Graham P.H. (1994). Legume nodule symbiosis. In : Methods of soil analysis. Part 2. *Microbiology and Biochemical properties book series n°5* : 199-222.
- Graham P.H. & Vance C.P. (2003). Legumes : importance and constraints to greater use. *Journal of Plant Physiology*, 131 : 872-877.
- Graham P.H. & Vance C.P. (2003). Legumes : importance and constraints to greater use. *Journal of Plant Physiology*, 131 : 872-877.

REFERENCES

- Graur D. & Li H.W. (2000). *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer.
- Gray J.E. & Smith L.D. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3): 395-412 DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.08.030.
- Griffon M. (2006). Nourrir la planète pour une révolution doublement verte. *Odile Jacob Sciences*, Paris (France), 465 pp.
- Grönemeyer J. L., Kulkarni A., Berkelmann D., Hurek T. & Reinhold-Hurek B. (2014). Identification and characterization of rhizobia indigenous to the Okavango region in Sub-Saharan Africa. *Applied and Environmental Microbiology*. 80:7244-7257. <https://doi:10.1128/AEM.02417-14>.
- Guei N. K. R., Konate I., Bakayoko S., Ouattara A., Amani K., Tidou A.S. & Filali-Maltouf A. (2019). Nodulation and agronomic performance of indigenous rhizobia isolated from Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.) nodules in Daloa, Côte d'Ivoire, *International Journal of Research Studies in Microbiology and Biotechnology*. (IJRSMB). 2: 13-18. <http://dx.doi.org/10.20431/2454-9428.0502004>.
- Guillaumet J.-L. & Adjanohoun E. (1971). La végétation de la Côte d'Ivoire. In : Avenard J. M., Eldin E., Girard G., Sircoulon J., Touchebeuf P., Guillaumet J.-L., Adjanohoun E., Perraud A. (eds). *Le milieu naturel de la Côte d'Ivoire*. ORSTOM., Paris : 157-266.
- Gunnabo A.H., Geurts R., Wolde-meskel E., Degefu T., Gille K.E. & van Heerwaarden J. (2019). Genetic interaction studies reveal superior performance of *Rhizobium tropici* CIAT899 on a range of diverse East African common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(24) : 1-56.
- Gupta G., Parihar S.S., Ahirwar N.K., Snehi S.K. & Singh V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microbial Biochemical Technology*, 7: 096-102. doi:10.4172/1948-5948.1000188.
- Gyaneshwar P., Hirsch M.A., Moulin L., Chen W.M., Elliott G.N., Bontemps C., Los Santos E.D.P. et al. (2011). Legume-Nodulating *Betaproteobacteria*: Diversity, Host Range,

REFERENCES

- and Future Prospects. *Molecular Plant-Microbe Interactions*: MPMI 24 (11): 1276-88. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0172>.
- Hajjam Y. (2017). Contribution à l'évaluation des performances des rhizobia nodulant la fève (*Vicia faba* L.) Au Maroc à solubiliser le phosphate inorganique. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohamed V-Agdal, Maroc, 199 p.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. & Kloepper J. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology*, 43: 895-914.
- Hallmann J. & Berg G. (2001). Spectrum and Population Dynamics of Bacterial Root Endophytes. *Soil Biology*, 9 :15-3.
- Han T.X., Wang E.T, Wu L.J. , Chen W.F. , Gu J.G. , Gu C.T. , Tian C. F. & Chen W.X. (2008). *Rhizobium multihospitium* Sp. Nov., Isolated from Multiple Legume Species Native of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ,58 (Pt 7): 1693-99. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65568-0>.
- Hanelt P. (2001). Leguminosae subfamily (Fabaceae). In: Mansfield's Encyclopaedia of *Agricultural and Horticultural Crops 2*: Eds. Hanelt P, Springer, Berlin, Germany. pp 635 - 957.
- Haney R. L., Senseman S. A., Hons F. M. & Zuberer D. A. (2000). Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sciences*, 48: 89–93.
- Haq N. (1983). New food legume crops for the tropics. Better crops for food. Nugent J. and Connor M.O (Eds.). Pitman Books, London (Cuba; Foundation Symposium; 97), 144-160.
- Hardoim P.R., Van Overbeek L.S. & Elsas J.D.V. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16:463–471.
- Harrison A.F. (1987). *Soil Organic Phosphorus: A Review of World Literature*. Wallingford: CABI Publishing.
- Harrison C.J. & Langdale J.A. (2006). A Step by Step Guide to Phylogeny Reconstruction. *The Plant Journal For Cell and Molecular Biology*, 45 (4): 561-72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02611.x>.

REFERENCES

- Harun-or R M., Schäfer H., Gonzalez J. & Wink M. (2012). Genetic Diversity of Rhizobia Nodulating Lentil (*Lens Culinaris*) in Bangladesh. *Systematic and Applied Microbiology*, 35 (2):98-109. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.11.008>.
- Harun-or R.M., Gonzalez J., Young J.P.W. & Wink M. (2014). *Rhizobium leguminosarum* is the Symbiont of Lentils in the Middle East and Europe but Not in Bangladesh. *FEMS Microbiology Ecology*, 87 (1): 64-77. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12190>.
- Harun-or R.M., Young J.W., Everall I, Clercx P., Willems A., Braun S.M. & Wink M. (2015). Average Nucleotide Identity of Genome Sequences Supports the Description of *Rhizobium lentis* Sp. Nov., *Rhizobium bangladeshense* Sp. Nov. and *Rhizobium binae* Sp. Nov. from Lentil (*Lens culinaris*) Nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65 (9): 3037-45. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.000373>.
- Hashem A., Allah E.F., Alqarawi A., Al-Huqail A.A. & WirthS E.D. (2016). The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic bacteria enhances plant growth of *Acacia gerrardii* under salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 7:1–15.
- Haynes R. J. (1986). Origin, distribution and cycling of nitrogen in terrestrial ecosystems. In: Mineral nitrogen in the plant-soil system. R. J. Haynes (Ed.) 1-15, Academic Press, Orlando.
- El-Hilali I. (2006). La symbiose rhizobium-lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en evidence d'une multi-infection nodulaire chez lupinus luteus. Thèse De Doctorat de Biologie; Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohamed V, Rabat (Maroc). 231p.
- Herrera-Cervera, José A., Caballero-Mellado J., Laguerre G., Tichy H.V., Requena N., Amarger N., Martínez-Romero E., Olivares J. & Sanjuan J. (1999). At Least Five Rhizobial Species Nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish Soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30 (1): 87-97. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00638.x>.
- Hirsch A. M., Lum M. R, & Downie J. A. (2001). What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis so Special? *Plant Physiology*, 127 (4): 1484-92.
- Hirsch A.M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122 : 211-237.

REFERENCES

- Hmaeid N., Wali M., Metoui, Pueyo J.J., Ghnaya T. & Abdelly, C. (2018). Efficient rhizobacteria promote growth and alleviate NaCl-induced stress in the plant species *Sulla carnosia*. *Applied soil and ecology*. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.09.011>.
- Holliday P. (1989). *A Dictionary of Plant Pathology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Holmes D.E., Nevin K.P., & Lovley D.R. (2004). Comparison of 16S rRNA, NifD, RecA, GyrB, RpoB and FusA Genes within the Family Geobacteraceae Fam. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (5): 1591-99. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02958-0>.
- Hoque M.S., Broadhurst L.M. & Thrall P.H. (2011). Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 299–309.
- Howell J.A. (1994). Common names given to Bambara groundnut (*Vigna subterranea*: Fabaceae) in central Madagascar. *Economic Botanic*. 45: 217-221.
- Hu Y. & Schmidhalter U. (2001). Reduced cellular cross-sectional area in the leaf elongation zone of wheat causes a decrease in dry weight deposition under saline conditions. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28 : 165-170.
- Huelsenbeck J.P. & Ronquist F. (2001). MRBAYES: *Bayesian Inference of Phylogenetic Trees*. *Bioinformatics* (Oxford, England) 17 (8): 754-55.
- Hung M.H., Bhagwath A.A., Shen F.T., Devasya R.P. & Young C.C. (2005). Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiology*, 49(6): 577-584.
- Hungria M. & Vargas M.A.T. (2000). Environmental factors affecting Nitrogen fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65 : 151-164.
- Hurek T., Reinhold-Hurek B., Montagu V.M. & Kellenberger E. (1994). Root Colonization and Systemic Spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in Grasses, *Journal of Bacteriology*, 176 : 1913-1923.

REFERENCES

- Ibáñez F., Angelini J, Taurian T., Tonelli M.L. & Fabra A. (2009). Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 32:49–55. DOI: 0.1128 / AEM.01715-17.
- Ibny I. Y. F., Jaiswa K. S., Mohammed M. & Dakora D. F. (2019). Symbiotic effectiveness and ecologically adaptive traits of native rhizobial symbionts of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc.) in Africa and their relationship with phylogeny, in Africa and their relationship with phylogeny, *Scientific Reports*, 9:12666. | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48944>.
- Jacquat C. (1990). *Voandzeia subterranea* Thouars. In: *Plants from the markets in Thailand*, Editions Duang Kamol, Bangkok, Thailand. 52p. 143.
- 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 and Evolutionary Microbiology* 47 (3): 895-98. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-895>.
- Jasim B., Joseph A.A., John C.J., Mathew J. & Radhakrishnan E.K. (2013). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. *Biotechnology*, 4 :197–204.
- Jha D. C. & Saraf M. (2015). Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): *a review*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5171.2164>.
- Jida M. & Assefa F. (2012). Phenotypic diversity and plant growth promoting characteristics of *Mesorhizobium* species isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing areas of Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 11(29) : 7483-7493
- Johnston-Monje D. & Raizada M.N. (2011). Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS One* 6:e20396. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020396>.
- Jordan D.C. (1982). A Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32 (1): 136-39. <https://doi.org/10.1099/00207713-32-1-136>.

REFERENCES

- Jordan D. C. (1984). Family III. Rhizobiaceae. *Bergey's manual of systematic bacteriology Springer*. (Vol. 1.) <http://www.springer.com/la/book/9780387987712>.
- Kanchana D., Jayanthi M., Usharani G., Saranraj P. & Sujitha D. (2013 a). Prevalence of *Azotobacter* sp. in Chilli (*Capsicum annuum* L.) rhizosphere soil of Cuddalore district, Tamil Nadu, India. *International Journal of Microbiology Research*, 4(3):296-299.
- Kanchana D., Jayanthi M., Usharani G., Saranraj P. & Sujitha D. (2013 b). Evaluation of Plant growth promoting substance production by *Azospirillum* sp. isolated from rhizosphere of Chilli (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Microbiology Research*, 4(3): 300-304.
- Kang S.M., Joo J.G., Hamayun M., Na I.C., Dong-Hyun Shin H.D., Kim Y.H., Hong K.J. & Lee J.I. (2009). Gibberellin Production and Phosphate Solubilization by Newly Isolated Strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and Its Effect on Plant Growth. *Biotechnology Letters*, 31 (2): 277-281. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9867-2>.
- Karaboneye F. (2013). Caractérisation de l'efficacité symbiotique des lignées africaines de soja à haute promiscuité. Mémoire de Maîtrise en Biologie. Université de Laval, Québec, Canada, 123 p.
- Karikari S.K., Wigglesworth D.J., Kwepe B.C., Balole T.V., Sebolai B. & Munthali D.C. (1997). Country report: Botswana. In: Heller, J. Begemann, F. and Mushonga, J. (Eds.). Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* L. Verde.). Promoting the Conservation and Use of underutilised and Neglected Crops. 9. Proceeding of Workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnuts (*Vigna subterranea* L. Verde.), 14-16 November 1995, Harare, Zimbabwe. pp 11 - 18.
- Karikari K.S. (2000). Variability between local and exotic bambara groundnut landraces in Botswana. *African Crop Science Journal*, 8:153-157.
- Kassem M., Cappelano A. & Gounot A.M. (1985). Effet du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficacité de *Rhizobium meliloti*. *Mircen Journal*, 1 : 63-75.
- Khammas K. M. & Kaiser P. (1991), Characterization of a pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*, *Plant and Soil*, 137: 75-79.

REFERENCES

- Khan M.A., Iqbal Z., Sarwar M., Nisa M., Khan M.S., Lee W.S., Lee H.J. & Kim H.S. (2006). Urea treated corncobs ensiled with or without additives for buffaloes: ruminal characteristics, digestibility and nitrogen metabolism. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 19 (5) : 705-712.
- Khonga E.B, Karikari S.K & Machacha S. (2004). Agronomie performance of nine landraces of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea*) in Botswana. In: Proceeding of the International Bambara Groundnut Symposium" European Union Framework Programme 5 Botswana.
- Kishinevsky B.D., Zur M., Friedman Y., Meromi G., Ben-Moshe E. & Nemas C. (1996). Variation in nitrogen fixation and yield in Landraces of voandzou (*Vigna subterranea*). *Field crops research*. 48(1) : 57-64.
- Kloepper J.W. & Schroth M.N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria*, vol 2. Station of *Vegetal Pathology and Phytobactériology*, INRA, Angers, France, pp 879–882.
- Klu G.Y.P., Amoatey H.M., Bansa D. & Kumaeja F.K. (2001). Cultivation and use of African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa* ex A Rich) in the Volta region of Ghana. *Journal of Food Technology, Africa* 6: 74-77.
- Kobayashi D. & Palumbo J.D. (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: *Microbial endophytes*, Bacon C. W, White J. F. (eds.), Marcel, Dekker, New York, 199-233 p.
- Koffie-Bikpo C.Y. & Kra K.S. (2013). La région du Haut-Sassandra dans la distribution des produits vivriers agricoles en Côte d'Ivoire. *Revue de Géographie Tropicale et d'Environnement*, 2 : 95-103.
- Komarek M., Čadkova E., Chrastný V., Bordas F. & Bollinger J.C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides : A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*, 36 : 138-151.
- Konate I., Amani K., Koffi M., Guei N.K.R., Ouattara A., Tonessia D.C., Filali-Maltouf A. & Akaffou D.S. (2015). Effect of herbicides on rhizobacteria density in experimental fields

REFERENCES

- and on bacterial strains survival in-vitro, research article, *international Journal of Current Research*, 7(5):16361-16365.
- Konaté Z., Assiri A.A., Messoum F.G., Sékou A., Camara M. & Yao-Kouamé A. (2015). Antécédents culturels et identification de quelques pratiques paysannes en replantation cacaoyère en Côte d'Ivoire. *Agronomie Africaine*, 27 (3) : 301-314.
- Konaté Z., Abobi H.D.A., Soko F.D. & Yao-Kouame A. (2018). Effets de la fertilisation des sols à l'aide des déchets ménagers solides compostés dans les décharges sur le rendement et la qualité chimique de la laitue (*Lactuca sativa* L.). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12 (4): 1611-1625.
- Koné M., Paice A.G. & Touré Y. (2011). Bambara Groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verde. (Fabaceae)] Usage in human health. In Preedy: V. R., Watson R. R., Patel V. B. (Editors), *Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention* (1 st ed.). pp 189- 196.
- Koné M., Kouadio Y.L., Neuba D.F.R., Malan D.F. & Coulibaly L. (2014). Évolution de la couverture forestière de la Côte d'Ivoire des années 1960 au début du 21ème siècle. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 7 (2) : 782-794.
- Kotasthane A.S., Agrawal T., Zaidi N.W. & Singh U.S. (2017). Identification of siderophore producing and cyanogenic fluorescent *Pseudomonas* and a simple confrontation assay to identify potential bio-control agent for collar rot of chickpea. *Biotechnology*, 7:1–8.
- Kouamé N.F. & Zoro Bi I.A. (2010). Nouveau découpage de la zone de forêt dense humide de la Côte d'Ivoire. *Sciences & Nature*, 7 (2) : 177-194.
- Kouassi N.J. & Zoro B. I. (2011). Evaluation of agronomic performance of two landraces of Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) in woodland savannahs of Côte d'Ivoire. *African Journal of Agricultural Research*, 6 (21): 4852 - 4856.
- Kovda V.A. (1983). Loss of productive land due to salinization. *Ambio*, 12 : 91-93.
- Kuffner M., Puschenreiter M., Wieshammer G., Gorfer M. & Sessitsch A. (2008). Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil*, 304: 35- 44.

REFERENCES

- Kuklinsky-Sobral J., Mendes R., Geraldi I.O., Pizzirani-kleiner A.A. & Azevedo J.L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environnement Microbiology*, 6(12): 1244-1251.
- Kumar S., Tamura K. & Nei M. (2004). MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5 (2): 150-63.
- Kumar S. & Filipski A. (2007). Multiple Sequence Alignment: In Pursuit of Homologous DNA Positions. *Genome Research*, 17 (2): 127-35. <https://doi.org/10.1101/gr.5232407>.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35:1547-1549.
- Kumar P. & Dubey R.C. (2012). Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Biocontrol of Phytopathogens and Yield Enhancement of Phaseolus vulgaris. *Journal of Current Perspectives in Applied Microbiology*, 1: 6-38.
- Kumari B.S., Ram M.R. & Mallaiah, K.V. (2010). Studies on nodulation, biochemical analysis and protein profiles of Rhizobium isolated from Indigofera species, *Malaysian. Journal of Microbiology*, 6 :133-139.
- Kumawat K.C., Sharma P., Sirari A., Singh I., Gill B.S., Singh U. & Saharan K. (2019). Synergism of Pseudomonas aeruginosa (LSE-2) nodule endophyte with Bradyrhizobium sp. (LSBR-3) for improving plant growth, nutrient acquisition and soil health in soybean. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35:1–17.
- Labuschagne A., van Rensburg N.F.J. & van der Merwe A.J. (2009). Comparison of linear beam theories. *Mathematical and Computer Modelling*, 49: 20–30 <https://doi.org/10.1016/j.mcm.2008.06.006>.
- Laguerre G., Mazurier I.S. & Amarger N. (1992). Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae in field populations. *FEMS Microbiology Letters*, 101 (1): 17-26. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90693-I](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90693-I).

REFERENCES

- Laguerre G., Bardin M. & Amarger N. (1993). Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hybridization. *Canadian Journal of Microbiology*, 39 (12): 1142-49. <https://doi.org/10.1139/m93-172>.
- Laguerre G., Mavingui P., Allard M.R, Charnay M.P, Louvrier P., Mazurier S.I., Rigottier-Gois L. & Amarger N. (1996). Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (6): 2029-36.
- Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P. & Amarger N. (2001), Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 147 (4): 981-93. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981>.
- Lajudie, P. de, E. Laurent-Fulele, A. Willems, U. Torck, R. Coopman, M. D. Collins, K. Kersters, B. Dreyfus & M. Gillis. (1998). *Allorhizobium undicola* Gen. Nov., Sp. Nov., Nitrogen-Fixing Bacteria That Efficiently Nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 (4): 1277-90. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1277>.
- Leite J., Fischer D., Rouws L. F., Fernandes-Junior P.I., Hofmann A., Kublik S., Schloter M., Xavier G.R. & Radl V. (2017). Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. *Frontiers in Plant Sciences*, 7:2064. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02064>
- Leite J., Passos R. S., Simoes-Araújo J. L., Rumjaneck G.N., Xavier R.G. & Zili E.J. (2018). Genomic identification and characterization of the elite strains Bradyrhizobium Yuanmingense BR 3267 and Bradyrhizobium pachyrhizi BR 3262 recommended for cowpea inoculation in Brazil, *Brazilian journal of Micobiology*, 49 : 703-713. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.007>.
- León M.J., Hoffmann T., Sánchez-Porro C., Heider J., Ventosa A. & Bremer E. (2018). Compatible Solute Synthesis and Import by the Moderate Halophile *Spiribacter salinus*: physiology and genomics. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00108>.

REFERENCES

- Li J. H., Wang T., Chen W. F. & Chen W. X. (2008). Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 40 : 238–246.
- Li L., Sinkko H., Montonen L., Wei G., Lindstrom K., Rasanen L.A. (2012). Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal Glycyrrhiza species in China. *FEMS Microbiology Ecology*, 79: 46.
- Linnemann A.R. (1987). Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verde.). Review and Abstract on *Tropical Agriculture*, 12 (7): 9 - 25.
- Linnemann A.R & Azam-Ali S. (1993). Bambara groundnut (*Vigna subterranea*). In: Williams, J.T. (Editor). *Pulses and vegetables*. Chapman and Hall, London. p. 13-58.
- Liu C.W. & Murray D.J. (2016). The Role of Flavonoids in Nodulation Host-Range Specificity: An Update. *Plants*, 5 (3). <https://doi.org/10.3390/plants5030033>.
- Liu D., Lian B. & Dong H. (2012). Isolation of Paenibacillus sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiology*, 29: 413-421.
- Long S. R. (1996). Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell*, 8 : 1885-1898.
- Loper J.E. & Gross H. (2007). Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *European Journal of Plant Pathology*, 119: 265-278.
- Lopez M., Herrera-Cervera J.A., Iribarne C., Tejera N.A. & Lluch C. (2008). Growth and nitrogen fixation in Lotus japonicus and Medicago truncatula under NaCl stress : Nodule carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 165 : 641-650.
- Lugtenberg B. & Kamilova F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63: 541-556.
- Lugtenberg B., Malfanova N., Kamilova F. & Berg G. (2013). Plant Growth Promotion by Microbes. In *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, édité par Frans Journal de Bruijn, 559-573. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch53>.

REFERENCES

- Lyra M.C.C.P., Freitas A.D.S, Silva T.A., Santos CERS. (2013). Phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian Spodosols. *African Journal of Biotechnology*, 12: 2147-2156.
- Maâtallah J, Berraho E.B, Munoz S, Sanjuan J. & Luch C. (2001). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing in Moroccan soils. *Agronomie*. 22, 321-329. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01718.x>
- Maâtallah J., Berraho E.B., Munoz S., Sanjuan J. & Luch C. (2002). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing in Moroccan soils. *Agronomie*, 22 : 321-329.
- Maâtallah J. (2003). Biodiversité et position phylogénétique des rhizobia nodulant le pois chiche au Maroc: evidence d'un transfert de gene de nodulation entre Mesorhizobium et Sinorhizobium. Thèse de Doctorat d'Etat Es-Sciences. Université Mohammed V, Rabat. 152p.
- Mahdi S.S., Hassan G.I., Samoon S.A., Rather H.A., Dar Showkat A. & Zehra B. (2010). Bio-fertilizer in organic agriculture. *Journal of Phytology*, 2(10) : 42-54.
- Maiden M.C. J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., et al. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (6): 3140-45.
- Manninger E. & Antal M (1970). Rhizobien und andere Bakterien in den Wurzelknollchender Leguminosen. I. Die Entkeimung der Oberflache der Wurzelknollchen von Soja max. *Bakteriol Parasitenk Infektionskr*, 124: 684-687.
- Maréchal R., Mecberpa J.M. & Stainer F. (1978). Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (*Papilionaceae*) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera*, 28: 177 - 178.
- Martens M., Dawyndt P., Coopman R., Gillis M., De Vos P., & Willems A. (2008). Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*).

REFERENCES

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58 (1): 200-214.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65392-0>.
- Martensson A. M., Brutti L. & Ljunggren H. (1989). Competition between strains of *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation of soybeans at different nitrogen fertilizer levels. *Plant and Soil*, 117: 219-225.
- Martinez de Drets G. & Arias A. (1972). Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast growing and slow growing groups. *Journal of Bacteriology*, 109: 467-470.
- Martínez-Hidalgo P. & Hirsch A.M. (2017). The Nodule Microbiome: N₂-Fixing Rhizobia DoNot Live Alone. *Reviews in Phytobiomes Journal*, 1 (2) : 70-82.
- Martinez-Romero E., Romero D. & Palacio R. (1990). The *Rhizobium* genome. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 9, 59-93.
- Martinez-Romero E. & Caballero-Mellado J. (1996). *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical.Reviews in Plant Sciences*. 15, 113-140.
- Martínez-Romero E. (2003.). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* Symbiosis: Overview and Perspectives. *Plant and Soil*, 252 (1): 11-23.
<https://doi.org/10.1023/A:1024199013926>.
- Martínez-Viveros O., Jorquera M. A., Crowley D. E., Gajardo G. & Mora M. L. (2010). Mecanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3): 293-319.
<https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006>.
- Massawe F.J., Mwale S.S., Azam-Ali S.N. & Roberts J.A. (2005). Breeding in Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.): Strategic considerations Tropical Crops Research Unit. *African Journal of Biotechnology*, 4: 463-471.
- Masson-Boivin C., Giraud E., Perret X., & Batut J. (2009). Establishing Nitrogen-Fixing Symbiosis with Legumes: How Many *Rhizobium* Recipes? *Trends in Microbiology*, 17 (10): 458-66. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004>.
- Mazoyer M. (2002). Larousse agricole. Montréal (Québec), Larousse. 767p.

REFERENCES

- McGown J. (2006). Cosmetics from biodiversity. In: Burrows B. eds. OUI of Africa: Mysteries of Access and Benefit Sharing. Edmonds Institute in cooperation with African Centre for Biosafety. USA. pp 13- 18.
- Mehnaz S. (2013). Secondary Metabolites of *Pseudomonas aurantiaca* and Their Role in Plant Growth Promotion. In: Arora NK (ed.) *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. Springer, India, pp. 373-394.
- Mehnaz S., Kowalik T., Reynolds B. & Lazarovits G. (2010). Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology and Biochemistry journal*, 42 : 1848-1856.
- Mehnaz S., Saleem Z.S.R., Yameen B., Pianet I., Schnakenburg G., Pietraszkiewicz H., Valeriote F., Josten M., Sahl H.G., Franzblau G.S. & Gross H. (2013). Lahorenoic Acids A–C, ortho-Dialkyl-Substituted Aromatic Acids from the Biocontrol Strain *Pseudomonas aurantiaca* PB-St2. *Journal of natural products*, 76 : 135-141. [dx.doi.org/10.1021/np3005166](https://doi.org/10.1021/np3005166).
- Mhungu S. & Chiteka Z.A. (2010). The effect of timing of earthing up on the performance of four Bambara groundnut landrace cultivars in the Mutasa District of Manicaland Province in Zimbabwe.. *Research Application Surnmary*, pp 219- 223.
- Michener D.C. & Sokal R.R. (1957). A Quantitative Approach to a Problem in Classification, *Evolution*, 11(2) : 130-162 DOI: 10.2307/2406046
- Miklashevichs E.H., Rohrig J. & Schmidt S.J. (2001). Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 20 : 373-394.
- MINAGRI. (2008). Mission de suivi de la saison agricole et de la sécurité alimentaire de l'année 2007. Rapport de mission. 65 p.
- MINAGRI. (2010). Annuaire des statistiques agricoles. Direction des statistiques, de la documentation et de l'informatique, Abidjan, 73 p.
- Miransari M. & Smith D.L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99: 110- 12.
- Miransari M. (2011). Soil Microbes and Environmental Health. *Nova Publishers*, 314 p.

REFERENCES

- Miransari M., & Mackenzie A.F. (2011). Development of a soil N-test for fertilizer requirements for corn (*Zea mays* L.) production in Québec. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 42 : 50-65.
- Missbah E.I.M., N. Auajjar A. Belabed Dessaux Y., Filali-Maltouf A. (1996). Characterization of rhizobia isolated from carob tree (*Ceratonia siliqua*) .*Journal of Applied Bacteriology*, 80 : 165-173.
- Mohamad R. & Al- naser Z. (2018). Effect of pesticides and essential oils in the growth of rhizobial isolated from nodules of some leguminous plants in vitro. *The Arab Journal for Arid Environments*, 1 : 111-117.
- Mohamed S.H. Smouni A., Neyra M., Kharchaf D. & Filali-Matouf A. (2000). Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. *Plant & Soil*, 224, 171-183.
- Moulin L., Munive A., Dreyfus B. & Boivin-Masson C. (2001). Nodulation of Legumes by Members of the β -Subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411 (6840): 948-50. <https://doi.org/10.1038/35082070>.
- Moulin L, Béna G, Boivin-Masson C. & Stępkowski T. (2004). Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30 (3): 720-32. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00255-0](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00255-0).
- Mousavi S. A, Willems., Nesme X., de Lajudie P., & Lindström K. (2015). Revised Phylogeny of Rhizobiaceae: Proposal of the Delineation of *Pararhizobium* Gen. Nov., and 13 New Species Combinations. *Systematic and Applied Microbiology*, 38 (2): 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.003>.
- Mousavi S. A., Österman J., Wahlberg N., Nesme X., Lavire C., Vial L., Paulin L., de Lajudie P., & Lindström K. (2014). Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* Clade Supports the Delineation of *Neorhizobium* Gen. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 37 (3): 208-15. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007>
- Mulas D., García-Fraile P., Carro L., Ramírez-Bahena M.H., Casquero P., Velázquez E. & González-Andrés F. (2011). Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum*

REFERENCES

- strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in Northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (11): 2283-93. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.07.018>.
- Munns D. N. (1968). Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. III. Effects of nitrate on root hairs and infection. *Plant Soil*, 29 : 33– 49.
- Muresu R., Polone E., Sulas L., Baldan B., Tondello A., Delogu G., Cappuccinelli P., Alberghini S., Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Mori B., Calamassi R., Dazzo F.B. & Squartini A. (2008). Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiology Ecology*, 63:383-400. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00424.x.
- Murukumbira L.M. (1985). Effects of rate of fertilizer nitrogen and previous grain legume crop on maize yields. *Zimbabwe Agriculture Journal*, 82(6): 177-179.
- Mutch L.A., & Young J. P.W. (2004). Diversity and Specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on Wild and Cultivated Legumes. *Molecular Ecology*, 13 (8): 2435-44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02259.x>.
- Nandal K., Sehrawat A.R., Yadav A.S., Vashishat R.K. & Boora K.S. (2005). High temperature-induced changes in exopolysaccharides, lipopolysaccharides and protein profile of heat-resistant mutants of *Rhizobium* sp. (Cajanus). *Microbiological Research*, 160 : 367-373.
- Nandi M., Selin C., Brawerman G. et al. (2017). Hydrogen cyanide, which contributes to *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 biocontrol, is upregulated in the presence of glycine. *Biological Control*, 108:47–54.
- Naureen Z., Rehman N.U., Hussain H. et al. (2017). Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01477>.
- Naznin H.A., Kimura M., Miyazawa M. & Hyakumachi M. (2012). Analysis of volatile organic compounds emitted by plant growth promoting fungus *phoma* sp. GS83 for growth promotion effects on tobacco. *Microbes and Environments*, 28: 42-49.

REFERENCES

- Ndiaye A.A. (1996). Diversité et fixation d'azote des rhizobiums d'Acacia. Dakar, Diplôme d'Etudes Approfondies. Université Cheikh Anta Diop, 43 p.
- Nei M. (2005). Selectionism and Neutralism in Molecular Evolution. *Molecular biology and evolution*, 22 (12): 2318-42. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi242>.
- Nei M. & Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Book.Google.Com, Oxford (New York), Oxford University Press.
- Ngamo L.S.T. & Hance T. (2007). Diversité des ravageurs et denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical. *Tropicultura*, 25 (4) : 215-220.
- Nguy-ntamag F.C. (1995). Contry reports. In: Research, I.o.P.G.a.C.P. (Ed.), Proceedings of the workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.). Harare, Zimbabwe, pp.27-29.
- Nicholas K.B., Nicholas Jr. H.B., & Deerfield II D.W. (1997). GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. 1997, 4(2) édition. <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/ebinet.htm>.
- Noumavo P.A., Agbodjato A.N., Baba-Moussa F., Adjanooun A., & Baba-Moussa L. (2016). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Beneficial Effects for Healthy and Sustainable Agriculture. *African Journal of Biotechnology*, 15(27): 1452-1463. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15397>.
- Ntundu W. H., Shillah S. A., Marandu W. Y. F. & Christiansen J. L. (2006). Morphological Diversity of voandzou (*Vigna subterranea* L.) Verdc.) Landraces in Tanzania. *Genetic Resources and Crop Evolution*. Springer Netherlands. 53: 367–378.
- Okogun J.A. & Sanginga N. (2003). Can introduced and indigenous rhizobial strains compete for nodule formation by promiscuous soybean in the moist savanna agroecological zone of Nigeria? *Biology and Fertility of Soils*, 38: 26–31.
- Olanrewaju O.S., Glick B.R & Babalola O.O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33:197. DOI: 10.1007/s11274-017-2364-9.

REFERENCES

- Ollivier J., Töwe S., Bannert A., Hai B., Kastl E., Meyer A., Su M. X., Kleineidam K. & Schloter M. (2011). Nitrogen Turnover in Soil and Global Change. *FEMS Microbiology Ecology*, 78 (1): 3-16. <https://doi.org/10.1111/j.15746941.2011.01165.x>.
- Omidvari M, Sharifi R. A, Ahmadzadeh M, Dahaji P. A, (2010). Role of *fluorescent pseudomonads* siderophore to increase bean growth factors. *Journal of Agricultural Sciences*, 2: 242–247.
- Onyango B., Anyango B., Nyunja R., Koech P. K., Skilton R.A., Stomeo F. (2015). Morphological, genetic and symbiotic characterization of root nodule bacteria isolated from Bambara groundnuts (*Vigna subterranea* L. Verdc) from soils of Lake Victoria basin, western Kenya. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 3: 001-010. <https://doi.org/10.7324/JABB.2015.3101>.
- Oren A., & Papke R.T. (2010). Molecular Phylogeny of Microorganisms. *Horizon Scientific Press*.
- Oteino N., Lally R.D., Kiwanuka S., Lloyd A., Ryan D., Germaine K.J. & Dowling D.N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6 : 745 .| <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00745>
- Othman H. & Samih M.T. (2016). Characterization of rhizobia nodulating faba bean plants isolated from soils of Jordan for plant growth promoting activities and N₂ fixation potential. 2016, *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences édition*.
- Ouedraogo O.G. (1996). Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso ; cas du plateau central. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Ouagadougou, 266p.
- Ozawa T., Ohwaki A., Okumura K. (2003). Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from the surface-sterilized roots of some legumes. *Agriculture & Biology Sciences*, 55: 29 –36.
- Pagano M.C. (2008). Rhizobia associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration. *Plant Soil and Environment*, 54 (11): 498–508.

REFERENCES

- Palaniappan P., Chauhan P.S., Saravanan V.S., Anandham R. & Sa T. (2010). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biology and Fertility of Soils*: 46:807-816.
- Pandya M., Kumar N.G & Rajkumar S. (2013). Invasion of rhizobial infection thread by non-rhizobia for colonization of *Vigna radiata* root nodules. *FEMS Microbiology Letters*, 348 : 58–65.
- Pandya M., Rajput M. & Rajkumar S. (2015). Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiata* *Microbiology*, 84:80-89.
- Panwar M., Tewari R. & Nayyar H. (2014). Microbial consortium of plant growth-promoting rhizobacteria improve the performance of plants growing in stressed soils: an overview. In: Khan, M.S., Zaidi, A., Musarrat, J. (Eds.), *Phosphate Solubilizing Microorganisms*. Springer International Publishing Switzerland, pp. 257–285.
- Parada M., Vinardell J., Ollero F., Hidalgo A., Gutiérrez R. *et al.* (2006). *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. International society for Molecular. *Plant-Microbe Interactions*, 19: 43-52.
- Parmar P. & Sindhu S.S. (2013). Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions. *Journal of Microbiology Research*, 3: 25-31.
- Pawlowski K. & Bisseling T. (1996). Rhizobial and actinorhizal symbioses : what are the shared features ? *Plant Cell*, 8 : 1899-1913.
- Pazdernik D.L., Vance C.P., Sadowsky M.J & Graham P.H. (1997). A host controlled, serogroup-specific, ineffective-nodulation system in the *Bradyrhizobium*-soybean (*Glycine max*) symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10 : 994-1001.
- Pedrosa F.O., Hungria M., Yates G., & Newton E.W. (2006). Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity: Proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Foz Do Iguaçú, Paraná, Brazil, September 12–17, 1999. Springer Science & Business Media.

REFERENCES

- Peix A., Rivas-Boyer A.A., Mateos P.F., Rodriguez-Barrueco C., Martinez-Molina E. & Velazquez E. (2001). Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 33 : 103–110.
- Peix A., Ramírez-Bahena M. H., Velázquez E., Bedmar E. J. (2015). Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34:17–42. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899>.
- Peoples M.B. & Craswell E.T. (1992). Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil*, 141: 13-39.
- Perret X., Staehelin C. & Broughton J.W. (2000). Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (1): 180-201. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000>.
- Phillipson M.N. & Blair I.D. (1957). Bacteria in clover root tissue. *Canadian Journal of Microbiology*, 3:125-129.
- Pikovskaya R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologia*, 1948, 17 édition.
- Podile A.R. & Kishore G.K. (2007). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In *Plant-Associated Bacteria*, Springer, 195-230. Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_6.
- Pope M.R., Saari L.L. & Ludden P.W. (1986). N-glycohydrolysis of adenosine diphosphoribosyl arginine linkages by dinitrogenase reductase activating glycohydrolase (activating enzyme) from *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Biological Chemistry*, 261 : 10104-10111.
- PRICI. (2016). Cadre de Gestion Environnementale et Sociale (CGES), financement additionnel au projet d'urgence de renaissance des infrastructures. Rapport final. 204 p.
- Pueppke S. G. & Broughton W. J. (1999). Rhizobium Sp. Strain NGR234 and R. fredii USDA257 Share Exceptionally Broad, Nested Host Ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 12 (4): 293-318. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.4.293>.

REFERENCES

- Puoza D. K., Jaiswal S. K. & Dakora F. D. (2017). African origin of Bradyrhizobium populations nodulating Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc) in Ghanaian and South African soils. *PLoS*, 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184943>
- Quadt-Hallmann A., Benhamou N. & Klopper J.W. (1997). Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 577-582.
- Qureshi Adnan I., Mendelow A. D., & Hanley D. F. (2009). Intracerebral Haemorrhage. *Lancet* (London, England) 373 (9675): 1632-1644. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60371-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60371-8).
- R Core Team (2018): A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Rachie O.K. (1979). Tropical legumes: resources for the future. National Academy of Sciences, 331 p.
- Rahmani H.A., Saleh-rastin N., Khavazi K., Asgharzadeh A., Fewer D., Kiani S. & Lindström K. (2009). Selection of thermotolerant bradyrhizobial strains for nodulation of soybean (*Glycine max* L.) in semi-arid regions of Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25 : 591-600.
- Rai R., Dash P.K., Mohapatra T. & Singh A. (2012). Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. *Indian Journal of Biology*, 50: 340-350.
- Rajendran G., Patel M.H. & Joshi S.J. (2012). Isolation and characterization of nodule associated *Exiguobacterium* sp. from the root nodules of Fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) and their possible role in plant growth promotion. *International Journal of Microbiology*. doi:10.1155/2012/693982.
- Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchander T., Prakasam V. & Samiyappan R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crops Protection*, 20, 1-11.
- Ramdani T. & Hadroug H. (2017). Influence des pesticides sur la croissance des Rizobium. Mémoire de Master, Université A. MIRA – Bejaia : 67 p.

REFERENCES

- Ramesh A., Sharma S.K., Sharma M.P., Yadav N. & Joshi O.P. (2014). Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhatai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Applied Soil Ecology*, 73:87–96.
- Ramírez-Bahena M.H., García-Fraile P., Peix A., Valverde A., Rivas R., Igual J.M., Mateos P.F., Martínez-Molina E. & Velázquez E. (2008). Revision of the Taxonomic Status of the Species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* Is a Later Synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the Strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* Sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58 (Pt 11): 2484-90. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65621-0>.
- Rassel A. (1960). Le voandzou (*Voandzeia subterranea* Thou.) et sa culture au Kwango. Congo Belge et du Rwanda-Burundi. *Bulletin Agriculture*, 51: 1 - 26.
- Rees D.S., Kim J., Georgiadis M., Chan M.K., Kimo H., Komiya H., Woo D., Chirino A.J. & Schlessman J. (1993). Structure and functions of the nitrogenase proteins. New horizons in nitrogen fixation. *Palacios R*, Editors. Kluwer : the Netherlands, P.83-89.
- Reinhold-Hurek B. & Hurek T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current opinion in Plant biology*, 14:435-443.
- Remigi P., Zhu J., Young J. P.W. & Masson-Boivin C. (2016). Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. *Trends in Microbiology* 24 (1): 63-75. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.007>.
- Riah N., Béna G., Djekoun A., Heulin K., de Lajudie P. & Laguerre G. (2014). Genotypic and Symbiotic Diversity of *Rhizobium* Populations Associated with Cultivated Lentil and Pea in Sub-Humid and Semi-Arid Regions of Eastern Algeria. *Systematic and Applied Microbiology*, 37 (5): 368-75. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.008>.
- Ribeiro R.A., Barcellos G.F., Thompson L.F. & Hungria M. (2009). Multilocus Sequence Analysis of Brazilian *Rhizobium* Microsymbionts of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Reveals Unexpected Taxonomic Diversity. *Research in Microbiology*, 160 (4): 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.03.009>.

REFERENCES

- Richter G. (1993). *Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie*. Ed .press polytechniques et universitaires Romandes, 526 p.
- Rivas R., Garcia-Fraile P. & Velázquez. (2009). Taxonomy of Bacteria nodulating Legumes. *Microbiology Insights*, 2 :251-269.
- Rivas R., Peix A., Mateos P.F., Trujillo M.E., Martinez-Molina E. & Velazquez E. (2006). Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulate chickpea in different Spanish soils. *Plant Soil*, 287(1-2):23-33. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-006-9062-y>.
- Roos I.M.M. & Hattingh M.J. (1987). Systemic invasion of plum leaves and shoots by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* introduced into petioles. *Phytopathology*, 77:1253-1257.
- Ruduś I., Sasiak M. & Kępczyński J. (2013). Regulation of Ethylene Biosynthesis at the Level of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase (ACO) Gene. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35 (2): 295-307. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1096-6>.
- Rybakova D., Cernava T., Koberl M., Liebminger S., Etemadi M. & Berg G. (2016). Endophytes-assisted biocontrol: novel insights in ecology and the mode of action of *Paenibacillus*. *Plant Soil*, 405:125–140.
- Sacherer P., Défago G. & Haas D. (1994). Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiology Letters*, 116: 155-160.
- Saharan S.B. & Nehra V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Science and Medicine Research*, 21 (janvier): 1-30.
- Saïdi S., Chebil S., Gtari M. & Mhamdi R. (2013). Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29:1099–1106. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1278-4>.
- Saïdi S., Ramírez-Bahena H.M., Santillana N., Zúñiga D., Álvarez-Martínez E., Peix A., Mhamdi R. & Velázquez E. (2014). *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia*

REFERENCES

- faba on several continents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (PART 1): 242-47. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.052191-0>.
- 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*, 8:1–16.
- Saini R., Dudeja S.S., Giri R. & Kumar V. (2015). Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivated in Northern India. *Journal of Basic Microbiology*, 55: 74-81.
- Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4):406-425.
- Salehi M., Salehi F., Poustini K. & Heidari-Sharifabad H. (2008). The effect of salinity on the nitrogen fixation in four cultivars of *Medicago sativa* L. in the seedling emergence stage. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4 : 413-415.
- Sami D., Mokhtar R., Peter M., & Mohamed M. (2016). *Rhizobium leguminosarum* Symbiovar *Trifolii*, *Ensifer numidicus* and *Mesorhizobium amorphae* Symbiovar *Ciceri* (or *Mesorhizobium loti*) Are New Endosymbiotic Bacteria of *Lens culinaris* Medik. *FEMS Microbiology Ecology*, 92 (8). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw118>.
- Sanchez F., Padilla J.E., Hector P. & Lara M. (1991). Control of nodulin genes in root nodule development and metabolism. *Annu .Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42: 507-528.
- Santiago C., Yagi S., Ijima M., Nashimoto T., Sawada M., Ikeda S., Asano K., Orikasa Y. & Ohwada T. (2017). Bacterial compatibility in combined inoculations enhances the growth of potato seedlings. *Microbiology and Environment*, 32:14–23.
- Santillana N., Ramírez-Bahena H.M., García-Fraile P., Velázquez E. & Zúñiga D. (2008). Phylogenetic Diversity Based on *Rrs*, *AtpD*, *RecA* Genes and 16S-23S Intergenic Sequence Analyses of Rhizobial Strains Isolated from *Vicia faba* and *Pisum Sativum* in Peru. *Archives of Microbiology*, 189 (3): 239-47. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0313-y>.

REFERENCES

- Santoyo G., Orozco-Mosqueda M.C., Moreno-Hagelsieb G. & Glick B.R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183:92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.
- Sarwar M., Arshad M., Martens D.A., Frankenberger W. T. (1992). Tryptophan-Dependent Biosynthesis of Auxins in Soil. *Plant and Soil*, 47 (2): 207-15.
- Sawada H., Ieki H., Oyaizu H. & Matsumoto S. (1993). Proposal for Rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and Revised Descriptions for the Genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43 (4): 694-702. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-4-694>.
- Sayed R.Z., Badgajar M.D, Sonawane H.M., Mhaske M.M & Chincholkar S.B. (2005). Production of microbial iron chelators (siderophores) by *fluorescent pseudomonas*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4: 484–490.
- Sbabou L., Regragui A., Filali-Maltouf A., Ater M. & Béna G. (2016). Local Genetic Structure and Worldwide Phylogenetic Position of Symbiotic *Rhizobium leguminosarum* Strains Associated with a Traditional Cultivated Crop, *Vicia ervilia*, from Northern Morocco. *Systematic and Applied Microbiology*, 39 (6): 409-17. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.06.005>.
- Schindler F.V. & Knightin R.E. (1999). Fate of fertilizer nitrogen applied to corn as estimated by the isotopic and difference methods. *Soil Science Society of America Journal*, 63 : 1734-1740.
- Schleifer K.H. & Ludwig W. (1989). Phylogenetic relationships of bacteria. In: *Fernholm B, Bremer K, Jörnvall H (eds) The hierarchy of life*, Elsevier, Amsterdam, pp 103–107.
- Schloss, Patrick D., Sarah L. Westcott, Thomas Ryabin, Justine R. Hall, Martin Hartmann, Emily B. Hollister, Ryan A. Lesniewski *et al.* 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (23): 7537-41. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
- Schulz B., Boyle C. (2006). What are endophytes? In: *Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN (eds) Microbial root endophytes*. Springer-Verlag, Berlin, pp 1–13.

REFERENCES

- Schwyn B. & Neilands J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160 (1); 47-56.
- Scott R.I., Chard J.M., Hocart M.J., Lennard J.H. & Graham D.C. (1996). Penetration of potato tuber lenticels by bacteria in relation to biological control of blackleg disease. *Potato Research*, 39:333-334.
- Shamseldin A., Carro L., Peix A., Velázquez E., Moawad H. & Sadowsky J.M. (2016). The symbiovar trifolii of *Rhizobium bangladeshense* and *Rhizobium aegyptiacum* sp. nov. nodulate *Trifolium alexandrinum* in Egypt. *Systematic and Applied Microbiology*, 39 (4): 275-79. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.05.002>.
- Shen J., Yuan L., Zhang J., Li H., Bai Z., Chen X., Zhang W. & Zhang F. (2011). Phosphorus Dynamics: *From Soil to Plant*. *Plant Physiology*, 156 (3): 997-1005. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>.
- Sherwood J. E., Truchet G. L. & Dazzo F. B. (1984). Effect of nitrate supply on the in vivo synthesis and distribution of trifoliin A, a *Rhizobium trifolii* binding lectin, in *Trifolium repens* seedlings. *Planta*, 126 : 540-547.
- Shilev S. (2013). Soil Rhizobacteria Regulating the Uptake of Nutrients and Undesirable Elements by Plants. In: Arora NK (ed.) *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*, Springer, India, 147-50.
- Siddikee M.A., Glick B.R., Chauhan P.S., Yim W.J & Sa T. (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane- 1-carboxylic acid deaminase activity, *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (4) : 427–434.
- Silva C., Vinuesa P., Eguiarte L.E., Martínez-Romero E. & Souza V. (2003). *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* Nodulate Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in a Traditionally Managed Milpa Plot in Mexico: Population Genetics and Biogeographic Implications. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2): 884-93. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.884-893.2003>.

REFERENCES

- Singh B., Chambliss O.L. & Sharma B. (1997). Recent advances in cowpea breeding. *Advances in cowpea research*. 15p.
- Singh B., Kaur R. & Singh K. (2008.) Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). *African Journal of Biotechnology*, 7(20): 3671-3676.
- Skerman V. B. D., McGowan V. & Sneath P. H. A. (1989). Approved Lists of Bacterial Names (Amended). Washington (DC): ASM Press.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK814/>
- Skerman V.B.D., McGowan V. & Sneath P.H.A. (1980). Proved Lists of Bacterials Names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30 : 225-42.
- Smith K.P. & Goodman R.M. (1999). Host variation for interactions with beneficial plant associated microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 37 : 473-491.
- Sneath P.H.A. & Sokal R.R. (1973). Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. Numerical Taxonomy.
- Somasegaran P. & Hoben H. (1994). Handbook for Rhizobia Methods in *Legume-Rhizobium Technology*. (Springer-Verlag,).
- Spaepen S., Vanderleyden J. & Remans R. (2007). Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism- plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31:425–448.
- Spaepen S. & Vanderleyden J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harbor Perspectives in *Biology* 3 (4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>.
- Spiers A.J., Buckling A. & Rainey P.B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* , 146: 2345–2350.
- Sprent J.I. (1984). Nitrogen fixation in: *Advanced plant physiology*. Ed Malcolm B Wilkins.
- Stackebrandt E. & Goebel B.M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44 :846–849.

REFERENCES

- Staddon W.J., Trevors J.T., Duchesne L.C. & Colombo C. (1998). Soil Microbial Diversity and Community Structure across a Climatic Gradient in Western Canada. *Biodiversity & Conservation*, 7 (8): 1081-92. <https://doi.org/10.1023/A:1008813232395>.
- Stagnari F., Maggio A., Galieni A. & Pisante M. (2017). Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological technologies in Agriculture*, 4:2. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>.
- Strobel G. & Daisy B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67:491-502. **DOI:** 10.1128 / MMBR.67.4.491-502.2003.
- Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S. & Nuti M.P. (1998). Metabolic proprieties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. In: *Journal of Applied Microbiology.*, 84 : 81-89.
- Sturz A.V., Christie B.R., Matheson B.G. & Nowak J. (1997). Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, 25: 13.
- Subbarao K., Bonnerjee A., Braithwaite J., Carvalho S., Ezemenari K., Graham C. & Thompson A. (1997). Safety Net Programs and Poverty Reduction : *Lessons from Cross Country Experience*. *Directions in Development*, World Bank : Washington D.C.
- Subramanian P., Kim K., Krishnamoorthy R., Sundaram S. & Sa T. (2015). Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. *Plant Growth Regulation* , 76:327–332.
- Sujatha N. & Ammani K. (2013). Siderophore production by the isolates of *fluorescent Pseudomonas*. *International Journal of Current and Research Reviews*, 5: 1-7.
- Sullivan J. T., & Ronson C. W. (1998). Evolution of Rhizobia by Acquisition of a 500-Kb Symbiosis Island That Integrates into a Phe-TRNA Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (9): 5145-49.

REFERENCES

- Sullivan J.T., Trzebiatowski R.J., Cruickshank W.R., Gouzy J, Brown D.S, Elliot M.R., Fleetwood J.D. *et al.* (2002). Comparative Sequence Analysis of the Symbiosis Island of *Mesorhizobium loti* Strain R7A. *Journal of Bacteriology*, 184 (11): 3086-95.
- Suwanprasert J., Toojinda T., Srinives P. & Chanprame S. (2006). Hybridization Technique for Bambara Groundnut. *Breeding Science*, 56 : 125-129.
- Swanevelder C.J. (1998). Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verde.) - food for Africa. National Department of Agriculture-Grain Crops Institute, *Potchefstroom*, South Africa. 16 p.
- Swofford D.L., Olsen G.J., Waddell P.J. & Hillis D.M. (1996). Phylogenetic inference. In *Molecular systematics* (2nd ed.), édité par DM Hillis, C Moritz, et BK Mable, 407-514. Sinauer Associates, Inc.
- Taffouo V.D., Wamba O.F. & Akoa N.G. (2010). Growth, Yield, Water Status and Ionic Distribution Response of three Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) Landraces Grown under Saline Conditions. *International Journal of Botany*, 6(1) : 53-58.
- Taha K., Berraho E.B., Attar E.I., Dekkiche S., Aurag J. & Béna G. (2017). *Rhizobium laguerreae* is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris*) in Morocco. *Systematic Applied and Microbiology*, (2017) DOI 10.1016/j.syapm.2017.09.008.
- Taha K. (2018). Diversité et structure génétique des rhizobiums nodulant la lentille (*Lens culinaris*) au Maroc, caractérisation symbiotique et tolérance au déficit hydrique, Thèse de Doctorat, Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes. Université Mohamed V, Rabat (Maroc), 107p.
- Talbi C., Delgado M. J., Girard L., Ramírez-Trujillo A., Caballero-Mellado J. & Bedmar E. J. (2010). *Burkholderia phymatum* Strains Capable of Nodulating *Phaseolus vulgaris* Are Present in Moroccan Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (13): 4587-91. <https://doi.org/10.1128/AEM.02886-09>.

REFERENCES

- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725-29. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Tamura K., Nei M. & Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 101: 11030-11035.
- Tan Z.Y., Wang E.T., Peng G.X., Zhu M.E., Martinez-Romero E. & Chen W.X. (1999). Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 49 (4) : 1457-1469.
- Tan Z, Hurek T et Reinhold-Hurek B. (2003). Effect of N-fertilisation plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice. *Environmental Microbiology*, 5: 1009-1015. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00491.x>.
- Tariq M., Hameed S., Yasmeen T., Zahid M. *et al.* (2014). Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30: 719-725.
- Taylor A.W. & Spencer W. F. (1990). Volatilization and vapor transport processes. In : Pesticides in the soil environment. *Soil Science Society of America Book Series*, Madison, USA, 213-269.
- Tefera H., Kamara A.Y., Asafo-Adjei B. & Dashiell K.E. (2009). Improvement in grain and fodder yields of early- maturing promiscuous soybean varieties in the Guinea savanna of Nigeria. *Crop Science*, 49: 2037-2042.
- Tefera H., Kamara A.Y., Asafo-Adjei B. & Dashiell, K.E. (2010). Breeding progress for grain yield and associated traits in medium and late maturing promiscuous soybean in Nigeria. *Euphytica*, 175: 251-260
- Terefework Z., Nick G., Suomalainen S., Paulin L., & Lindström K. (1998). Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. *International Journal of Systematic*, 48 (2): 349-356. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-2-349>

REFERENCES

- Tian C.F., Wang E.N., Wu J.L., Han X.T., Chen F.W., Gu T.C., Gu G.J. & Chen X.W. (2008). *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58 (12): 2871-75. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.2008/000703-0>.
- Tian C.F., Young J.P.W., Wang E.N., Tamimi S.M., & Chen X.W. (2010 a). Population Mixing of *Rhizobium Leguminosarum* Bv. *viciae* Nodulating *Vicia faba*: The Role of Recombination and Lateral Gene Transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, 73 (3): 563-76. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00909.x>.
- Tian C.F., Young J.P.W., Wang E.N., Tamimi S.M., & Chen X.W. (2010b). Population Mixing of *Rhizobium Leguminosarum* Bv. *viciae* Nodulating *Vicia faba*: The Role of Recombination and Lateral Gene Transfer ». *FEMS Microbiology Ecology*, 73 (3): 563-76. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00909.x>.
- Touré Y. (2007). Evaluation de quelques caractères agromorphologiques de quatre races locales de Voandzou (*Vigna subterranea* (L.) Verdc., Fabaceae). Mémoire de maitrise, UFR-SN de l'Université d'Abobo-Adjamé, 38 p.
- Toure Y. (2016). Caractérisation agromorphologique des morphotypes de voandzou [*Vigna subterranea* (L.) Verdc. (Fabaceae)] cultivés dans deux régions aux caractéristiques climatiques et pédologiques contrastées de la Côte d'Ivoire, Thèse de Doctorat de l'Université Nangui Abrogoua, 325 p.
- Touré Y., Koné M., Silué S. & Yatty J.K. (2013). Prospection, collecte et caractérisation agromorphologique des morphotypes de voandzou [*vigna subterranea* (L.) verdc. (Fabaceae)] de la zone savanicole en Côte d'Ivoire. *European Scientific Journal*, 9 (24) : 308.
- Ucciani E., Busson F. (1963). Contribution à l'étude des corps gras de *Voandzeia subterranea* Thouars (Papilionacées). *Oléagineux*, 18: 45-48.
- Upadyay S.K., Maurya S.K., Singh D.P. (2012) Salinity tolerance in free living plant growth promoting Rhizobacteria. *Indian Journal of Sciences Research*, 3: 73-78.
- Valdez R.A., Soriano B. Prado G., Zavaleta D., Matsubara M., Zúñiga D., Dion P., Valladolid A., Ruesta A., Castellano-Hinojosa A., Correa-Galeote D. & Bedmar E.J. (2016).

REFERENCES

- Symbiotic and agronomic characterization of bradyrhizobial strains nodulating cowpea in Northern Peru. In: González-Andrés F, James E (eds) *Biological nitrogen fixation and beneficial plant-microbe interaction*, Springer, Germany, pp 195–212.
- Van Berkum P., Beyene D., Bao G.P., Campbell T.A. & Eardly B.D. (1998). *Rhizobium mongolense* sp. nov. Is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *International journal of systematic bacteriology*, 48(1) : 13-22
- Van Berkum P., Terefework Z., Paulin L., Suomalainen S., Lindström K. & Eardly B.D. (2003). Discordant Phylogenies within the *rrn* Loci of Rhizobia. *Journal of Bacteriology*, 185 (10): 2988-98. <https://doi.org/10.1128/JB.185.10.2988-2998.2003>
- Van Berkum P., Elia P & Eardly B.D. (2006). Multilocus Sequence Typing as an Approach for Population Analysis of Medicago-Nodulating Rhizobia. *Journal of Bacteriology*, 188 (15): 5570-77. <https://doi.org/10.1128/JB.00335-06>.
- Vandamme P., Goris J., Chen W.M., de Vos P. & Willems A. (2002). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov. Nodulate the Roots of Tropical Legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 25 (4): 507-12. <https://doi.org/10.1078/07232020260517634>.
- Vázquez M., Dávalos A., de las Peñas A., Sánchez F. & Quinto C. (1991). Novel Organization of the Common Nodulation Genes in *Rhizobium leguminosarum* Bv. *phaseoli* Strains. *Journal of Bacteriology*, 173 (3): 1250-58.
- Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S. & Boyce A.N. (2016). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in *Agricultural Sustainability.A Review*, *Molecules*, 21 (5): 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>.
- Velázquez E., Peix A, Zurdo-Piñero L.J., Palomo L.J., Mateos P.F., Rivas R., Muñoz-Adelantado E., Toro N., García-Benavides P. & Martínez-Molina E. (2005). The Coexistence of Symbiosis and Pathogenicity-Determining Genes in *Rhizobium rhizogenes* Strains Enables Them to Induce Nodules and Tumors or Hairy Roots in Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (12): 1325-32. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1325>.

REFERENCES

- Velázquez E., Martínez-Hidalgo P., Carro L., Alonso P., Peix A., Trujillo M. & Martínez-Molina E. (2013). Nodular endophytes: An untapped diversity. In: Beneficial Plant Microbial Interactions: *Ecology and Applications*, 214-236 p. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Verdcourt B. (1980). The correct name for the Bambara groundnut. *Kew Bull*, 35 (3): 474.
- Vernier T. (2008). Analyse fonctionnelle d'EFD, Un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de Doctorat des Biosciences Végétales, Université Toulouse III, 496p.
- Vessey J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255: 571-586.
- Villadas P.J., Lasa A.V., Martínez-Hidalgo P., Flores-Félix D.J., Martínez-Molina E., Toro N., Velázquez E. & Fernández-López M. (2017). Analysis of rhizobial endosymbionts of *Vicia*, *Lathyrus* and *Trifolium* species used to maintain mountain firewalls in Sierra Nevada National Park (South Spain). *Systematic and Applied Microbiology*, 40 (2): 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.11.008>.
- Vincent J. M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. Published for *the International Biological Programme [by] Blackwell Scientific*.
- Vinuesa P., Silva C., Werner D. & Martínez-Romero E. (2005). Population Genetics and Phylogenetic Inference in Bacterial Molecular Systematics: The Roles of Migration and Recombination in Bradyrhizobium Species Cohesion and Delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34 (1): 29-54. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.08.020>.
- Viveros O.M, Jorquera M.A, Crowley D.E, Gajardo G. & Mora M.L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Sciences and Plant Nutriment*, 10: 293-319.
- Voisard C., Keel C., Haas D. & Dèfago G. (1989). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO Journal*, 8: 351-358.

REFERENCES

- Vriezen J.A.C., de Bruijn J.F. & Nusslein K. (2007). Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3451-3459.
- Vurukonda S.S.K.P., Vardharajula S., Shrivastava M. & Ali S.k.Z. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184 : 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>.
- Vyas P, Rahi P, Chauhan A, Gulati A. (2007). Phosphate solubilization potential and stress tolerance of *Eupenicillium parvum* from tea soil. *Mycological Research*, 111 : 931–938.
- Wasike V. W., Lesueur D., Wachira F.N., Mungai N.W., Mumera L.M., Sanginga N., Harrison N. M., Mugadi D., Wango P. & Vanlauwe B. (2009). Genetic Diversity of Indigenous *Bradyrhizobium Nodulating* Promiscuous Soybean [*Glycine max* (L) Merr.] Varieties in Kenya: Impact of Phosphorus and Lime Fertilization in Two Contrasting Sites. *Plant and Soil*, 322 (1.2): 151.63.
- Wdowiak-Wróbel S. & Małek W. (2016). Properties of Astragalus sp. microsymbionts and their putative role in plant growth promotion. *Archives of Microbiology*, doi:10.1007/s00203-016-1243-3.
- Weir B.S. (2016). The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> last updated: X Jan, 2016.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. & Lane D.J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study, *Journal of Bacteriology*, 173:697-703 <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.199>.
- Weyens N., Van Der Lelie D., Taghavi S. & Vangronsveld J. (2009). Phytoremediation: plant endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2):248–254.
- Whipps J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(1): 487-511. http://dx.doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl_1.487.

REFERENCES

- Willems A. (2006). The Taxonomy of Rhizobia: An Overview. *Plant and Soil* 287 (1-2): 3-14. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9058-7>.
- Wink M. (2007). Systematics. Raptor Research and Management Technique (Bird DM & Bildstein KL, (eds). Hancock House Publishers, Surrey. <https://fr.scribd.com/document/49625198/Raptor-Research-all>.
- Woese C.R., Stackebrandt E., Weisburg W.G., Paster B.J., Madigan M.T., Fowler V.J., Hahn C. M. *et al.* (1984). The Phylogeny of Purple Bacteria: The Alpha Subdivision. *Systematic and Applied Microbiology*, 5: 315-26.
- Woese C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*, 51:221-271.
- Woese C.R. (1994). There Must Be a Prokaryote Somewhere: *Microbiology's Search for Itself*. *Microbiological Reviews*, 58 (1): 1-9.
- Yamamoto H., Nomata J. & Fuita Y. (2008). Functional expression of nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus* in *Escherichia coli*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7 :1238-1242.
- Yao Y., Wang R., Lu K.J., Sui H.X., Wang E.T. & Chen X.W. (2014). Genetic Diversity and Evolution of Bradyrhizobium Populations Nodulating *Erythrophleum fordii*, an Evergreen Tree Indigenous to the Southern Subtropical Region of China. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (19): 6184-94. <https://doi.org/10.1128/AEM.01595-14>.
- Youan Bi T.B.A. (2016). Institutions de microfinance et prêteurs informels de l'agriculture familiale en Côte d'Ivoire: de la cohabitation à la fusion. *Éthique et économique*, 13 (2) : 48-63.
- Young J.P.W., Crossman L.C., Johnston A.W.B, Thomson N.R., Ghazoui Z.F., Hull K.H., Wexler M. *et al.* (2006). The Genome of *Rhizobium leguminosarum* has Recognizable Core and Accessory Components. *Genome Biology*, 7 (4): R34. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-4-r34>.

REFERENCES

- Young M.W., Wager-Smith K., Vosshall L., Saez L.N & Myers M.P. (1996). Molecular anatomy of a light-sensitive circadian pacemaker in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 61: 279--284. 10.1101/SQB.1996.061.01.030.
- Young, J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A. & Sawada H. (2001). A Revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an Emended Description of the Genus, and the Inclusion of All Species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et Al. 1998 as New Combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51 (Pt 1): 89-103. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-89>.
- Yu Q., Chen Q., Elser J. J., He N., Wu H., Zhang G., Wu J., Bai Y. & Han X. (2010). Linking stoichiometric homeostasis with ecosystem structure, functioning and stability. *Ecology Letters*, 13 : 1390–1399.
- Zahir A.Z, Usman G., Muhammad N., Sajid M.N. & Hawz N.A. (2009). Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Archives of Microbiology*, 191:415–424. DOI 10.1007/s00203-009-0466-y.
- Zahran, H.H., Räsänen L.A., Karsisto K. & Lindström K. (1994). Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-Page of rhizobia by osmotic and heat stress. *W. Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10: 100-105.
- Zahran H. H. (1991). Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biology and Fertility Soils*, 12 : 73-80.
- Zahran H.H. (1999). *Rhizobium*-legumes symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63 : 968-989.
- Zahran H.H. (2001). *Rhizobia* from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 91: 143-153.
- Zaidi A., Khan M.S., Ahemad M. & Oves M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiologica and Immunologica Hungarica*, 56: 263-284.

REFERENCES

- Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel J.C, Gillis M., Dreyfus B. & de Lajudie P. (2004). Characterisation of Wild Legume Nodulating Bacteria (LNB) in the Infra-arid Zone of Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology*, 27 : 380–395. DOI :10.1078/0723-2020-00273.
- Zakhia F., Jeder H., Willems A., Gillis M., Dreyfus B. & de Lajudie P. (2006). Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbiology and Ecology*, 51: 375–393.
- Zerhari K., Aurag J., Khbaya B., Kharchaf D. & Filali-Maltouf A. (2000). Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 351-357.
- Zhang J.J., Liu Y.T., Chen F.W., Wang T. E., Sui H.X., Zhang X.X., Li Y., Li Y. & Chen X.W. (2012). *Mesorhizobium muleiense* Sp. Nov., Nodulating with *Cicer arietinum* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 (Pt 11): 2737-42. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038265-0>.
- Zhang S.D., Kassis J., Olde B., Mellerick D.M. & Odenwald W.F. (1996). Pollux, a novel *Drosophila* adhesion molecule, belongs to a family of proteins expressed in plants, yeast, nematodes and man. *Genes and Development*, 10 (9) : 1108-1119.
- Zhang Y.J., Zheng W.T., Everall I., Young J. P. W., Zhang X.X., Tian C. F, Sui H.X., Wang, E.T. & Chen X.W. (2015). *Rhizobium anhuiense* Sp. Nov., Isolated from Effective Nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65 (9): 2960-67. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000365>.
- Zhu J.K. (2001). Plant salt tolerance : *Trends in plant science*. University of Arizona. Pp 66-71.
- Zuckerkindl E. & Pauling L. (1965). Molecules as Documents of Evolutionary History. *Journal of Theoretical Biology*, 8 (2): 357-66.

ANNEXES

Annexe 1: Milieu YEM (Yeast Extract Mannitol, Vincent, 1970)

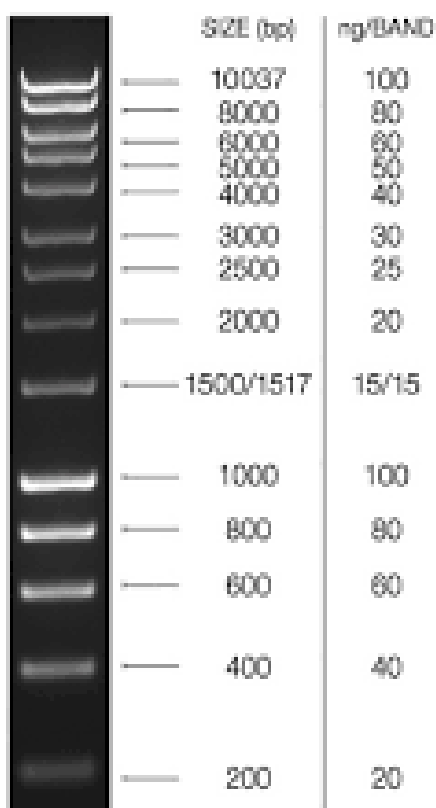
- Milieu YEM liquide :

Mannitol	10,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrait de levure	0,5 g
H ₂ O distillée	1,0 litre

Pour le YEM solide, ajouter 15 g d'Agar par litre + Rouge Congo pour une concentration finale de 0,0025 %.

Ajuster le pH à 6.8 et stériliser le milieu par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.

Annexe 2 : Marqueur de taille HyperLadder™ (I) 1kb Bionline



Annexe 3 : Préparation de la solution du BTB

Mélanger 0,5g de BTB dans 100ml d'éthanol, puis stériliser le mélange par filtration.

Conserver cette solution à 4°C.

Ajoutez 5ml de la solution dans 1 litre de YEM préalablement stérilisé.

La concentration finale du BTB dans le milieu est de 25ppm.

Annexe 4 : Composition de la solution nutritive de Broughton & Dilworth sans azote des plantes

	Composants	Molarité des Composants
Solution 1	CaCl ₂ , 2H ₂ O	2 M
Solution 2	KH ₂ PO ₄	1 M
Solution 3	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 M
	K ₂ SO ₄	0,5 M
Solution 4	MnSO ₄ , H ₂ O	0,002 M
	H ₃ BO ₃	0,004 M
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,001 M
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,004 M
	CoSO ₄ , 7H ₂ O	0,0002 M
Solution 5	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,0002 M
	Fe-citrate	0,02 M

- Prendre 5 ml des solutions 1 à 4 et 1 ml de la solution 5, les ajouter à 5 litres d'eau distillée, puis diluer à 10 litres.
- Le pH doit être ajusté entre 6,6 et 6,8 avec du NaOH 1 N.
- Pour la solution nutritive azotée, ajouter 0,5 g/l de KNO₃

Annexe 5 : Réactif de Salkowsky

- Composition :

FeCl ₃	: 20 g
Acide sulfurique	: 421,9 ml
Eau distillée	: 1000 ml

- Préparation :

Dans un erlenmeyer placé dans un bain d'eau froide :

- Verser 2 g de FeCl₃ dans 50 mL d'eau stérile, puis mélanger
- Après dissolution complète du chlorure ferrique, verser lentement 42.19 mL d'acide sulfurique concentré en agitant constamment avec une baguette de verre.
- Laisser reposer jusqu'à ce que le mélange soit froid, puis ajouter 50 mL d'eau distillée.

Annexe 6: Les valeurs de la gamme étalon D0 à 540nm en fonction de la concentration d'auxine

[Auxine] en µg/mL	Densité optique (540 nm)
0	0,148
0,1	0,153
0,2	0,162
0,5	0,168
1	0,173
2	0,179
4	0,182
5	0,202
8	0,208
10	0,213
15	0,22
20	0,225
25	0,25
30	0,28
35	0,319
50	0,413
75	0,467
100	0,562
125	0,625

Annexe 7 : Composition du Milieu PVK

Glucose	: 3 g
KCl	: 0,1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	: 0,1 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	: Traces
MnSO ₄ , 7H ₂ O	: Traces
Phosphate naturel broyé	: 0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	: 0,3 g
Extrait de Levure	: 0,1 g
pH	: 6,7
Volume final	: 1000 mL

Pour le qualitatif, la source de phosphate est le phosphate tricalcique (Ca₃ [PO₄]₂) (2,5 g) et coloré au bleu de bromophenol à 0,5 %.

Annexe 8 : Réactif Vanadate-Molybdate

Solution A:	(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	: 25 g
	Eau distillée	: 400 mL

Solution B:	NH_4VO_3	: 1.25 g
	Eau distillée	: 300 mL

- Dans un b cher, on chauffe de l'eau distillée jusqu'à ébullition, puis on rajoute du NH_4VO_3 et on laisse le b cher en ébullition.
- Après refroidissement de cette solution, on ajoute sous la hotte chimique 250 mL d'acide nitrique concentré (60%) et on complète l'ensemble des deux solutions (A+B) jusqu'à 1 litre.

Annexe 9 : Les valeurs de la gamme étalon D0 à 405 nm en fonction de la concentration du phosphate (KH_2PO_4)

[phosphate] ppm	Densité optique (405 nm)
0	0,125
1	0,127
2,5	0,138
5	0,156
7,5	0,161
10	0,172
20	0,236
30	0,288
40	0,353
50	0,408
60	0,448
70	0,529
80	0,572
90	0,643
100	0,687
140	0,962

Annexe 10 : Réactif de CAS

Chrome azurol S : 60,5 mg

Solution 1 :

Eau distillée : 50 MI

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 27mg

Solution 2 : HCl : 0,083 MI

Eau distillée : 100 MI

HDTMA : 72,9 mg

Solution 3 :

Eau distillée : 40 MI

Préparation

Dans une fiole de 100 mL:

- Mettre 40 mL de la solution 3 puis la chauffer sous agitation jusqu'à dissolution complète ;
- Ajouter goutte à goutte, 10 mL la solution 2 puis 50 mL de la solution 1 sous agitation ;

Couvrir la fiole, autoclaver le mélange et conserver à l'obscurité

Annexe 11: Liste des isolats constituant la collection des bactéries nodulaires du pois bamabra

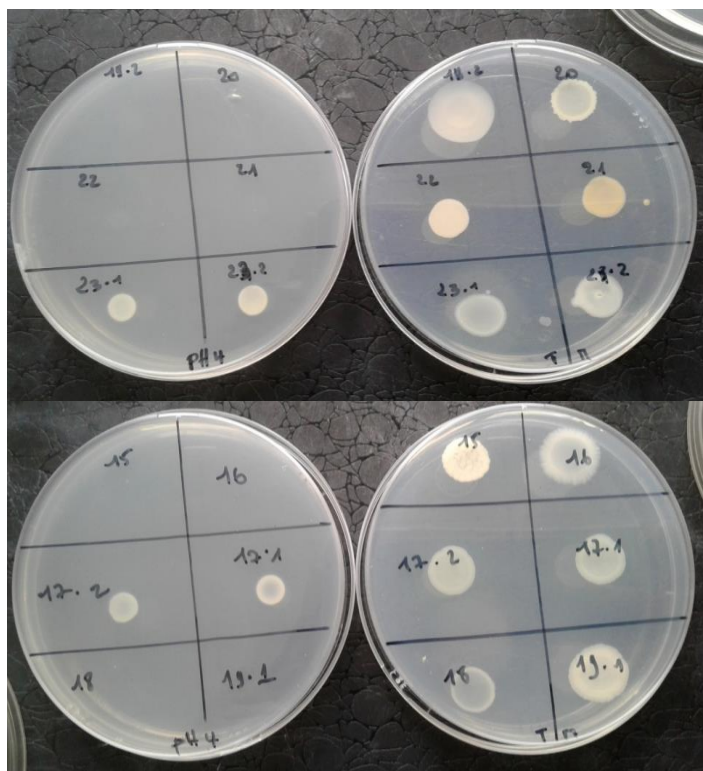
code terrain	Code définitif	variété	Sites
TCI1.2	RVC1	CI1	Toroguhé
TCI1.4	RVC2	CI1	Toroguhé
TCI1.5	RVC3	CI1	Toroguhé
TCI1.6	RVC4	CI1	Toroguhé
TCI1.8	RVC5	CI1	Toroguhé
TCI1.11	RVC6	CI1	Toroguhé
ZKCI1.1	RVC7	CI1	Zakoua
ZKCI1.6	RVC8	CI1	Zakoua
TCI2.1	RVC9	CI2	Toroguhé
ZKCI2.1	RVC10	CI2	Zakoua
ZGCI2.1	RVC11	CI2	Zepreguhé
ZGCI3.2	RVC12	CI3	Zepreguhé
ZGCI3.6	RVC13	CI3	Zepreguhé
ZGCI3.4	RVC14	CI3	Zepreguhé
ZGCI3.9	RVC15	CI3	Zepreguhé
TCI3.1	RVC16	CI3	Toroguhé
TCI 3.2	RVC17	CI3	Toroguhé
TCI3.3	RVC18	CI3	Toroguhé
TCI3.11	RVC19	CI3	Toroguhé
TCI3.10	RVC20	CI3	Toroguhé
TCI3.7	RVC21	CI3	Toroguhé
TCI 3.9	RVC22	CI3	Toroguhé
TCI3.4	RVC23	CI3	Toroguhé
ZGCI3.7	RVC24	CI3	Zepreguhé
ZGCI3.10	RVC25	CI3	Zepreguhé
UCI3.2	RVC26	CI3	Université
BCI5.6	RVC27	CI5	Bribouo
BCI5.7	RVC28	CI5	Bribouo
ZKCI5.2	RVC29	CI5	Zakoua
ZKCI5.4	RVC30	CI5	Zakoua
ZKCI5.3	RVC31	CI5	Zakoua
ZKCI5.6	RVC32	CI5	Zakoua
ZKCI5.1	RVC33	CI5	Zakoua
ZGCI5.1	RVC34	CI5	Zepreguhé
ZGCI5.3	RVC35	CI5	Zepreguhé
TCI5.2	RVC36	CI5	Toroguhé
TCI 5.4	RVC37	CI5	Toroguhé
TCI5.3	RVC38	CI5	Toroguhé
TCI5.6	RVC39	CI5	Toroguhé
TCI 5.8	RVC40	CI5	Toroguhé
TCI5.7	RVC41	CI5	Toroguhé
TCI5.9	RVC42	CI5	Toroguhé
RVC13.1	RVC43	CI5	Université
RVC 14	RVC44	CI5	Université
RVC8.3	RVC45	CI5	Université
RVC13.2	RVC46	CI5	Université
ZGCI6.3	RVC47	CI6	Zepreguhé
UCI6.3	RVC48	CI6	Université
TCI6.2	RVC49	CI6	Toroguhé
UCI6.1	RVC50	CI6	Université
ZKCI1.6	RVC51	CI1	Zakoua
TCI1.4	RVC52	CI1	Toroguhé
BCI2.3	RVC53	CI2	Bribouo

UCI2.1	RVC54	CI2	Université
TCI3.9	RVC55	CI3	Toroguhé
ZGCI3.1	RVC56	CI3	Zepreguhé
ZKCI3.2	RVC57	CI3	Zakoua
BCI5.4	RVC58	CI5	Bribouo
TCI5.4	RVC59	CI5	Toroguhé
TCI6.1	RVC60	CI6	Toroguhé
ZGCI6.2	RVC61	CI6	Zepreguhé
ZGCI3.3	RVC62	CI3	Zepreguhé

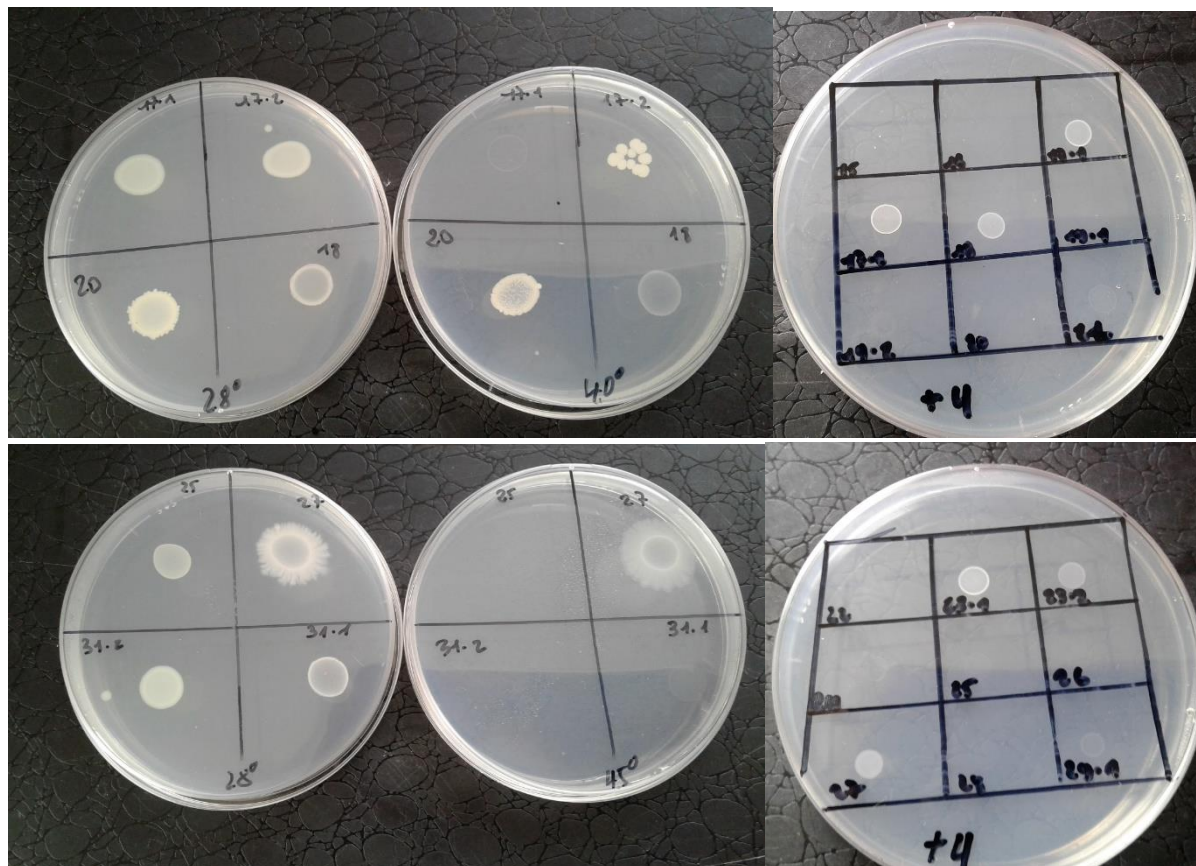
Annexe 12: Test de tolérance des souches bactériennes à différentes concentrations de NaCl sur YEM solide



Annexe 13: Test de tolérance des souches bactériennes à différents pH sur YEM solide



Annexe 14: test de tolérance des souches bactériennes à différentes température sur YEM solide



RESUME

Le pois bambara (*Vigna subterranea* L.) est une légumineuse alimentaire indigène africaine très tolérante à la sécheresse avec d'énormes potentialités dans la nutrition et la fertilisation des sols. Mais malheureusement elle est sous utilisée et a été négligée par les agriculteurs et les chercheurs. La présente étude a été entreprise pour identifier et sélectionner de potentielles bactéries autochtones efficaces adaptées aux conditions édapho-climatiques et capables d'améliorer la productivité du pois bambara. Les bactéries des sols de cinq localités de Daloa ont été piégées par cinq cultivars locaux du pois bambara et isolées des nodules sur le milieu YEM. Les isolats obtenus ont fait l'objet d'une analyse moléculaire basée sur le séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S. Les caractères physiologiques et symbiotiques des rhizobia identifiés ont été évalués. La capacité des souches à tolérer différents stress abiotiques (pH, température, salinité, engrais et pesticides), puis à solubiliser le phosphate, à produire l'AIA et les sidérophores, a été évaluée *in vitro*. Enfin, l'efficacité des meilleures souches par rapport aux engrais azotés a été vérifiée. Les résultats ont montré que sur les 123 bactéries isolées des nodules du pois bambara, 60 présentant des différences morphologiques ont présenté une grande diversité génétique. Cette diversité a été mise en évidence par la présence de rhizobia (25 %) et d'endophytes (75 %) qui ont été identifiés comme membres de 13 genres à savoir *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Rahnella*, *Paenibacillus*, *Mitsuaria*, *Lysobacter* et *Brevibacillus*) inclus dans trois (3) phyla (*Proteobacterie*, *Firmicutes* et *Actinobacérie*). Par ailleurs, les données moléculaires ont été confirmées par la caractérisation physiologique et l'authentification des rhizobia révélant une grande diversité dans leur capacité infective et fixatrice d'azote. Ainsi, les souches RVC50, RVC38, RVC25, RVC13 et RVC28 se sont avérées plus efficaces. L'ensemble des souches ont exhibé *in vitro* une grande plasticité de tolérance au pH, à la salinité, à la température, aux engrais, aux insecticides et à Haloxyfop-R-méthyl. Toutefois, elles ont été sensibles aux fongicides et au Glyphosate. Les souches ont montré dans l'ensemble de très bonnes capacités à solubiliser le phosphate, produire l'AIA et les sidérophores. Les plus efficaces ont amélioré la croissance et le rendement en gousses des plantes que les engrais. Ainsi, RVC13, RVC25, RVC38 et RVC45 RVC4, RVC29 et RVC41 ont généré de meilleurs rendements en gousses que les engrais chimiques. D'après les résultats obtenus, l'inoculation du pois bambara par les bactéries indigènes pourrait améliorer sa productivité et aider à vulgariser sa culture. Les souches RVC13, RVC29, RVC38 et RVC45 ont été identifiées comme des souches les plus prometteuses.

Mots clés : Pois bambara, Nodules, ARNr 16S, Rhizobia, Endophytes, inoculation, fertilisation

ABSTRACT

Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.) is a very drought tolerant indigenous African food legume with enormous potential for nutrition and soil fertilization. But unfortunately it is underused and has been neglected by farmers and researchers. The present study was undertaken to identify and select potential effective indigenous bacteria adapted to edapho-climatic conditions and capable of improving the productivity of bambara groundnut. Bacteria from the soils of five localities in Daloa were trapped by five local bambara groundnut cultivars and isolated from the nodules on the YEM medium. The isolates obtained were subjected to molecular analysis based on the sequencing of the genes encoding 16S rRNA. The physiological and symbiotic characters of the identified rhizobia were evaluated. The ability of the strains to tolerate various abiotic stresses (pH, temperature, salinity, fertilizers and pesticides), then to solubilize phosphate, to produce AIA and siderophores, was evaluated *in vitro*. Finally, the effectiveness of the best strains against nitrogen fertilizers has been verified. The results showed that of the 123 bacteria isolated from bambara groundnut nodules, 60 with morphological differences showed great genetic diversity. This diversity was highlighted by the presence of rizobia (25 %) and endophytes (75 %) that were identified as members of 13 genera namely *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Rahnella*, *Paenibacillus*, *Mitsuaria*, *Lysobacter* and *Brevibacillus*) included in three phyla (*Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*). Elsewhere, the molecular data were confirmed by physiological characterization and authentication of rhizobia revealing a great diversity in their infective and fixing nitrogen capacity. Thus, the strains RVC50, RVC38, RVC25, RVC13 and RVC28 have proved the most efficient. All strains exhibited *in vitro* high plasticity of tolerance to pH, salinity, temperature, fertilizers, insecticides and Haloxyfop-R-methyl, however, they were sensitive to fungicides and Glyphosate. The strains showed on the whole very good capacities to solubilize the phosphate, to produce the IAA and the siderophores. The most effective ones improved the growth and pod yield of plants than nitrogen fertilizers. Thus, RVC13, RVC25, RVC38 and RVC45 RVC4, RVC29 and RVC41 generated better pod yields than chemical fertilizers. According to the results obtained, inoculation of bambara groundnut with native bacteria could improve its productivity and help popularize its cultivation. Strains RVC13, RVC29, RVC38 and RVC45 were identified as the most promising strains.

Key words: Bambara groundnut, Nodules, 16S rRNA, Rhizobia, Endophytes, inoculation, fertilization