

N° d'ordre : 3452

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Biotechnologies Végétale et Microbienne, Biodiversité et Environnement

Structure de Recherche : Equipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue le 08/04/2021 par :

Badreddine SIJILMASSI

Evaluation de la diversité génétique, de l'efficacité symbiotique et du pouvoir de promotion de croissance des plantes (PGPR) du genre *Rhizobium nodulant* la lentille (*Lens culinaris*) sous stress abiotiques

JURY

Cherkaoui EL MODAFAR	PES, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences et Techniques - Marrakech	Président
Kawtar FIKRI BENBRAHIM	PES, Université Sidi Mohamed Benabdellah, Faculté des Sciences et Techniques – Fès	Rapporteur/Examineur
Khalid OUFDOU	PES, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia - Marrakech.	Rapporteur/Examineur
Leila MEDRAOUI	PH, Université Mohammed V de Rabat, Faculté des Sciences.	Rapporteur/Examineur
Allal DOUIRA	PES, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences – Kenitra.	Examineur
Ahmed AMRI	Dr, Expert en ressources génétiques, ICARDA - Rabat	Encadrant
Bouchra BELKADI	PES, Université Mohammed V de Rabat, Faculté des Sciences.	Directeur de Thèse
Abdelkarim FILALI-MALTOUF	PES, Membre Correspondant à l'Académie Hassan II des Sciences et Techniques – Rabat	Co-Directeur de Thèse

Année Universitaire : 2020/2021

A mes chers parents

En hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti pour moi durant les longues années d'études. Je n'aurais jamais espéré avoir de meilleurs parents. Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant et de m'avoir appris à vivre dans l'honneur et dans la dignité.

Aucune dédicace, aucun mot, ne sauraient exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Veuillez trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices.

A ma très chère femme Safae et mon fils Ibrahim

Ma chère Safae qui m'a tant soutenu pour accomplir cette thèse et qui a subi, aussi bien que moi, beaucoup de peines et de difficultés durant toutes ces années de préparation. A mon cher fils à qui je souhaite une vie pleine de bonheur.

A ma très chère soeur Hasnaa, son mari Renaud Solin et à mon neveu Nael

Ma chère sœur qui m'a offert un soutien et des encouragements constants au cours de toutes ces années et qui a toujours été fière de moi. Lorsque j'ai besoin d'un rire ou d'un simple sourire, d'un encouragement ou d'une épaule sympathique, de mettre de l'ordre dans mes pensées ou de me changer les idées. Votre amour vaut de l'or... Qu'ALLAH vous donne longue vie et nous unisse davantage.

A ma très chère sœur Zohra,

Ma chère sœur qui m'est la deuxième mère, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi. Mon ange gardien et ma fidèle accompagnante dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Je voudrais que tu trouves dans ce travail le fruit des efforts que tu as consenti à mon égard. Ce travail est aussi le tien.

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de m'avoir donné la force pour achever ce travail de thèse, ainsi que la foi en lui pour dépasser toutes les difficultés.

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé en collaboration avec le Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire de l'Université Mohammed V de Rabat, Faculté des sciences et le laboratoire de Rhizobium à la platform de l'ICARDA au Maroc.

*Ce travail a été effectué sous la Direction de **Mr. Abdelkarim FILALI-MALTOUF**, Professeur d'Enseignement Supérieur à la Faculté des sciences, Université Mohammed V, Rabat et Membre Correspondant à l'Académie Hassan II des Sciences et Techniques de Rabat ; et sous l'encadrement de **Mr. Ahmed AMRI**, Docteur, Expert en Ressources Génétiques au centre International de Recherche Agronomique dans les zones arides (ICARDA) – Rabat. Après le départ de **Mr. Abdelkarim FILALI-MALTOUF** à la retraite, **Mme Bouchra BELKADI**, Professeur d'Enseignement Supérieur à la Faculté des sciences, Université Mohammed V, Rabat, a accepté de continuer ce travail en tant que Directeur de thèse.*

*Un remerciement spécial à **Mr. Abdelkarim FILALI-MALTOUF**, Professeur d'Enseignement Supérieur à la l'Université Mohammed V de Rabat, Faculté des sciences et Membre Correspondant à l'Académie Hassan II des Sciences et Techniques de Rabat pour son encadrement et interventions scientifiques décisives ainsi que pour la confiance attribuée et les encouragements durant toutes les étapes de la réalisation de ce travail.*

*Sincère remerciement à **Mr. Ahmed AMRI**, Docteur, Expert en ressources génétiques au centre International de Recherche Agronomique dans les zones arides (ICARDA) – Rabat, pour son encadrement, ses interventions scientifiques ponctuelles et pour les encouragements durant toutes les étapes de la réalisation de ce travail.*

*Un énorme merci à **Mme Bouchra BELKADI**, Professeur d'Enseignement Supérieur à l'Université Mohammed V de Rabat, la Faculté des sciences, d'avoir accepté d'être la Directrice de cette Thèse.*

*Je tiens à remercier également **Mr. Cherkaoui EL MODAFAR**, Professeur d'Enseignement Supérieur à l'Université Cadi Ayyad de Marrakech, d'avoir accepté d'être le président de cette thèse.*

Mes remerciements les plus distingués Mme Kawtar FIKRI BENBRAHIM, Professeur d'Enseignement Supérieur à l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès, d'avoir accepté, d'être rapporteur et examinateur de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères à Mr. Khalid OUFDOU, Professeur d'Enseignement Supérieur à l'Université Cadi Ayyad de Marrakech, d'avoir accepté de participer à ce travail en tant que rapporteur et examinateur.

Mes remerciements les plus chaleureux à Mme Leila MEDRAOUI, Professeur Habilité à l'Université Mohamed V de Rabat, d'avoir aussi accepté d'être rapporteur et examinateur de ce travail.

Mes remerciements les plus profonds vont à Mr. Allal DOUIRA, Professeur d'Enseignement Supérieur à l'Université Ibn de Kenitra, Faculté des Sciences, d'avoir accepté, malgré ces préoccupations, ces tâches d'enseignement, de lire et d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres de l'équipe GRS « Genetic Resources Section » plus particulièrement Hafid Aberkane, Adil moulakate, et Athanasios Tsivelikas. Je, remercie très sincèrement Adil El-Baouchi et Kamal Hejjaoui, pour leur aide dans la collecte et l'analyse des échantillons, pour leur savoir qu'ils m'ont transmis patiemment, mais surtout pour leur gentillesse et amitié. Travailler à vos côtés a été une chance dont je mesure l'importance.

Pendant ma thèse, j'ai été entourée et j'ai eu la chance de rencontrer des personnes extraordinaires grâce auxquelles j'ai énormément appris, tant au niveau scientifique qu'humain.

Quelques pages ne suffiraient pas à leur exprimer mon immense gratitude. Merci à Docteur Claudio Zucca de m'avoir fourni des données sur l'analyse des sols, pour sa gentillesse et son aide.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe « ICARDA-rabat-Platform » pour leur soutien technique et logistique. Ces années resteront pour moi associées à une excellente ambiance de travail, et ce notamment grâce aux personnes de la plateforme du Centre que j'ai côtoyé au quotidien : Mademoiselle Samira El-Hanafî, Mademoiselle Meryam El Alaoui et Madame Oumkeltoume Essahli, Merci de m'avoir fait partager votre expertise, mais également pour tous les bons conseils.

*Je tiens à exprimer mes remerciements à **Mademoiselle Sara Fahde, Mademoiselle Kenza Boubekri et Monsieur Aymane Kricha, Monsieur Hassan Boulahyaoui et Monsieur Youness En-nahli** toute ma reconnaissance pour le soutien qu'ils m'ont apporté, les multiples discussions et échanges qu'ils m'ont accordés et leur énorme contribution dans la réalisation de ce travail.*

Résumé

La lentille (*Lens culinaris*) est une légumineuse importante pour le Maroc. Sa culture, surtout dans les conditions de sécheresse et d'aridité, peut-être améliorée par inoculation par des rhizobia, douées d'activités PGPR exprimées et fonctionnelles même sous stress abiotiques. Ainsi, seize souches de *Rhizobium* ont été sélectionnées, à partir de 68 isolats provenant de 10 accessions de lentille cultivées à la station expérimentale de Marchouch au Maroc, et caractérisées par des outils moléculaires puis évaluées en termes d'efficacité symbiotique avec trois variétés différentes marocaines de lentille (Bakria, Chakkouf et Zaria). Il a été évalué leur utilisation en tant que Bactéries Promotrices de la Croissance de Plantes (PGPB), notamment pour la solubilisation du phosphate et la production des phytohormones sous stress abiotiques. L'analyse phylogénétique et MLSA des gènes 16S rDNA, *rpoB*, *recA*, *gyrB* et des gènes symbiotiques *nodD* et *nodA* a permis de regrouper toutes les souches avec *R. laguerreae* et *R. leguminosarum* (similarité de séquences de 94% à 100%). Une souche constituerait une nouvelle espèce. La variété Bakria a montré la meilleure association avec les souches ($P \leq 0.05$). Ce qui expliquerait l'appréciation de Bakria par la plupart des agriculteurs marocains. Plusieurs souches de *Rhizobium* ont montré une activité significative de solubilisation de phosphate et de production de phytohormones ($P \leq 0,05$). Concernant les stress abiotiques, la souche 686N5 a montré une tolérance élevée au stress salin (5% de NaCl) et une tolérance modérée au stress hydrique ($\psi = -0.75$ MPa). Ainsi, le criblage des rhizobia pour réussir l'inoculation doit être basé sur les activités PGP sous stress abiotiques.

Mots-clés : *Rhizobium*, Efficacité symbiotique, Stress abiotiques, PGPR, 16S rADN, Diversité génétique, phylogénie

Abstract

The lentil (*Lens culinaris*) is an important crop for Morocco. Its crop, especially in drought and arid conditions, can be improved by inoculation with rhizobia, endowed with expressed and functional PGPR activities even under abiotic stresses. Thus, sixteen *Rhizobium* strains were selected from 68 isolates from 10 lentil accessions cultivated at the Marchouch experimental station in Morocco and characterized by molecular tools and evaluated in terms of symbiotic efficiency with three different Moroccan varieties of lentil. (Bakria, Chakkouf and Zaria) and their use as Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), specifically for the solubilization of phosphate and the production of phytohormones under abiotic stress. Phylogenetic and MLSA analysis of the 16S rDNA, *rpoB*, *recA*, *gyrB* and symbiotic genes *nodD* and *nodA* allowed all strains to be grouped together with *R. laguerreae* and *R. leguminosarum* (sequence similarity 94% to 100%). A strain would constitute a new species. The Bakria variety showed the best association with the strains ($P \leq 0.05$). Which would explain the appreciation of Bakria by most Moroccan farmers. Several strains of *Rhizobium* showed significant activity in phosphate solubilization and phytohormone production ($P \leq 0.05$). Regarding abiotic stresses, strain 686N5 showed high tolerance to salt stress (5% NaCl) and moderate tolerance to water stress ($\psi = -0.75$ MPa). Thus, screening for rhizobia for successful inoculation should be based on PGP activities under abiotic stresses.

Key Words: Rhizobium, Symbiotic efficiency, Abiotic stress, PGPR, 16S rDNA, Genetic diversity, Phylogeny.

Publications

- **Badreddine Sijilmassi**, Abdelkarim Filali-Maltouf, Hassan Boulahyaoui, Aymane Kricha, Kenza Boubekri, Sripada Udupa, Shiv Kumar, Ahmed Amri (2020) " *Assessment of Genetic Diversity and Symbiotic Efficiency of Selected Rhizobia Strains Nodulating Lentil (Lens culinaris Medik.)* ". Plants 2021, 10, 15.<https://dx.doi.org/10.3390/plants10010015>.
- **Badreddine Sijilmassi**, Abdelkarim Filali-Maltouf, Sara Fahde, Youness Ennahli, Said Boughribil, Shiv Kumar, Ahmed Amri " *In-Vitro Plant Growth Promotion of Rhizobium Strains Isolated from Lentil Root Nodules under Abiotic Stresses* " Agronomy 2020, 10(7), 1006; <https://doi.org/10.3390/agronomy10071006>.

Communications orales

- **Badreddine Sijilmassi**, Abdel-Karim Filali-Maltouf, Sara Fahde, Said Boughribil, Ahmed Amri. "Investigating the Plant Growth Promoters activity of Rhizobium under drought and saline stresses". 1st International E-Conference on Current Issues in Microbiology (31th January 2021) Department of Microbiology, Primeasia University, Bangladesh.
- **Badreddine Sijilmassi**, Abdelkarim Filali-Maltouf, Sara Fahde, Said Boughribil, Ahmed Amri. "Exploring the Plant Growth Promotion potential of Rhizobium under abiotic stress". Biotech 2020 international congress (February 27-29, 2020) at the Faculty of Science and Technology at Sidi Mohammed Ben Abdellah University in Fez, Morocco.

Sequences enregistrées à la Banque Gènes NCBI

- **Badreddine Sijilmassi**, Hassan Boulahyaoui, Karim Filali-Maltouf and Ahmed Amri. (2019) *Rhizobium* and *Mesorhizobium* genera. Direct Submission, 16S rRNA gene GenBank Accession no. (MK483119-MK483134); *dnaJ* gene GenBank Accession no. (MK531167-MK531168); *atpD* gene GenBank Accession no. (MK531169-MK531174); *rpoB* gene GenBank Accession no. (MK531175-MK531187); *nodD* gene GenBank Accession no. (MK514429-MK514441); *recA* gene GenBank Accession no. (MK531188-MK531201); *nodA* gene GenBank Accession no. (MK546417-MK546430); *glnA* gene GenBank Accession no. (MK564220-MK564231); *gyrB* gene GenBank Accession no. (MK564232-MK564242).

Listes des tableaux

Tableau 1. Classification taxonomique de la lentille.

Tableau 2. Production globale des principales légumineuses alimentaires de 2012 à 2014.

Tableau 3. La moyenne d'exportation annuelle (T) de lentille de 2009-2013.

Tableau 4. Amorces pour l'amplification des gènes de maintien.

Tableau 5. Amorces pour l'amplification des gènes symbiotiques.

Tableau 6. Mélange réactionnel des réactions PCR.

Tableau 7. Programme utilisé pour l'amplification du gène ADNr16S.

Tableau 8. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *glnA*.

Tableau 9. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *recA*.

Tableau 10. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *dnaK*.

Tableau 11. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *rpoB*.

Tableau 12. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *dnaJ*.

Tableau 13. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *atpD*.

Tableau 14. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *nodD*.

Tableau 15. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *nodA*.

Tableau 16. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *nodC*.

Tableau 17. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *nif-H*.

Tableau 18. Composition de la solution nutritive dépourvue d'azote.

Tableau 19. Gamme d'étalonnage pour la détection de l'acide gibbérellique par spectrophotométrie.

Tableau 20. Liste des isolats et de leurs hôtes.

Tableau 21. Caractérisation biochimique de la souche *Rhizobium* sp. CIAT 899 et des 69 isolats.

Tableau 22. Concentrations en ADN génomique des isolats.

Tableau 23. Efficience symbiotique des isolats sur les trois variétés de lentilles marocaines (Bakria, Chakkouf et Zaria).

Table 24. Tests quantitatifs du stress hydrique, du stress salin et de l'activité de la Promotion de Croissance des Plantes.

Tableau 25. Performance des souches de *Rhizobium* en termes d'efficience symbiotique et de promotion de croissance des plantes sous stress abiotiques.

Listes des figures

Fig 1. Anatomie de la lentille.

Fig 2. Champs de la culture de la lentille.

Fig 3. Evolution annuelle de la production (T) et de la superficie cultivée (ha) de la lentille au Maroc.

Fig 4. Evolution annuelle de la production (T) et de la superficie cultivée (ha) de la lentille au niveau Mondial.

Fig 5. Evolution annuelle de la moyenne du rendement (hg/ha) de lentille au niveau mondial et au Maroc.

Fig 6. Population Marocaine annuelle 1970-2016.

Fig 7. Importation et exportation annuelle de la lentille au Maroc.

Fig 8. Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S d'alpha, Beta et gamma-protéobactéries.

Fig 9. Classification des Rhizobia selon leur appartenance au phylum Proteobacteria.

Fig 10. Aspect des Rhizobium sur le Milieu YEM.

Fig 11. Les mécanismes d'action des Rhizobactéries.

Fig 12. Rôles de l'AIA dans l'amélioration de la croissance des plantes.

Fig 13. Arbre phylogénétique sur labase des résultats de la caractérisation biochimique des isolats et de la souche *Rhizobium sp.* CIAT 899.

Fig 14. ADN extrait

Fig 15. Amplification du gène ADNr16S.

Fig 16. Amplification du gène *glnA*.

Fig 17. Amplification du gène *glnA*, après extraction des bandes d'ADN.

Fig 18. Amplification du gène *recA*.

Fig 19. Amplification du gène *recA*, après extraction des bandes d'ADN.

Fig 20. Amplification du gène *dnaK*.

Fig 21. Amplification du gène *dnaK* après extraction des bandes d'ADN.

Fig 22. Amplification du gène *rpoB*.

Fig 23. Amplification du gène *rpoB* après extraction des bandes d'ADN.

Fig 24. Amplification du gène *dnaJ*.

Fig 25. Amplification du gène *dnaJ* après extraction des bandes d'ADN.

Fig 26. Amplification du gène *atpD*.

Fig 27. Amplification du gène *atpD* après extraction des bandes.

Fig 28. Amplification du gène symbiotique *nodD*.

Fig 29. Amplification du gène symbiotique *nodA*.

Fig 30. Amplification du gène symbiotique *nodA*.

Fig 31. Amplification du gène symbiotique *nif-H*.

Fig 32. Amplification du gène symbiotique *nif-H* après extraction des bandes.

Fig 33. Arbre phylogénétique basé sur l`analyse des séquences du gène 16S rDNA.

Fig 34. Arbre phylogénétique basé sur l`analyse des séquences du gène *glnA*.

Fig 35. Arbre phylogénétique basé sur l`analyse des séquences du gène *recA*.

Fig 36. Arbre phylogénétique basé sur l`analyse des séquences du gène *gyrB*.

Fig 37. Arbre phylogénétique basé sur l`analyse des séquences du gène *rpoB*.

Fig 38. Arbre phylogénétique basé sur l`analyse individuelle des séquences du gène *nodD*.

Fig 39. Arbre phylogénétique basé sur l`analyse des séquences du gène *nodA*.

Fig 40. Arbre phylogénétique basé sur les séquences concaténées des gènes *16S-rpoB-recA-gyrB*.

Fig 41. Nombre de nodules par variété (Bakria, Chakkouf et Zaria).

Fig 42. Poids sec des trois variétés en (gramme) (Bakria, Chakkouf et Zaria).

Fig 43. Taille de la tige en (Cm) des trois variétés (Bakria, Chakkouf et Zaria).

Fig 44. Poids sec des trois variétés (Bakria, Chakkouf et Zaria).

Fig 45. Croissance bactérienne sous des conditions de stress hydrique :

Fig 46. Croissance bactérienne sous des conditions de stress salin :

Fig 47. Activité de solubilisation du phosphate inorganique par les souches de *Rhizobium* et *Rhizobium sp.* CIAT988.

Fig 48. Déviation du pH liée à l'activité de la solubilisation du Phosphate des souches de *Rhizobium* et *Rhizobium* sp. CIAT988.

Fig 49. Activité de solubilisation de phosphate ($\mu\text{g/ml}$) sous stress hydrique des souches de *Rhizobium* solubilisatrices de phosphate.

Fig 50. Déviation du pH liée à l'activité de solubilisation de phosphate sous stress abiotique des *Rhizobium* solubilisatrices de phosphate.

Fig 51. Activité de solubilisation de Phosphate ($\mu\text{g/ml}$) sous stress salin des souches de *Rhizobium* solubilisatrices de Phosphate.

Fig 52. Déviation du pH liée à l'activité de solubilisation de Phosphate sous stress salin des souches de *Rhizobium* solubilisatrices de phosphate.

Fig 53. Production de l'AIA (Indole Acetic Acid) par les souches de *Rhizobium*, *Rhizobium* sp. CIAT988 et *Azospirillum brasilense* DSM-1690.

Fig 54. Production de l'AIA (Indole Acetic Acid) ($\mu\text{g/ml}$) des souches de *Rhizobium* productrices de l'AIA sous des conditions de stress hydrique.

Fig 55. Production de l'AIA (Indole Acetic Acid) ($\mu\text{g/ml}$) des souches productrices d'AIA sous des conditions de stress salin.

Fig 56. Production de GA3 (Gibberellic Acid) par les souches de *Rhizobium*, *Rhizobium* sp. CIAT988 et *Azospirillum brasilense* DSM-1690.

Fig 57. Production de Siderophore par les souches de *Rhizobium*, *Rhizobium* sp. CIAT988 et *Azospirillum brasilense* DSM-1690.

Listes des abréviations

ADN : Acide deoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARNr : ARN ribosomal
Atm : Atmosphère
ABA : Acide abscissique
ADP : Adénosine Di-phosphate
AIA/ IAA : Acide indole-3-acétique/Indol Aceti Acid
ATP : Adénosine Tri-phosphate
BNF : Biological Nitrogen Fixation
BTB : Bleu de bromothymol
Ca²⁺ : Calcium
CAS : Chrome Azurol Sulfate
Cm : Centimètre
°C : Degré Celsius
DO : Densité optique
EPS : Exopolysaccharides
ED : Eau distillée
Fe²⁺ : Ion ferreux
Fe³⁺ : Ion ferrique
G.O G.A.T : Glutamine oxoglutarate aminotransferase
g/l : Gramme par litre
GA³ : Acide gibbérellique
GS : Glutamine synthétase
H⁺ : Ion hydrogène
H₂PO₄ : Ion monobasique
HNO₃ : Acide nitrique
HPO₄²⁻ : Ion dibasique
H₂SO₄ : Acide sulfurique
HCl : Acide chlorhydrique

HgCl₂ : Chlorure mercurique
H : Heure
IS : Indice de solubilisation
ISR : Résistance Systémique Induite
Ψ : Potentiel hydrique
K⁺ : Potassium
KH₂PO₄ : Phosphate de monopotassium
K₂O : Oxyde de potassium
KCl : Chlorure de potassium
KNO₃ : Nitrate de potassium
LCO : oligosaccharide de Lipo-chitine
LPS : Lipopolysaccharide
LB : Luria-Bertani
M : Molaire
MgCl₂ : Chlorure de Magnésium
mm – cm -- m : Millimètre – centimètre– mètre
ml : Millilitre
mM : Millimolaire
MPa : Méga Pascal
MPB : Membrane pér bactéroïde
MSP : Microorganismes solubilisant le phosphate
M : Mole
mM : Milimole
mm : Millimètre
NBRIP : National Botanical Research Institute's phosphate growth medium
NH₄⁺ : Ammonium
N₂ : Nitrogène
NaCl : Chlorure de sodium
NaOH : Hydroxyde de sodium
NH₃ : Nitrate
nod : Gènes de nodulation

pb : Paire de base
PCR : Réaction en chaîne par polymérase
O₂ : Oxygène
P : Phosphore
PEG : Polyéthylène glycol
PGPR : Plant growth promoting rhizobacteria
pH : Potentiel d'hydrogène
Pi : Phosphate inorganique
PVK : Pikovskaya
rpm : Rotation par minute
SBP : Bactérie solubilisatrice du phosphate
TCP : Tricalcium phosphate
TY : Tryptone yeast
µg/ml : Microgramme par millilitre
V/V : Volume par volume
µL : Microlitre
YAM : Yeast extract Mannitol

Listes des annexes

Annexe 1. Analyse de la congruence topologique entre les arbres phylogénétiques des séquences des gènes 16S rRNA, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *nodD* et *nodA*.

Annexe 2. Diversité génétique et variabilité entre les locus alignés 16SrRNA, *rpoB*, *recA*, *gyrB*, *nodA*, *nodD*.

Annexe 3. Pourcentage (%) de similarité des séquences des gènes concaténés 16SrRNA-rpoB-recA-gyrB entre les espèces de *Rhizobium*.

Annexe 4. Similitudes intergéniques / intragéniques (%) des isolats d'espèces de *Rhizobium* sur la base des gènes 16S rRNA, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *nodD* et *nodA*.

Sommaire

<i>Dédicaces</i>	i
<i>Remerciements</i>	i
Résumé	iv
Abstract	v
Publications	i
Communications orales	i
Sequences enregistrées à la Banque Gènes NCBI	i
Listes des tableaux	i
Listes des figures	iii
Listes des abréviations	vi
Listes des annexes	i
I. Introduction	2
II. Synthèse bibliographique	6
1. Lentille	6
1.1 Culture, domestication et intérêt agroalimentaire.....	6
1.2 La fixation biologique de l'azote chez la lentille	12
2. Rhizobia : classification taxonomique	13
2.1 Taxonomie bactérienne	13
2.2 Taxonomie des rhizobia	14
2.3 Le genre <i>Rhizobium</i>	15
3. Rhizobia comme Promoteurs de Croissance des Plantes (PGPR)	17
3.1 Généralités sur les PGPRs.....	17
3.2 Modes d'action des PGPRs	18
3.3 Solubilisation des Phosphates	19
3.4 Production des phytohormones	21
3.5 Production des sidérophores.....	24
3.6 Utilisation des <i>Rhizobium</i> comme PGPR	24
3.7 Effet des stress abiotiques sur les souches <i>Rhizobium</i>	25
4. Inoculation des rhizobia pour améliorer la croissance des légumineuses	28
4.1 Rôle des rhizobia dans l'adaptation des légumineuses aux stress abiotiques.....	29
4.2 Atténuation du stress hydrique par l'inoculation des rhizobia	29
4.3 Atténuation du stress salin par l'inoculation de rhizobia	30
4.4 Effets synergiques de la co-inoculation des rhizobia	30

5. La phylogénie moléculaire	32
5.1 La phylogénie des Rhizobia.....	33
5.2 Gènes utilisés pour la phylogénie moléculaire.....	34
5.1.1 Gène 16S rRNA	34
5.1.2 Gènes de nodulation (gènes nod)	34
5.1.3 Gènes de fixation d'azote (gènes nif)	35
5.1.4 Gènes de ménages	35
5.3 Méthode d'analyse phylogénétique.....	37
6. Objectifs principaux	44
III. Matériel et méthodes	46
1. Constitution de la collection des rhizobia	46
2. Caractérisation biochimique des isolats	47
4. Caractérisation moléculaire des isolats	51
4.1 Extraction de l'ADN bactérien	51
4.2 Amplification par PCR des gènes symbiotiques et de ménages	52
5. Séquençages des produits PCR	59
6. Analyse phylogénétique des séquences	60
7. Test d'authentification	61
8. Détermination de l'efficacité symbiotique des isolats	62
9. Viabilité des souches <i>Rhizobium</i> aux stress abiotiques	64
9.1 Viabilité des souches <i>Rhizobium</i> au stress Hydrique	65
9.2 Viabilité des souches <i>Rhizobium</i> au stress salin	66
10. Activité (PGP) des souches <i>Rhizobium</i>	66
10.1 Solubilisation du Phosphate inorganique	66
10.2 Solubilisation du Phosphate inorganique sous stress hydrique	67
10.3 Solubilisation du Phosphate inorganique sous stress salin	68
10.4 Production de l'AIA (Acide Indole Acétique)	68
10.5 Production de l'AIA sous stress hydrique	69
10.6 Production de l'AIA sous stress salin.....	69
10.7 Production des Gibbérellines.....	69
10.8 Production des Siderophores	70
11. Analyse statistique	71
IV. Résultats	72
1. Caractérisation biochimique des isolats	72
2. Analyse binaire des profils biochimiques des isolats	75
3. Caractérisation moléculaire des isolats	76

4.	Amplification par PCR des gènes symbiotiques et de ménages.....	77
5.	Analyse phylogénétique des séquences.....	86
6.	Caractérisation symbiotique des isolats.....	94
7.	Croissance des souches de <i>Rhizobium</i> sous stresses abiotiques.....	98
7.1	Croissance sous stress hydrique	98
7.2	Croissance sous stress salin	99
8.	Evaluation de l'activité (PGP) des souches <i>Rhizobium</i>.....	101
8.1	Solubilisation de phosphate.....	103
8.2	Solubilisation de Phosphate sous stress hydrique.....	104
8.3	Solubilisation de phosphate sous stress salin	106
8.4	Production de l'Indole Acetic Acid (AIA) sous stress hydrique	109
8.5	Production de l'AIA sous stress salin.....	109
8.6	Production des Gibbérellines.....	110
8.7	Production des sidérophores.....	111
8.8	Résultats généraux.....	112
V.	Discussion.....	114
VI.	Conclusion.....	123
VII.	Reference.....	125
VIII.	Annexes.....	148

I. Introduction

La lentille (*Lens culinaris* Medik) est une légumineuse alimentaire appartenant à la famille des fabacées. La culture de lentille est largement répandue dans le monde, de l'est de l'Asie à l'Afrique du Nord, en Amérique latine et en Amérique du Nord, où elle est excessivement produite (FAO, 2017). Cela est dû au fait que la culture est très appréciée par beaucoup de gens et peut même être utilisée pour l'alimentation des animaux (Erskine et al., 2009). La demande croissante pour sa consommation place la culture au quatrième rang mondial après la féverole, la fève, les pois chiches et les pois (FAO, 2017). Au Maroc, la demande locale en lentille a régulièrement augmenté en raison de la croissance démographique. En revanche, la production marocaine de lentille a diminué depuis 1980 en raison de la diminution de la superficie récoltée et de la faible productivité moyenne ne dépassant pas 641 kg/ha au lieu de 1077 kg / ha dans le monde. L'une des principales raisons empêchant la culture à grande échelle de lentille est la faible fertilité des sols en azote (Allahyari, M.S., 2009).

L'azote (N) est considéré comme l'un des éléments nutritifs les plus importants pour la croissance des plantes (Leghari et al., 2016). En conséquence, la faible fertilité du sol en azote a un impact considérable sur le rendement des cultures (Tian et al., 1998). La seule alternative couramment utilisée est l'application d'engrais chimiques pour améliorer la productivité des cultures. Par conséquent, le coût élevé des engrais les a rendus inabordable pour environ 60% des agriculteurs des pays africains (Banque mondiale, 2008). De plus, l'application excessive d'engrais chimiques a montré son échec en ce qui concerne les perturbations environnementales (Zhu et al., 2000).

La fixation biologique de l'azote est un phénomène qui transforme l'azote de l'atmosphère en ammoniac par le biais d'une réaction enzymatique des bactéries du sol (Bernhard, 2010). Plus de 60% de l'azote du sol provient de la fixation biologique de l'azote (Postgate, J. 1998). La principale activité biologique de fixation de l'azote en termes de quantité d'azote fixée est effectuée par les associations entre les espèces de rhizobies et les légumineuses (Saikia et al., 2007). Des recherches antérieures avaient estimé que plus de 70 millions de tonnes d'azote étaient produites par la fixation symbiotique de l'azote (Brockwell et al., 1995). Ainsi, la fixation symbiotique de l'azote reste la solution ultime pour surmonter la faible fertilité du sol en azote et pour réduire la demande croissante d'engrais chimiques à base d'azote (Peoples et al., 1995 ; Zahran, 1999 ; Lu et al., 2011). La fixation de l'azote symbiotique contribue au développement agricole durable en favorisant les

cultures succédantes dans les rotations. Comme les autres légumineuses, les lentilles forment une association symbiotique avec des Rhizobia spécifiques, fournissant à la plante ces besoins en azote.

Le succès de cette association repose sur les deux partenaires. L'efficacité de la fixation symbiotique de l'azote diffère selon l'hôte végétal nodulé et le Rhizobia déclenchant la nodulation régulée par une communication biochimique spécifique entre eux (Long, 1996). Il existe une très grande diversité de Rhizobia couvrant plus de 98 espèces appartenant à 14 genres dans les groupes α -protéobactéries et β -protéobactéries (Berrada et al., 2014 ; Yan et al., 2014). Selon de nombreuses études antérieures, *Rhizobium leguminosarum* est le principal partenaire symbiotique du groupe des vicacées, y compris la lentille (May et al., 1983; Begum et al., 2001; Santillana et al., 2008). Des études récentes ont indiqué que les espèces de *Rhizobium* nodulant la lentille peuvent changer en fonction du lieu où la culture a été planté (Rashid et al., 2012 ; Rashid et al., 2014 ; Tena et al., 2017). Cela a révélé une grande diversité de symbiotes de lentilles et a expliqué la faible efficacité de souches de *Rhizobium* utilisées au hasard comme engrais à base d'inoculum sur les cultures (Lupwayi et al., 2000). Cependant, peu de recherches ont été menées sur la diversité génétique des Rhizobia nodulant différentes variétés de lentilles (Zou et al., 2016).

Le gène de 16S rDNA est l'un des puissants marqueurs utilisés pour la caractérisation génotypique de la population bactérienne grâce à son universalité dans le génome bactérien et à la taille de sa séquence (1500 pb) constituée de régions conservées, variables et hypervariables (Clarridge III, 2004, Das et al., 2014). Cependant, ce marqueur a montré ses limites pour séparer les espèces rhizobiennes proches du genre *Rhizobium* (Saïdi, 2014 ; Rashid et al., 2015). De ce fait, une nouvelle approche d'identification génétique a été suggérée pour l'analyse de séquences multiple (MLSA) de gènes de ménages tels que *recA*, *gyrB* et *rpoB* (Rong et al., 2014). MLSA peut détecter la diversité génétique au sein des espèces et entre les espèces, car la différence est attribuée au niveau des nucléotides (Rong et al., 2014).

Par ailleurs, dans les régions arides et semi-arides, les cultures subissent de nombreux stress abiotiques. La sécheresse et la salinité sont les principaux stress abiotiques qui ont un impact négatif sur la croissance des plantes. Dans les systèmes agricoles irrigués et non irrigués, les deux stress réduisent directement les rendements des plantes en perturbant l'homéostasie biochimique, physiologique et génétique des cellules végétales (Kavamura et al., 2013). Par exemple, le stress

hydrique et le stress salin réduisent la pression de turgescence et affectent la taille des cellules. Ils provoquent une diminution de la photosynthèse, une fermeture stomatique et une diminution du transport des électrons. Au niveau moléculaire, ces stress augmentent l'activité de la protéase, la libération d'acides aminés, l'activité de la RNAase et l'hydrolyse de l'ARN. En outre, les stress dus au stress hydrique et stress salin influencent la disponibilité et le transport des éléments nutritifs du sol, la toxicité des ions, le stress osmotique, la carence en éléments nutritifs (N, Ca, K, P, Fe, Zn) et le stress oxydant sur les plantes (Egamberdieva et al., 2013; Vurukonda et al., 2016). De plus, les deux stress ont un impact négatif sur la synthèse des régulateurs de croissance des plantes tels que l'auxine, la gibbérelline et la cytokinine et déclenchent la production d'hormones du stress telles que l'acide abscissique (ABA) et l'éthylène, qui inhibent la croissance des plantes par plusieurs mécanismes (Yang et al., 2009).

Les hormones de stress sont l'une des stratégies mises en œuvre par les plantes pour éviter les stress abiotiques à court terme (Meena et al., 2017; Ullah et al., 2017). L'accumulation d'osmolytes, tels que la proline, les sucres, les polyamines et les bêtaines, est une autre stratégie utilisée par les plantes pour surmonter le stress abiotique (Vurukonda et al., 2016). Les plantes accumulent une diversité de métabolites secondaires tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes (Michalak, 2006). Pour tenir compte de l'équilibre ionique dans les vacuoles, le cytoplasme accumule des composés de masse moléculaire faible. Les osmolytes n'interfèrent pas avec les réactions biochimiques normales, mais remplacent l'eau dans les réactions biochimiques. La protection des structures et l'équilibre osmotique à l'origine d'un afflux continu d'eau sont les principales fonctions des osmolytes. Certains osmolytes sont des ions élémentaires essentiels, tels que le K^+ , mais la majorité sont des solutés organiques (Jouyban, 2012). Cependant, dans une longue période de stress, les hormones de stress et les osmolytes ne suffisent pas pour relancer le développement des plantes dans ces conditions de stress.

Les microbes associés aux plantes jouent un rôle vital dans la croissance des plantes sous stress abiotique en modifiant le système racinaire, en améliorant la mobilisation et l'absorption de plusieurs éléments essentiels et en modulant les paramètres physiologiques (Egamberdieva et al., 2018). Les bactéries peuvent stimuler la croissance des racines, protéger les plantes contre divers agents pathogènes transmis par le sol, stimuler la tolérance au stress et induire une résistance systémique, notamment la compétition pour les nutriments, la solubilisation des minéraux et la

production d'hormones de croissance telles que l'auxine, la gibbérelline, et la cytokinine (Egamberdieva et al., 2018).

Parmi la microflore de la zone racinaire, les Rhizobia ont été utilisés comme rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) pour leur capacité à coloniser la rhizosphère de nombreuses espèces végétales et à conférer des effets bénéfiques tels que l'amélioration de la croissance des plantes et la sensibilité réduite aux maladies (Kloepper et al., 2004). Les rhizobactéries induisent plusieurs mécanismes de tolérance au stress chez les plantes, notamment la production de phytohormones, la réduction du niveau d'éthylène dans les racines par l'action de l'ACC désaminase et la libération de composés qui favorisent la tolérance systémique induite (IST) (Vurukunda et al., 2016).

Néanmoins, la population bactérienne utilisée comme promotrice de croissance des plantes doit être adaptée aux conditions difficiles sans perdre son potentiel de promotion de la croissance des plantes dans des conditions de stress. En fait, la population de Rhizobia est affectée par le stress abiotique (Swaine et al., 2007) et certaines espèces de Rhizobia sont considérées comme très sensibles au stress dû à la sécheresse et au sel (Murray et Holt, 2005). De nombreuses études ont été menées sur des mécanismes bactériens tels que l'accumulation de solutés compatibles et la production d'exopolysaccharides protégeant les bactéries soumises au stress abiotique (Serraj et Sinclair, 2002; Ngumbi et Kloepper, 2016; Mohammadipanah et Zamanzadeh; 2019), mais peu d'études ont été rapportées concernant l'activité de promotion de la croissance des plantes des bactéries soumises à des stress abiotiques (Egamberdieva et AbdAllah, 2018).

- Dans le but de développer un inoculum à base de *Rhizobium* efficient, capable de jouer le rôle de biofertilisant pour la culture de lentille sous stress abiotiques, précisément le stress hydrique et le stress salin, la présente étude a tracé comme objectifs d'évaluer : La diversité génétique de la population de rhizobia nodulant différents géotypes de lentille, plantes au niveau du même site et sous les mêmes conditions environnementales,
- La performance symbiotique de la population rhizobia avec différentes variétés Marocaines de lentille,

II. Synthèse bibliographique

1. Lentille

1.1 Culture, domestication et intérêt agroalimentaire

La lentille (*Lens culinaris Medik.*) est une importante et populaire légumineuse employée dans la nutrition des humains et des animaux, et dans la fertilisation. *Lens* est un mot latin, qui décrit la forme des graines de lentilles cultivées. La lentille est très distincte des autres légumineuses, ce qui permet la distinction des lentilles des textes historiques et des sites archéologiques (Cubero, 1981). La lentille a été domestiquée dans le croissant fertiles à peu près 9000 ans au paravent (Toklu *et al.*, 2009) et reste une des plus importantes légumineuses cultivées dans le monde entier (Sarker and Erskine, 2006). Les régions les plus probables dans lesquelles la lentille a été domestiquée sont le sud-est de la Turquie et le nord de la Syrie en incluant les rivières de Tigraï et Euphrate (Lev-Yadun *et al.*, 2000). *Lens culinaris subsp. Culinaris* et l'ancêtre supposé de la lentille domestiquée (Barulina, 1930 ; Cubero, 1981). Après domestication, la lentille s'est répendue à chypre au néolithique (Erskine et al., 1994). La lentille s'est disséminée du sud-est au centre de l'Europe à peu près 5000 ans av. J.-C. à travers le Danube. La lentille s'est repondu jusqu'à la vallée du Nile et l'Ethiopie. Cependant, la lentille s'est propagée entre 5000 et 4000 ans av. J.-C. et en Inde à peu près en 2500-2000 ans J.C (Sonnante *et al.*, 2009). Actuellement, la lentille est cultivée enInde, l'Australie, Moyen Orient, passant par l'Afrique du nord jusqu'au continent américain (Chahota et al., 2007).

➤ Taxonomie de la lentille

L'espèce de lentille *Lens culinaris* comprend une sous-espèce cultivée (*Lens culinaris Medik. subsp. culinaris*) et 3 sous - espèces sauvages (Ford et al, 2007). La sous - espèce cultivée *Lens culinaris subsp. culinaris* est divisée en deux groupes de cultivars: **Macrosperma**: groupe de lentilles à grandes graines, principalement cultivées en Europe, Afrique du Nord et en Amérique. **Microsperma**: groupe de lentilles à petites graines, cultivées en Asie, en Egypte et en Ethiopie. Alors que les deux types sont cultivés en Asie occidentale et en Europe du Sud-Est (Ford et al, 2007).

Règne	Plantae
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Genre	<i>Lens</i>
Espèce	<i>Lens culinaris</i>

Tableau 1. Classification taxonomique de la lentille.

➤ *Biologie de la lentille*

La lentille est une plante annuelle, buissonnant et herbacée, mesure de 30 à 40 cm et peut atteindre 60-75 cm de hauteur. Ses tiges minces et très ramifiées sont d'abord dressées, puis ont tendance à se coucher. Ses feuilles composées de 6 à 10 cm de long possèdent des vrilles pour s'accrocher. Elles sont de couleur vert clair. Les 5 à 16 folioles sont opposées, oblongues à elliptiques, 3-20 mm de long x 2-8 mm de large.

La lentille fleurit en petites inflorescences, les fleurs papilionacées à long pédoncules varient en couleur du blanc au violet et sont supportés sur racèmes longs axillaires 2-5 cm.



Fig 1. Anatomie de la lentille (Bejiga, 2006)

Les fruits sont de petites gousses, latéralement comprimés qui contiennent deux ou trois graines aplatis de couleur, grise, verte, brune, rouge ou noire, dont la taille dépend du type de cultivar et varie de 2 à 9 mm x 2-3 mm (ECOCROP 2012; Bejiga, 2006) (Fig1).

➤ *Ecologie de la lentille*



Fig 2. Champs de la culture de la lentille (Bejiga, 2006)

La lentille est cultivée comme culture d'été dans les pays tempérés où les hivers sont froids, et en tant que culture d'hiver dans les régions subtropicales. Sous les tropiques, elle peut être cultivée à des altitudes plus élevées (au-dessus de 1800 m) au cours de la saison froide (Bejiga, 2006).

Elle pousse sous une large gamme de températures allant de 6 à 27 °C. Mais elle ne pousse pas bien dans des conditions tropicales humides et chaudes, et sous gel intense ou prolongée, et au-delà de 27 °C. Les conditions écologiques assurant un bon rendement et une bonne qualité des grains de lentille dépendent des précipitations annuelles qui doivent être en dessous de 750 mm avec une période sèche marquée avant la récolte. Certains cultivars peuvent supporter à la fois des périodes de sécheresse et s'adapter à une distribution pluviale allant de 300 mm à 2400 mm. La lentille ne supporte pas l'engorgement et doit être semée à la fin de la saison des pluies dans les régions chaudes, où elle se développera sur l'humidité résiduelle (Ford *et al*, 2007; Bejiga, 2006). La plante de lentille pousse sur de nombreux types de sol, allant de sable aux sols argileux lourds, ainsi que sur une large gamme de pH (de 4 jusqu'à 9), à condition que les sols ne soient pas salins, ou gorgés d'eau ou soumis à des inondations (Bejiga 2006) (Fig 2).

➤ *Production, productivité et surface cultivée*

A l'échelle du globe, la lentille se classe 4^{ème} en termes de production parmi les légumineuses alimentaire après la fève, pois chiche et le petit pois (Tableau 2). La production mondiale de la lentille a constitué (7.7 %) de la production totale des légumineuses alimentaires entre 2012–2014. La production mondiale de la lentille a augmenté de presque 11% avec une moyenne de 379359.2 T entre 2004–2014 (Tableau 2). Le gain en production vient de l'augmentation de la superficie cultivée et de la productivité par hectare. Cependant, la production de la lentille au Maroc a connu

une baisse d'une moyenne de 6675.7 t/an depuis 1980 (Tableau 2). Cela est expliqué par le déclin de la surface consacrée à la culture de la lentille.

Tableau 2. Production mondiale des principales légumineuses alimentaires de 2012 to 2014 (FAO, 2017).

Légumineuse cultivées	Classe	Production moyenne (1000T)
Fève	1	25105.39
Pois chiche	2	12874.638
Pois	3	11016.45
Lentille	4	4814.84
Pois d'Angole	5	4442.97

Le rendement moyen mondial de la lentille été seulement de 596 kg/ha entre 1970–1980, et a atteint 1077 kg/ha entre 2012–2014, augmentant en général de 80% (Fig 4). La productivité moyenne marocaine de lentille été 510 kg/ha entre 1970-1980, et a atteint 641 kg/ha entre 2012-2014 avec une augmentation de 25% (Fig 5).

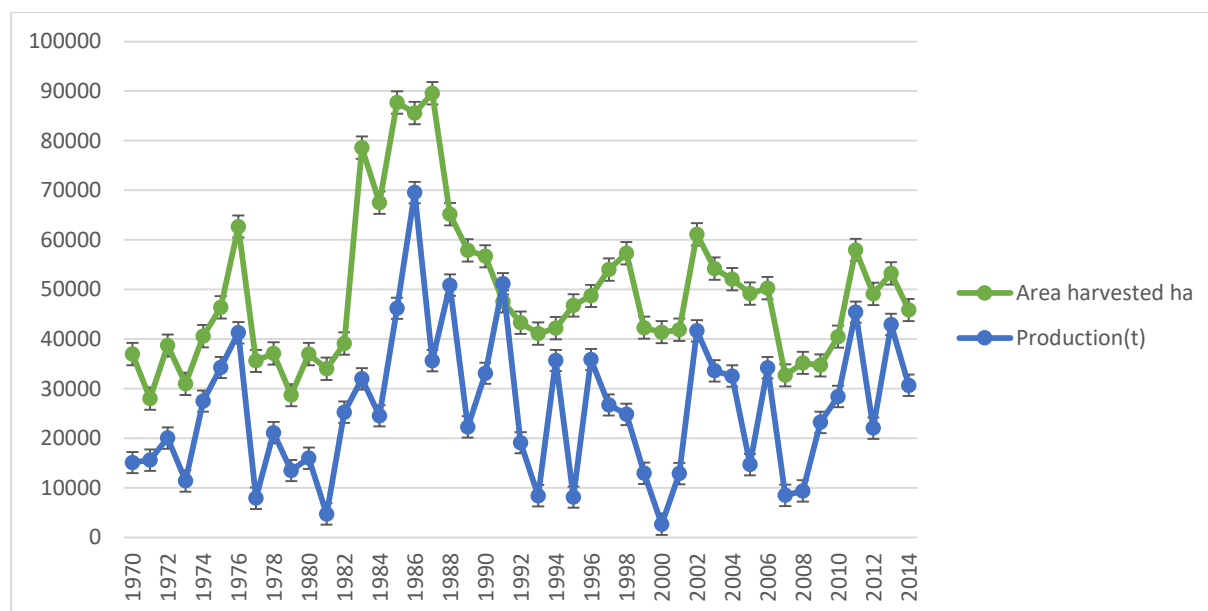


Fig 3. Evolution annuelle de la production (T) et de la surface cultivée (ha) de la lentille au Maroc.

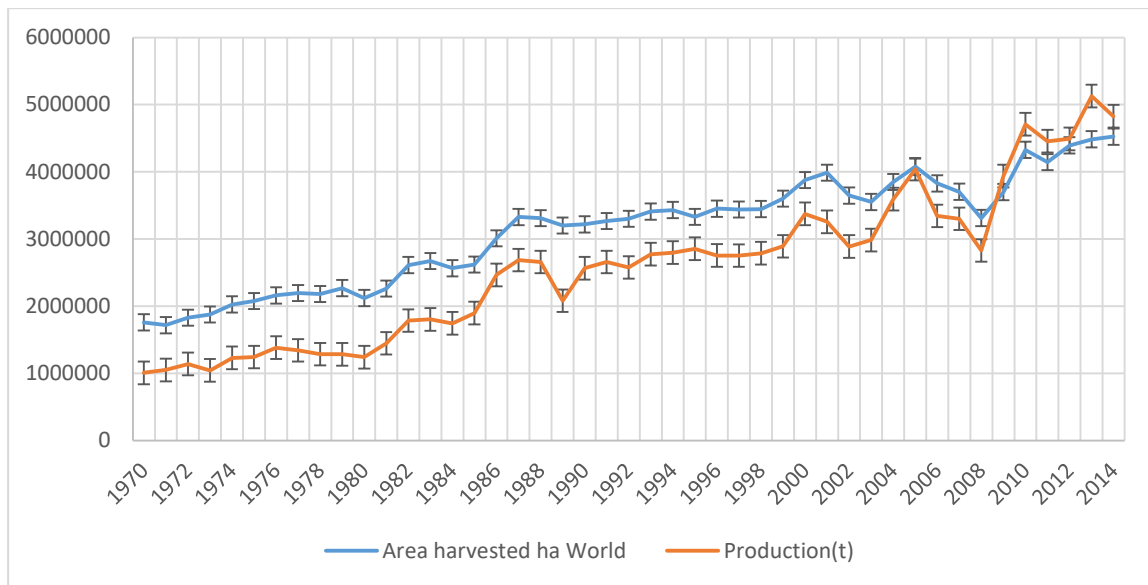


Fig 4. Evolution annuelle de la production (T) et de la surface cultivée (ha) de la lentille au niveau Mondial.

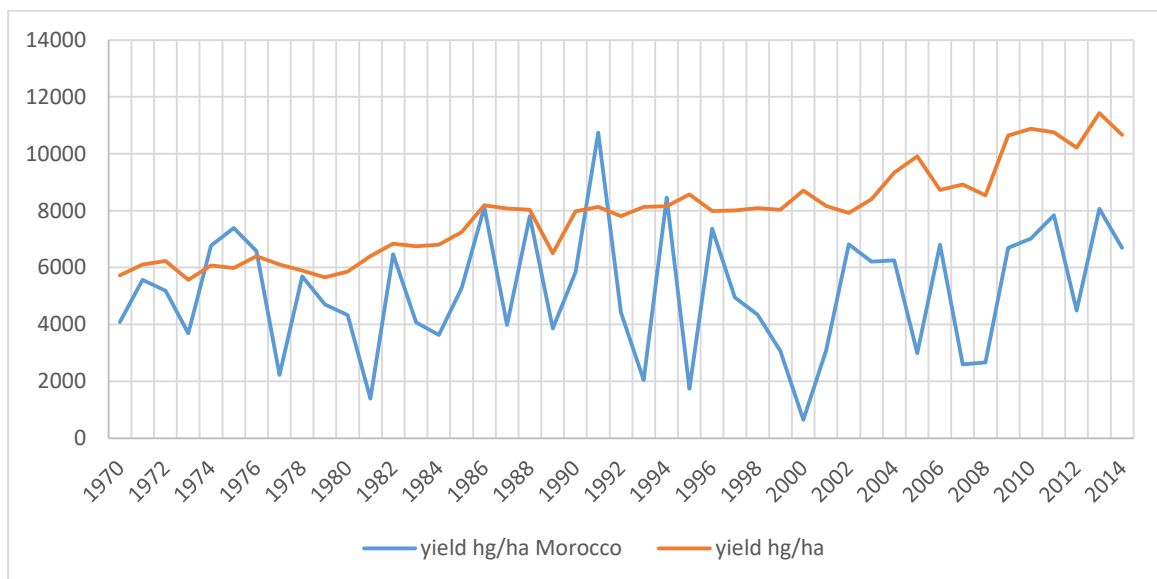


Fig 5. Evolution annuelle de la moyenne du rendement (hg/ha) au niveau mondial et au Maroc.

➤ *Exportations de la lentille*

L'exportation mondiale moyenne de la lentille été de 25102.5T durant la période de 2009–2013. Le Canada est de loin en avance des autres nations en termes d'exportation annuelle de lentille avec 13007 T de lentille exportée en 2009–2013 (Tableau 3). Les cinq premiers exportateurs de lentille à l'échelle mondiale comptent 81% de l'exportation mondiale. Après le Canada, les autres importants exportateurs se séparent en deux groupes : (i) les principaux producteurs des pays en développement – l'Inde et la Turquie et (ii) pays de production intermédiaires dans les pays

développés – l’Australie et USA, où la culture est cultivée principalement pour objectif d’exportation.

Tableau 3. La moyenne d’exportation annuelle (T) des principaux exportateurs de lentille de 2009-2013 (FAO, 2017).

Pays	Rang	Exportation de la lentille(t)
Australie	2	7240
Canada	1	13007
Inde	5	39
Turquie	4	1895
Etats Unis d’Amérique	3	2921.5

➤ *Demande et consommation*

La culture de lentille est cultivée dans le monde entier mais surtout en Asie. Les principaux pays cultivant la lentille (le Canada, les Etats unis et l’Australie) le font pour combler le besoin des pays émergents en cette culture. La croissante demande sur la lentille vient du besoin de nourrir les populations en croissance rapide. Au Maroc, la demande croissante sur la lentille est la raison principale de l’importation accrue, puisque la productivité est en quelque sorte stable depuis 1970 (Fig. 6). L’importation de la lentille a augmenté annuellement de 260 % depuis 1990 (Fig. 7), avec une moyenne d’importation de 16199 t/an.

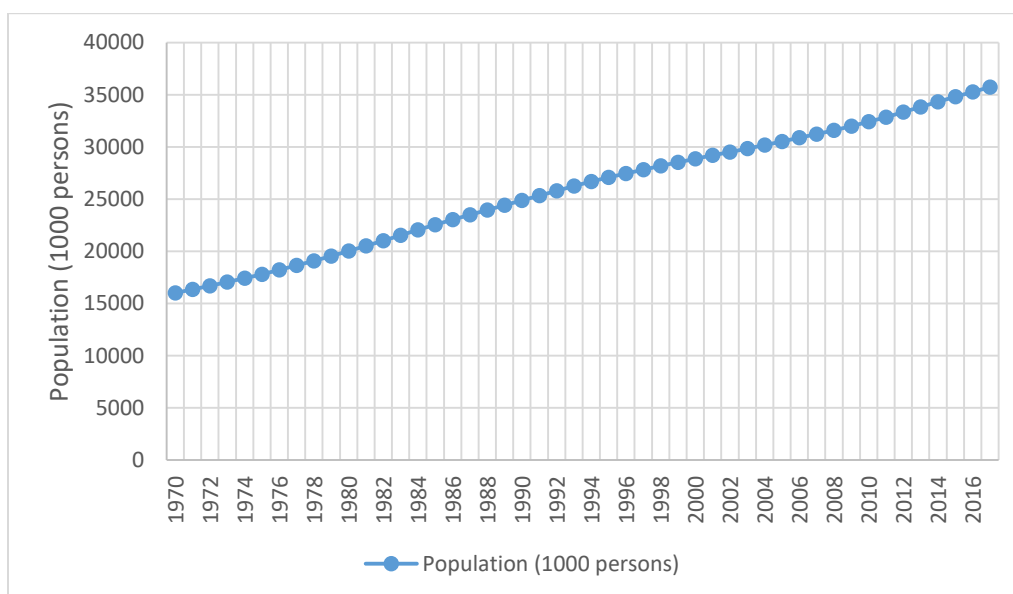


Fig 6. Population marocaine annuelle (1000personnes) de 1970 à 2016 (FAO, 2017)

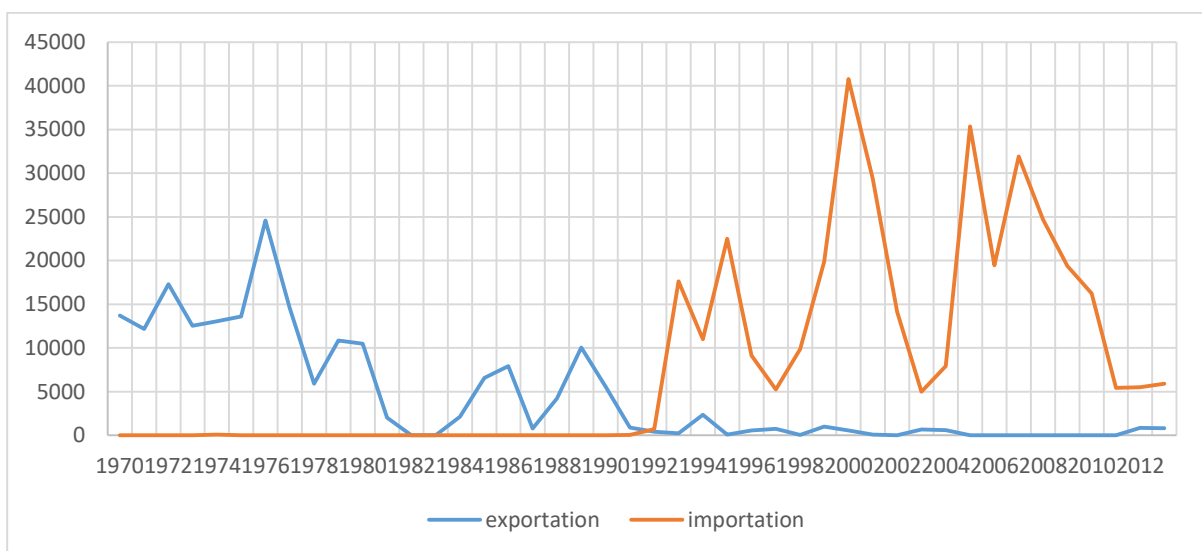


Fig 7. Importation et exportation annuelle de la lentille au Maroc (t/an) (FAO, 2017).

1.2 La fixation biologique de l'azote chez la lentille

Les légumineuses, notamment la lentille, ont toujours été une composante critique dans l'agroécosystème à travers le monde, et cela est lié à leur habilité de convertir le N atmosphérique en forme utilisable grâce à leur interaction avec des bactéries du sol connues sous le nom de Rhizobia, à leur habilité de croître sur des sols pauvres en N and leur contribution à fertiliser les sols agricoles pour les cultures succédantes. Les 250 millions d'ha approximativement de légumineuses cultivées dans le monde génèrent 90 trillions g d'Azote chaque année (Graham and Vance, 2003). Il a été estimé que la fixation biologique de l'azote par les légumineuses économise à peu près US\$ 7-10 billion de fertilisants azotés par an (Herridge and Rose, 2000; Hardarson *et al.*, 2003). Ainsi, l'azote fixé sera une source pour la croissance des plantes et pour la production de protéines destinées à la consommation humaine.

Six principaux genres de rhizobia sont impliqués dans la relation symbiotique chez les légumineuses: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium*, *Ensifer* et *Allorhizobium*. Il y a toujours une spécificité taxonomique bien marquée entre les espèces de légumineuses et les Rhizobia. Par exemple, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* est le symbionte de toutes les espèces de lentille, mais forme aussi des associations avec d'autres membres de Viciae (*Vicia*, *Pisum*, *Lathyrus*). L'efficacité de la relation symbiotique qui détermine le degré de

nodulation et de fixation d'azote est influencée par plusieurs facteurs, notamment le génotype bactérien, les conditions abiotiques et l'interaction avec d'autres organismes (Erskine, 2009).

La fixation de l'azote chez la lentille est rapportée très significative (Hafeez *et al.*, 2000, Shah *et al.*, 2003, Erskine, 2009). L'estimation du pourcentage de l'azote de la plante dérivé de la fixation de la lentille varie entre 28% et 87% avec une moyenne de 63%. L'estimation de la quantité totale de l'azote fixé par la lentille varie entre 0 et 192 kg /ha avec une valeur moyenne de 80kg/ha dans les tiges et racines. La quantité de l'azote séquestré dans les nodules des racines est importante du fait qu'elle représente une source pour les autres cultures. L'apport en azote par la lentille est estimé à 45kg N/ha (McNeil and Materne, 2007).

2. Rhizobia : classification taxonomique

2.1 Taxonomie bactérienne

La systématique est une branche de la biologie qui traite de la classification des êtres vivants en décrivant leur diversité et leurs relations mutuelles. La systématique est divisée en trois catégories à savoir la taxonomie, la classification et la phylogénétique (Široký, 2007). Un groupe d'organismes qui est défini en se basant sur certains caractères est appelé taxon, et la description et le nom du taxon sont connus comme taxonomie. La taxonomie organise les différents taxa sur la base de leur similarité qui est toutefois très importante pour l'identification des organismes. Dans le cas de la taxonomie bactérienne, le rang le plus haut est le domaine, suivi par le phylum, famille, genre, espèce and sous-espèce (Brenner *et al.*, 2005). La taxonomie a tendance à changer avec le développement de nouvelles approches.

Il y a trois principaux concepts pour définir une espèce. Un concept typologique/morphologique, concept biologique, et concept phylogénétique. Selon le concept morphologique, l'espèce regroupe des organismes qui partagent les mêmes propriétés morphologiques et anatomiques. Dans le concept biologique (Mayr, 1963), une espèce est un groupe de populations ayant la capacité de se reproduire entre elles.

La phylogénétique est une science biologique qui traite de l'identification et la compréhension de la relation évolutive entre les différents êtres vivants sur terre. La classification est

l'organisation de l'information concernant la diversité des organismes et leur rangement dans un système hiérarchique comme le Système de Linné.

2.2 Taxonomie des rhizobia

Les Rhizobia sont définies comme bactéries capables de former des nodosités racinaires chez les légumineuses, à l'aide des gènes *nod*. Ce terme décrit le phénotype, mais n'a aucune relation taxonomique avec le genre *Rhizobium*. Autres études ont proposé le terme (Root Nodule Bacteria) (RNB) comme équivalent au terme Rhizobia (Zakhia *et al.*, 2004 ; Howieson and Brockwell, 2005).

Les Rhizobia sont des bactéries du sol ayant la capacité de former des structures au niveau des racines de légumineuses appelées nodules. Les nodules représentent une niche dans laquelle les bactéries fixent l'azote atmosphérique et le transforment en ammoniac (O'Gara and Shanmugam, 1976), qui est ensuite assimilé par les plantes et améliore la croissance particulièrement dans les sols déficients. En contrepartie, les Rhizobia sont fournis de nutriments comme l'acide dicarboxylique (Lodwig and poole, 2003), et sont protégés au sein des cellules des nodules (van Rhijn and vanderleyden, 1995).

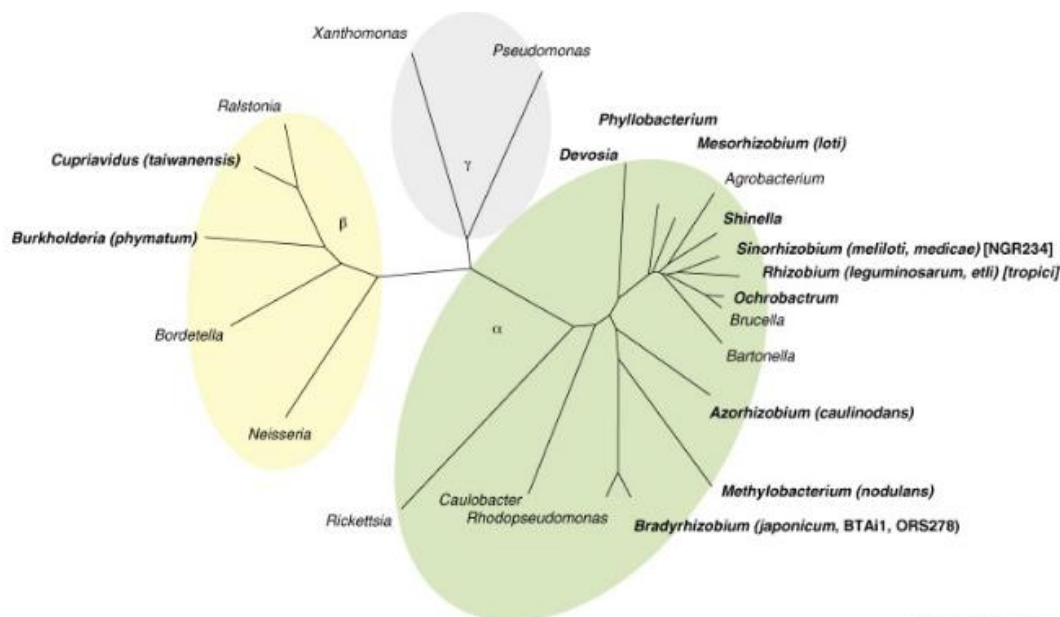


Fig 8. Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S d'alpha, Beta et gamma-protéobactéries. Les genres indiqués en gras comprennent des Rhizobium (Masson-Boivin et al, 2009).

de 98 espèces de Rhizobia ont été identifiées appartenant à 14 genres dans les groupes α -protéobactéries et β -protéobactéries (Berrada et al., 2014 ; Yan et al., 2014). La plupart des espèces appartiennent aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium* et *Sinorhizobium* (Ensifer). Les Rhizobia connus appartiennent au phylum Proteobacteria, la plupart dans la classe alpha-Proteobacteria, qui contient six familles (Garrity et al., 2004). Trois espèces de Rhizobia dans deux familles appartiennent au phylum Alpha-Proteobacteria (Garrity et al., 2004).

Rhizobiales (α -Proteobacteria)

<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Brucellaceae</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Methylobacteriaceae</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>Ochrobacterium</i>	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>	<i>Methylobacterium</i>
<i>Ensifer</i>		<i>Mezorhizobium</i>		<i>Devosia</i>	
Burkholderiales (β-Proteobacteria)					
<i>Burkholderiaceae</i>			<i>Oxalobacteraceae</i>		
<i>Burkholderia</i>			<i>Herbaspirillum</i>		
<i>Cupriavidus</i>					

Fig 9. Classification des Rhizobia selon leur appartenance au phylum Proteobacteria (Berrada et al., 2014).

2.3 Le genre *Rhizobium*

➤ *Caractères morphologiques*

Les rhizobia sont des bactéries Gram négatif, non sporulantes, avec 2 formes distinguées. La forme végétative: les rhizobia sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 μm de largeur sur 1,2 à 3 μm de longueur (Somasegaran et Hoben, 1994). Pour les rhizobia à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2-6 flagelles péritriches. Les rhizobia à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994). La forme bactéroïde: à l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les rhizobia se transforment en bactéroïdes de formes branchée, sphérique ou en massue (Perry et al., 2004). Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarium*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

➤ *Caractères physiologiques*

Le rhizobium est un micro-organisme aérobie ou micro aérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, plus exactement 6.8, mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *Rhizobium japonicum*. La température de croissance idéale se situe entre 25-30°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

➤ *Caractères culturaux*

Il ya deux groupes de rhizobium, le premier comporte les rhizobia à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours et une vitesse de dédoublement chaque 2-4 h.

Le deuxième est le groupe des rhizobia à croissance lente, ce sont les *Bradyrhizobium*. Ils produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours et ils ont une vitesse de dédoublement de 6-8 h (Somasegaran et Hoben, 1994).

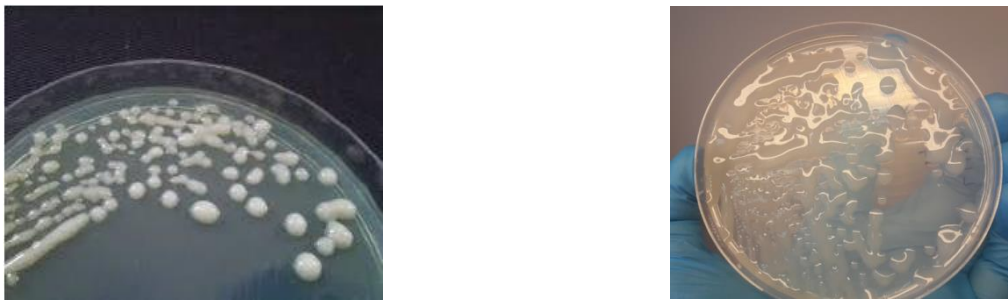


Fig 10. Aspect des Rhizobium sur le Milieu YAM (Boubekri, 2017).

Le Yeast Mannitol Agar (YAM) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture de rhizobium (Vincent, 1970). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou laiteuse, humide, translucide, et peuvent être brillantes. Les colonies sont jaunes pâles rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994). Il est admis que seules les bactéries correspondant aux bactéries non différenciées en bactéroïdes sont capables de pousser sur boîte de Pétri (Boivin-Masson *et al.*, 2006).

➤ *Caractères biochimiques*

Les rhizobiums sont des bactéries chimioorganotrophes, ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces

exigent des vitamines pour leurs croissances (Somasegaran et Hoben, 1994). Les rhizobiums à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ils ont une croissance meilleure dans le glucose, le mannitol ou le saccharose. La majorité des souches à croissance lente préfère le pentose (Somasegaran et Hoben, 1994). Les rhizobiums n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante et ont besoin d'une source d'azote ammoniacal ou aminé pour se développer à l'état libre (Pelmont, 1995).

➤ *Caractères génétiques*

La génétique de *Rhizobium* n'est pas facile, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre (Pelmont, 1995). Les souches de *Rhizobium* nodulant les légumineuses sont considérées particulièrement complexes en raison de leurs caractéristiques génétiques (Patrícia *et al.*, 1998; Raposeiras *et al.*, 2002).

Le génome du *Rhizobium* est particulièrement intéressant, il peut y avoir trois types de réplicons pour un chromosome de taille supérieur à 4 Mb, un méga plasmide (1-2 Mb) et un plasmide de taille inférieure à 1 Mb, selon les espèces (Laranjo *et al.*, 2002). La présence d'un plasmide de grande dimension ou méga plasmide (P_{sym}) est une caractéristique intéressante dans toutes les souches de *Rhizobium meliloti*. Les gènes responsables de la nodulation (Nod) et de la fixation de l'azote (Fix, Nif) dans les souches de *Rhizobium* sont situés sur ce simple réplicon symbiotique, des gènes qui codent pour des bactériocines et pour la production des pigments sont aussi présents (Werner, 1992; Pelmont, 1995; Patrícia *et al.*, 1998). La spécificité de l'hôte est codée par les gènes du plasmide sym, Un échange dans ce plasmide signifie un échange dans la spécificité de l'hôte (Pelmont, 1995).

3. Rhizobia comme Promoteurs de Croissance des Plantes (PGPR)

3.1 Généralités sur les PGPRs

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont un groupe de bactéries, qui existe également dans la rhizosphère. Le terme "bactérie favorisant la croissance des plantes » a été utilisé pour désigner les bactéries rhizosphériques ayant un effet améliorateur sur la croissance de la plante. A cause des exsudats racinaires, la population microbienne de la rhizosphère est intense et très diversifiée comparativement à celle de son environnement. C'est pourquoi le nombre de bactéries dans cette zone est généralement 10 à 100 fois plus élevé que dans le sol avoisinant (Pravin *et al.*, 2016).

Les rhizobactéries, favorisant la croissance des plantes, peuvent être classées en deux catégories : Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes extracellulaires (ePGPR) qui sont de trois types : Bactéries vivant dans le sol près des racines (Rhizosphère), Bactéries colonisant la surface racinaire (Rhizoplan), Bactéries résidant dans le tissu racinaire (Endophytes) entre les cellules corticales. Ce groupe inclut les genres : *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas* et *Serratia*.

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes intracellulaires (iPGPR) se trouvent généralement à l'intérieur des structures végétales spécialisées au niveau des tiges ou des racines (nodules). Cette catégorie comprend : l'*Allorhizobium*, le *Bradyrhizobium*, le *Mesorhizobium* et le *Rhizobium*, les endophytes et les espèces *Frankia* qui peuvent tous deux fixer symbiotiquement l'azote atmosphérique avec les plantes supérieures (Goyal *et al.*, 2015; et Govind *et al.*, 2015).

3.2 Modes d'action des PGPRs

Les PGPRs peuvent agir, en stimulant la croissance de la plante, par différents types de mécanismes :

➤ *Les mécanismes directs*

Stimulent la croissance végétale par une augmentation de la qualité de nutriments disponibles (fixation libre de l'azote, solubilisation du phosphate, etc.), une augmentation de la micro-structuration du sol rhizosphérique adéquat à une bonne rétention d'eau, et une modification de l'équilibre hormonal de la plante (production de phytohormones, désamination du précurseur de l'éthylène, etc.).

➤ *Les mécanismes indirects :*

Ils agissent en inhibant ou en réduisant les effets inhibiteurs des agents pathogènes ou parasites. Généralement, ces effets indirects sont dus à des phénomènes de compétition vis-à-vis des éléments nutritifs ou par un effet d'antagonisme (Benmati, 2014).

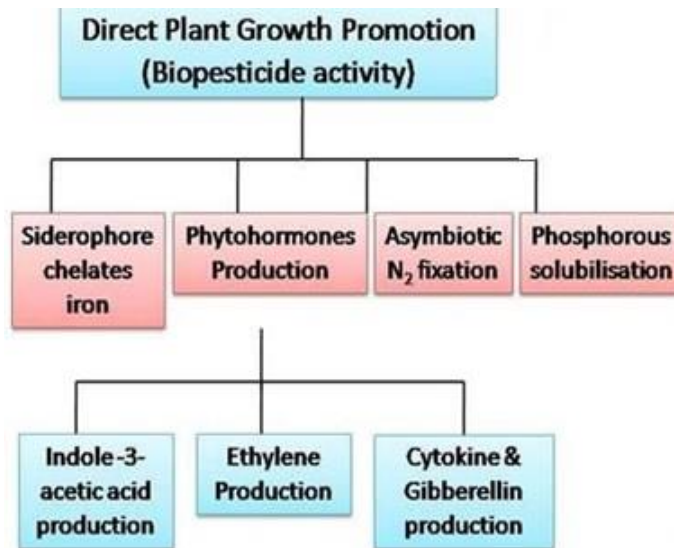


Fig 11. Les mécanismes d’actions des Rhizobactéries comme promotrices de croissance des plantes (Ramos *et al.*, 2009).

3.3 Solubilisation des Phosphates

Après l'azote, le phosphore (P) est le nutriment le plus limitant pour la croissance des plantes. Il existe sous des formes inorganiques (liées, fixées ou labiles) et organiques (liées). Sa disponibilité pour les plantes est influencée par le pH, la compaction, l'aération, l'humidité, la température, la texture et la matière organique des sols, les résidus de culture, l'étendue des systèmes racinaires et des exsudats (Subramaniam *et al.*, 2015).

Les sols peuvent constituer un grand réservoir de phosphore total (P), mais les quantités disponibles pour les plantes ne représentent habituellement qu'une infime proportion de ce total. Sa faible disponibilité pour les plantes, dans la majorité des sols, est due à sa présence sous forme insoluble. Cependant, les plantes ne peuvent absorber que les formes solubles : les ions monobasiques (H_2PO_4) et dibasiques (HPO_4^{2-}) (Bhattacharyya, 2012). Le P insoluble est présent sous forme d'un minéral inorganique, l'apatite, ou sous plusieurs formes organiques comprenant l'inositol phosphate (phytate de sol), les phospho-monesters et les phospho-triesters (Glick, 2012).

En agriculture, les engrais phosphatés sont fréquemment utilisés pour combler la carence en P. Cependant en plein champs, les plantes absorbent de faibles quantités d'engrais phosphatés appliqués, tandis que le reste se transforme rapidement en complexes insolubles dans le sol (Mckenzie et Roberts, 1990). Mais l'application régulière de cet élément sous sa forme chimique,

pour maintenir une bonne alimentation phosphatée de la plante, est non seulement coûteuse mais également polluante pour l'environnement (Munees et Mulugeta, 2013).

Pour épargner ce problème environnemental, l'utilisation des microorganismes comme agent biofertilisant capables de convertir le phosphate insoluble en une forme soluble dans des sols pauvres en phosphore est une alternative prometteuse, pour une agriculture durable (Sharma *et al.*, 2007). Ce processus a permis de réduire l'utilisation d'engrais phosphatés (Chaiharn et Lumyong, 2009).

➤ *Mode d'action :*

La solubilisation des phosphates est le résultat de l'acidification, de la chélation, des réactions d'échange d'ions et de production d'acides organiques de faible poids moléculaire. Le principal mécanisme de solubilisation est souvent la production d'acides gluconique et 2-cétogluconique, les plus fréquemment rencontrés. D'autres acides organiques - glycolique, oxalique, malonique et succinique - sont également identifiés. Ils sont produits par la voie d'oxydation directe au niveau de la membrane cytoplasmique des bactéries conduisant à l'acidification des cellules et de leur environnement pour libérer du phosphate sous forme ionique. Par contre, la libération des groupements phosphates liés aux composés organiques est assurée par l'action des phosphatases (Nautiyal, 1999).

L'adaptation et l'activité des microorganismes solubilisant le phosphate (MSP) peuvent être affectées par les facteurs environnementaux, en particulier les conditions stressantes (Nautiyal, 1999). En conséquence, il serait intéressant d'identifier naturellement ou expérimentalement des souches capables de solubiliser les phosphates en conditions stressantes. Expérimentalement, l'adaptation bactérienne au stress peut être provoquée par une exposition prolongée à une intensité sub-létale du même stress, ou dans certains cas à un autre stress. En effet, les souches isolées à partir de sols acides ont le potentiel de solubiliser les phosphates dans des conditions stressantes (concentration en sel et pH élevés) (Thakuria *et al.*, 2004). Dans le même ordre d'idée, les travaux de Baldani *et al.*, (2000), ont montré qu'en condition de stress salin, l'inoculation de plantes par les bactéries solubilisant les phosphates, *Herbaspirillum seropedicae* et *Burkholderia* sp. a augmenté le rendement de la récolte de 1,5 à 21% par rapport aux témoins non inoculés. Également, la solubilisation du phosphate par des souches de *Pseudomonas* isolées à partir des zones froides de

L'Himalaya prouve que ces souches ont développé la capacité de solubiliser le phosphate dans un environnement stressant (alcalinité, salinité et dessiccation).

3.4 Production des phytohormones

Les hormones végétales sont des messagers chimiques qui influencent la capacité de la plante à réagir à son environnement. Ce sont des composés organiques naturels qui sont principalement synthétisés dans certaines parties de la plante et transportés vers une autre. Les hormones végétales, également appelées phytohormones, influencent les processus physiologiques à de faibles concentrations : la croissance, la différenciation, le développement et d'autres processus comme les mouvements stomatiques. Physiologiquement, la réponse de la plante est souvent le résultat de deux ou plusieurs hormones agissantes simultanément. En réalité, les hormones sont capables aussi d'inhiber la croissance des plantes.

Cependant, des travaux ont montré que certaines souches bactériennes sont capables de synthétiser ces phytohormones. Parmi ces hormones végétales, il y a les auxines, l'éthylène, les gibbérellines, l'acide abscissique (ABA) et les cytokinines, qui pourraient réguler la croissance et le développement des plantes (Pravin *et al.*, 2016).

De nombreux travaux indiquent que l'utilisation des hormones en tant que molécule- signal ne sont pas destinées seulement aux plantes mais participent également à la communication entre les bactéries et d'autres micro-organismes tels le « Quorum sensing », ou à la résistance systémique induite (ISR) (Spaepen *et al.*, 2007). Il existe cinq principaux groupes de phytohormones : les auxines, les gibbérellines, l'éthylène, les cytokinines et l'acide abscissique. Il faut noter que l'acide indole-3-acétique (AIA) est le plus important du groupe des auxines (Silini, 2013).

➤ *Acide indole acétique (AIA) :*

L'acide indole acétique AIA est une auxine primaire active chez la majorité des plantes. Il fonctionne comme une molécule - signal importante dans la régulation du développement des plantes. L'AIA est impliqué pratiquement dans tous les aspects de la croissance et du développement des plantes, ainsi que dans les réponses de défense. La diversité de ses fonctions est intimement liée à la complexité de ses voies de biosynthèse, de transport et de signalisation (Santner *et al.*, 2009). En général, l'AIA affecte la division cellulaire en contrôlant aussi

l'organisation du méristème apical (phyllotaxie), la ramification des parties aériennes (dominance apicale), la formation de tout le système racinaire (rhizogénèse). Son implication dans la photosynthèse, la formation de pigments et la biosynthèse de divers métabolites a été également mise en évidence. De même, il intervient dans les réponses à la lumière (phototropisme), à la gravité (gravitropisme), à la fluorescence et à la résistance aux conditions stressantes. L'AIA joue un rôle important dans les premiers stades de l'embryogenèse. Ces multiples effets sur les différents stades de la croissance de la plante résultent du contrôle que cette phytohormone exerce sur la division cellulaire, l'élongation cellulaire et sur certaines étapes de différenciation (Fig 12).

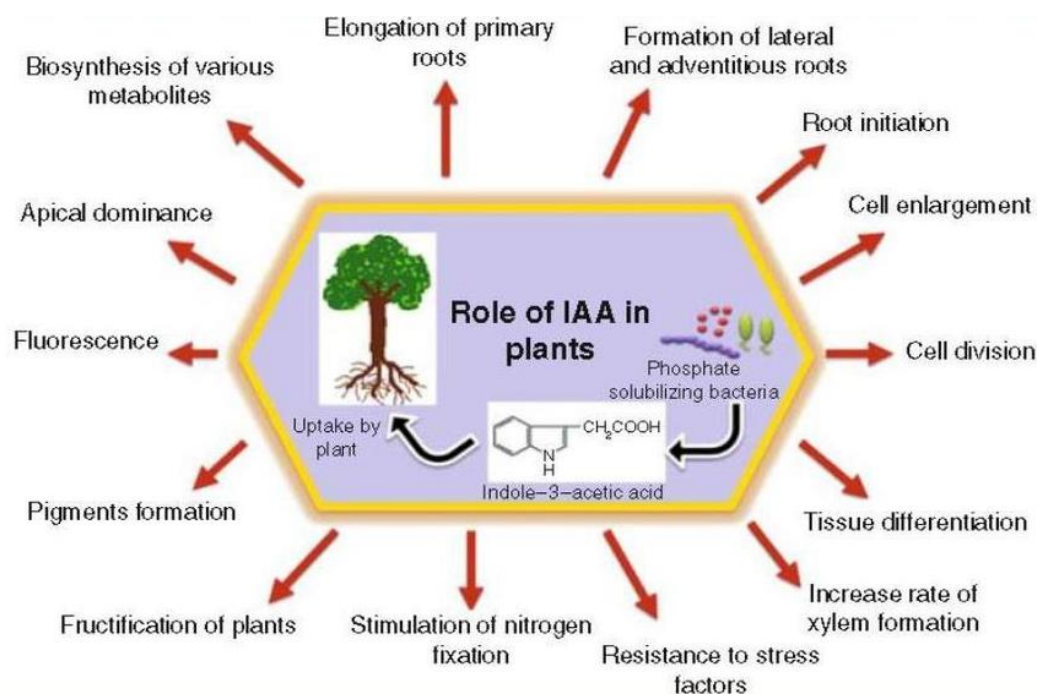


Fig 12. Rôles de l'AIA dans l'amélioration de la croissance des plantes (Khan *et al.*, 2009).

Depuis longtemps, il a été admis que 80% des microorganismes isolés de la rhizosphère de diverses cultures possèdent la capacité de synthétiser et de libérer des auxines en tant que métabolites secondaires (Patten et Glick, 1996).

Évidemment, AIA agit également comme une molécule de signalisation réciproque affectant l'expression génique dans plusieurs microorganismes. Donc, l'AIA joue un rôle très important dans les interactions rhizobactéries-plantes (Spaepen et Vanderleyden, 2011).

De plus, l'AIA bactérienne augmente la surface et la longueur des racines, et fournit ainsi à la plante un meilleur accès aux nutriments du sol. En outre, l'AIA rhizobactérienne stimule les excrétions racinaires pour soutenir la croissance des bactéries de la rhizosphère (Glick, 2012).

Quantitativement, la synthèse de l'AIA est stimulée par un acide aminé, qui est le L-tryptophane. Ce dernier est identifié comme son précurseur principal et joue ainsi un rôle dans la modulation du niveau de sa biosynthèse (Zaidi et al., 2009). Tandis que l'anthranilate, qui est le précurseur du tryptophane, réduit la synthèse de l'AIA. Par ce mécanisme, le tryptophane inhibe la formation d'anthranilate par une rétroaction négative sur l'anthranilate synthase, en stimulant indirectement la production d'AIA (Spaepen *et al.*, 2007). Cependant, l'ajout du tryptophane, comme supplément, dans les milieux de culture augmente la production d'AIA par la plupart des rhizobactéries (Spaepen et Vanderleyden, 2011).

➤ *Gibbérellines :*

L'acide gibbérellique (GA), une hormone végétale stimulant la croissance et le développement des plantes, est un composé diterpénoïde et tétracyclique. Actuellement, ils sont au nombre de 89 (GA1 à GA89). Ils stimulent la germination, déclenchent les transitions du méristème vers la croissance des pousses juvéniles jusqu'au stade floraison, déterminent l'expression sexuelle et le développement des graines. Ils augmentent les teneurs de chlorophylle, des sucres solubles et des protéines. Également, ils améliorent l'absorption des éléments minéraux comme K^+ et Ca^{2+} . Ils réagissent avec des différents facteurs environnementaux, comme la lumière, la température et l'eau.

Certains travaux suggèrent que certains types de nanisme observés chez les plantes sont dus à une carence en cette phytohormone. Cependant, jusqu'à l'heure actuelle, les mécanismes d'action du GA sur tous les phénomènes physiologiques de la plante cités en dessus ne sont pas encore connus. Donc, la connaissance de ces mécanismes est essentielle pour la survie des espèces végétales et pour une bonne récolte (Gupta et Chakrabarty, 2013).

Parmi les micro-organismes producteurs du GA, il y a *Rhizobium leguminosarum* b.v. *phaseoli* (Jansen *et al.*, 1992) et *Azospirillum brasilense* et *Azospirillum lipoferum* (Piccoli *et al.*, 1996). D'après les travaux de Hamida et Elkomy, (1998), l'atténuation de l'effet négatif du stress hydrique, induit en augmentant la concentration en sel, dans le milieu de culture des céréales en présence d'*Azospirillum* sp. qui peut être attribuée en partie à la production de GA par cette espèce bactérienne (Gupta et Chakrabarty, 2013).

➤ *Cytokinines* :

Les cytokinines stimulent la division des cellules végétales et dans certains cas le développement des racines et la formation des poils absorbants (Franken Berger et Arshad, 1995). Comme les autres phytohormones, les cytokinines sont également synthétisées par les micro-organismes rhizosphériques. Actuellement, les composés identifiés, du groupe des cytokinines, d'origine microbienne sont une trentaine (Nieto et Frankenberger 1990, 1991). Parmi les souches bactériennes de la rhizosphère, les Rhizobia ont été signalés comme des producteurs puissants de cytokinines (Caba *et al.*, 2000; Senthilkumar *et al.*, 2009).

3.5 Production des sidérophores

Au niveau du sol, le fer existe sous forme d'hydroxydes et d'oxyhydroxydes insolubles, qui ne sont pas accessibles aux plantes et aux microbes (Rajkumar *et al.*, 2010). Cependant, les bactéries synthétisent des composés appelés sidérophores capables de séquestrer le fer sous sa forme ferrique (Fe_3^+). L'utilisation des sidérophores représente une stratégie très efficace pour l'acquisition du fer chez les bactéries.

Ces molécules sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire, compris entre 200 et 2000 daltons. Leur rôle essentiel est de solubiliser, chélater et d'extraire le fer ferrique de nombreux complexes minéraux ou organiques, et de le rendre disponible aux microorganismes (Neilands, 1995). Egalement, grâce à leur forte affinité au Fe_3^+ et à leur solubilité dans l'eau, ces sidérophores assurent l'alimentation ferrique des plantes (Mezaache, 2012).

De même, les sidérophores peuvent former des complexes stables avec des métaux lourds tels que Al, Cd, Cu etc. (Neubauer *et al.*, 2000). En conséquence, les bactéries productrices de sidérophores dans la rhizosphère de la plante peuvent réduire les effets stressants des métaux lourds. Parmi les espèces rhizobiennes, qui produisent des sidérophores, il y a les *R. meliloti*, *R. tropici*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *S. meliloti* et *Bradyrhizobium* sp (Subramaniam *et al.*, 2015).

3.6 Utilisation des Rhizobium comme PGPR

Les PGPR sont composés presque exclusivement de bactéries libres qui colonisent la rhizosphère ou certains tissus de la plante (Kloepper *et al.*, 1989). En plus des PGPR, il existe un certain nombre

de « rhizobactéries symbiotiques » qui établissent une relation complexe, intime et mutuellement bénéfique avec la plante (Bohlool, 1990). Ce groupe, en particulier la famille des Rhizobiaceae, a fait l'objet d'études approfondies sur leur association avec les légumineuses dans la perspective « classique » de la fixation biologique de l'azote (Hablieb et Luden 2000). Cependant, il y a une tendance à considérer les espèces de Rhizobiaceae comme PGPR, surtout lorsqu'elles sont inoculées dans des non-légumineuses (Gaur *et al.*, 1980). Dans des expériences sur le terrain, Höflich *et al.* (1994) ont obtenu une quantité importante de matière organiques sèches qui augmente après l'inoculation du blé de printemps et de l'orge avec la souche R39 de *Rhizobium leguminosarum*. Yanni *et al.* (1997) ont démontré que *R. leguminosarum* colonise les racines et améliore la croissance et la productivité du riz. Noel *et al.*, (1996) ont montré que *R. leguminosarum* favorise la croissance précoce des racines chez les semis de laitue (*Lactuca sativa* L.) et de canola (*Brassica rapa* L.) dans des conditions contrôlées. Chabot *et al.*, (1996) ont établi une capacité de stimulation de la croissance des plantes par des mécanismes directs tels que la production de sidérophores ou la solubilisation du phosphore pour diverses souches de *R. leguminosarum*. En ce qui concerne la biosynthèse de la gibbérelline par ces rhizobactéries, il existe un seul rapport de Katznelson et Cole (1965), qui a déterminé la production de GA3 par *B. japonicum* en utilisant un dosage biologique par chromatographie sur couche mince (CCM) (Boiero *et al.*, 2009).

3.7 Effet des stress abiotiques sur les souches Rhizobium

Les sols tropicaux, parfois les milieux les plus productifs du monde, peuvent devenir défavorables à la vie des micro-organismes. Les principaux facteurs limitant l'activité biologique dans les sols tropicaux sont la sécheresse, la salinité, les hautes températures, les pH extrêmes acides ou alcalins et les carences en éléments nutritifs (Henzell, 1988). Ces sols sont souvent influencés simultanément par de nombreux facteurs, en réduisant la croissance et la capacité de survie des organismes. En ce qui concerne la symbiose légumineuses-Rhizobium, le facteur susceptible d'entraver la fixation d'azote n'est pas forcément l'absence de souches efficaces, mais un ou plusieurs facteurs environnementaux qui limitent les potentialités de cette association (Alexander, 1985). Ces stress peuvent agir sur les processus d'infection, de genèse des nodosités, ou sur l'activité réductrice de la nitrogénase (Hirsch, 1996).

➤ *Stress hydrique*

Les effets du stress hydrique se manifestent aussi bien au niveau cellulaire qu'à l'échelle de la plante, entraînant des pertes importantes en agriculture. Le recours à l'inoculation par des microorganismes favorise la croissance en condition de sécheresse dans les zones arides ou semi-arides et peut aider les plantes à supporter le stress. Ces microorganismes (PGPR) sont adaptés aux conditions défavorables, en conséquence, ils protègent les plantes contre certains stress environnementaux (Marulanda *et al.*, 2009). En présence d'un stress hydrique, les cellules bactériennes accumulent des solutés pour maintenir leur turgescence nécessaire pour leur croissance sous des conditions osmotiques défavorables. Parmi ces solutés, il y a les acides aminés, les amines quaternaires et les sucres. Le terme « Tolérance Systémique Induite » (IST) a été proposé pour les changements physiques et chimiques induits par les PGPR.

Dans ce sens, les travaux de Timmusk et Wagner (1999) ont montré pour la première fois l'inoculation d'*Arabidopsis thaliana* par *Paenibacillus polymyxa* (PGPR) a amélioré la tolérance à la sécheresse de cette plante par l'induction de gènes susceptibles de s'exprimer en cas de sécheresse. Le même résultat a été observé chez le blé (*Triticum aestivum*) inoculé en condition de stress hydrique par l'*Azospirillum brasilense* Sp245 (Creus *et al.*, 2004). De même, les plantes traitées avec des bactéries productrices d'exopolysaccharides (EPS) ont développé une résistance accrue au stress hydrique (Bensalim *et al.*, 1998).

➤ *Stress salin :*

En agriculture, les effets de la salinité sont catastrophiques, et surtout chez les plantes sensibles. Actuellement presque de 40% de la surface terrestre est affectée par la salinité (Zhan *et al.*, 1991). Le sel entraîne une diminution de la croissance pondérale et une réduction des dimensions de tous les organes des plantes sensibles (Boughribil *et al.*, 1998). Les effets directs de la salinité sont liés à l'accumulation excessive des ions Na^+ et Cl^- dans les cellules végétales en inhibant les enzymes impliquées dans la synthèse des protéines et la photosynthèse (Boughribil *et al.*, 1998). En plus, la salinité a des effets indirects en perturbant l'absorption racinaire, en particulier le phosphore, en raison de sa liaison avec les ions Ca_2^+ dans les sols salés (Boughribil *et al.*, 1998).

Chez les associations symbiotiques de type Légumineuses-Rhizobium, la salinité affecte le processus d'infection, la croissance et le fonctionnement des nodosités et la fixation biologique de l'azote (Biological Nitrogen Fixation : BNF) (Boughribil *et al.*, 2003).

La croissance et la multiplication du *Rhizobium* sont affectées par le sel. Les limites de tolérance des différentes espèces de *Rhizobium* s'étalent sur une gamme étendue entre 0 et 5% de NaCl (Whipps, 2001). Certaines souches sont tolérantes au sel, tels que *R. meliloti* (Zhang *et al.*, 1991), *R. fredii* (Yelton *et al.*, 1983), *Rhizobium* sp. d'*Acacia* Sénégal et de *Prosopis chilensis* (Zahran *et al.*, 1994). La croissance des rhizobia a été notée normale sous des concentrations en NaCl d'environ 1%. Certaines souches ont été rapportées pour leur capacité à croître à des concentrations élevées en sel (>3%), notamment *Sinorhizobium meliloti* (Farissi *et al.*, 2014). Les espèces d'*Azotobacter* résistent mieux à la salinité. Leurs concentrations peuvent atteindre 10^6 à 10^7 par gramme de sol (Whipps, 2001).

Le sel agit sur la croissance et la multiplication du *Rhizobium* par ses composantes osmotiques et ioniques. Il est généralement admis que l'effet nocif est dû principalement à une accumulation excessive des ions à l'intérieur des cellules Rhizobiennes.

Lorsqu'il est soumis à la contrainte saline, le *Rhizobium* accumule des composés organiques, comme le glutamate, qui jouent un rôle protecteur contre les effets nocifs du sel (Chen, 2011). Également, il a été montré chez *S. meliloti* que la concentration et le nombre de ces composés organiques sont en fonction du degré du stress salin (Smith *et al.*, 1994). Parfois, ces osmo-protecteurs assurent un double rôle. Par exemple chez *S. meliloti*, la proline-bétaine joue le rôle d'un osmoprotecteur (sous forte contrainte osmotique) et en même temps constitue une source d'énergie (sous faible stress osmotique) (Miller-Williams *et al.*, 2006). Cependant, un tel effet n'a pas été obtenu sur une souche de *Rhizobium meliloti*. De même, l'accumulation excessive des composés organiques peut inhiber l'activité des enzymes rhizobiales.

Chez le *Rhizobium*, les mécanismes de tolérance au NaCl sont associés à plusieurs familles de gènes, qui ont été rapportés chez différentes espèces, comme *S. meliloti*, *R. etli*, *R. tropici*, *Rhizobium* sp. *S. fredii* et *B. japonicum*.

4. Inoculation des rhizobia pour améliorer la croissance des légumineuses

L'utilisation d'inoculants à base de rhizobia pour améliorer la fixation de l'azote et la productivité des légumineuses à grains a été bien établie dans les pays développés. L'azote (N) est le nutriment le plus souvent déficient au niveau des sols pour une production agricole normale, tandis que les engrais azotés sont coûteux, parfois inadéquats et peuvent ne pas être fournis en temps opportun. Cela des des inoculants de rhizobia une option moins chère, plus facile et plus sûre pour améliorer la fixation de l'Azote et la productivité des légumineuses à grains.

La plupart des sols sur lesquels les légumineuses sont cultivées en Afrique sont relativement sous productifs en raison d'un mauvais état nutritionnel, en particulier en azote (N) (Machido et al. 2011). De plus, de nombreux sols n'ont pas de populations adéquates de rhizobiums indigènes en termes de nombre, de qualité ou d'efficacité pour améliorer la fixation biologique de l'azote (FAO, 1984). Cette situation nécessite l'application d'une source externe de rhizobium pour permettre une nodulation efficace et une fixation de N₂, connue sous le nom d'inoculation. Les avantages des inoculants de rhizobia pour l'amélioration des légumineuses sont connus depuis plus d'un siècle; la production et l'utilisation d'inoculants de légumineuses est répandu dans plusieurs pays développés, y compris les états unis d'Amérique, le CANADA et l'Australie (Nelson 2004). Cependant, la production et l'utilisation d'inoculants en Afrique sont relativement sous-développées. Les initiatives visant à créer des industries locales de production d'inoculants dans de nombreux pays africains n'ont commencé que dans les années 1980 et 1990, menées par des organisations telles que la fixation de l'azote chez les légumineuses agricoles tropicales (NifTAL), l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et les centres régionaux de ressources microbiologiques (MIRCEN). Seules quelques initiatives ont conduit à une production à grande échelle (Bala et al. 2011).

La découverte de la fixation symbiotique de l'azote entre les rhizobiums et les légumineuses à la fin du XIXe siècle a donné lieu à de nombreuses recherches confirmant son potentiel en tant qu'alternative aux engrais azotés inorganiques en agriculture (Bala 2011; N'cho et al. 2013). Les inoculants de rhizobia sont commercialisés depuis plus de 100 ans dans de nombreux pays développés (Nelson 2004; Giller 2008). L'inoculation des légumineuses avec des rhizobia a permis d'augmenter considérablement la nodulation des légumineuses, le rendement en céréales et en biomasse, la fixation de l'azote et les niveaux de nitrate dans le sol après la culture. Ces avantages sont généralement les plus élevés lorsque les légumineuses inoculées sont cultivées dans des sols

sans rhizobium ou à faible concentration de population rhizobium, mais ont tendance à être marginaux dans les sols contenant déjà un nombre élevé de rhizobium compatibles et efficaces (GRDC 2013).

Les rhizobia ne sont pas seulement utilisés comme inoculants pour une meilleure fixation de l'azote, mais ont aussi démontré leur prédominance dans les nodules pendant 5 à 15 ans après l'inoculation initiale (Lindstrom et al. 1990), et confirmant qu'ils sont des colonisateurs efficaces persistant dans le sol pendant de nombreuses années en l'absence de leur hôte (Sanginga et al. 1994).

4.1 Rôle des rhizobia dans l'adaptation des légumineuses aux stress abiotiques

La meilleure option pour développer des cultures tolérantes aux stress abiotiques avec des coûts de production et des risques environnementaux minimisés peut être l'utilisation de microbes PGP comme anti-stress. Les rhizobia, lorsqu'elles sont utilisées comme inoculants microbiens, ont montré de nombreuses propriétés directes et indirectes de la PGP, y compris des caractéristiques d'amélioration de la tolérance aux stress. Par exemple, une étude de terrain a montré que *M. mediterraneum* LILM10 augmentait le nombre de nodules, le poids sec des pousses et le rendement en grains des pois chiches plantés sous une carence en eau et une contamination saline (Romdhane et al., 2009). Des études en pot ont montré que le nombre de nodules, l'activité de la nitrogénase et la production de biomasses du haricot rouge étaient augmentés par l'inoculation de *R. elti* sous stress abiotiques (Suarez et al., 2008).

4.2 Atténuation du stress hydrique par l'inoculation des rhizobia

Le déficit hydrique réduit la viabilité rhizobienne (Hussain et al. 2014a, b), mais les légumineuses cultivées sous des terres arides et semi-arides nécessitent des rhizobia résistants à la sécheresse pour former une symbiose efficace. Dans ce contexte, la présence et la performance de diverses souches rhizobiennes soumises à un stress de sécheresse ont été signalées (Upadyyay et al. 2009). Bien que les souches rhizobiennes varient en efficacité (Mhadhbi et al. 2008), les rhizobia avec de meilleures caractéristiques adaptatives pourraient aider les légumineuses à faire face à la sécheresse (Yang et al. 2009).

Les rhizobia peuvent influencer la réponse de la plante aux stress hydrique par l'accumulation intracellulaire de solutés organiques et inorganiques, souvent appelés solutés compatibles (Soliman et al. 2012). De nombreuses études ont révélé que les souches rhizobiennes synthétisent des solutés

compatibles tels que le tréhalose, la glycine bêtaïne, la stachydrine, les polyamines, le saccharose, le cellobiose, le maltose, le turanose, le palatinose, le gentiobiose, les acides aminés, et principalement la proline, le glutamate, l'ectoïne, la N-acétylglutaminylglutamine amide, et le diméthylsulfoniopropionate (Pichereau et al.1998; Boncompagni et al.1999; Gouffi et al.1999; Staudinger et al.2016) et lorsqu'il est utilisé comme inoculant, améliore la tolérance à la sécheresse chez les plantes supérieures (Sessitsch et al.2002; Streeter 2003; Zacarias et al.2004). Les plantes peuvent également absorber ces solutés compatibles à partir de sources exogènes, y compris l'association symbiotique plante-rhizobia où les rhizobia synthétisent les solutés de manière excessive (Lopez et al. 2008). Mhadhbi et coll. (2011) ont observé que la souche hautement tolérante *Ensifer meliloti* 4H41 produisait le plus grand nombre de nodules de grandes tailles. Une augmentation similaire de la croissance et de la productivité du haricot commun (Zacarias et al.2004), dans des conditions de stress hydrique dû à l'inoculation avec des rhizobiums produisant un taux élevé de tréhalose (Rasanen et al.2004; Suarez et al.2008). Ainsi, il été suggéré que la surproduction de tréhalose par les rhizobiums aide les légumineuses à se remettre d'une situation de sécheresse.

4.3 Atténuation du stress salin par l'inoculation de rhizobia

Les effets positifs des PGPRs sur la croissance des plantes dans des conditions salines ont été démontrés pour diverses espèces végétales, telles que la tomate, le poivron, le canola, le haricot et la laitue (Barassi et al.2009; Kang et al.2009; Egamberdieva 2009). Les plants de soja stressés par le sel ont vu leur croissance, leur photosynthèse et leur absorption des minéraux diminuer de manière considérable. Cependant, l'inoculation de ces plantes stressées par le sel avec des souches de PGPR ont atténué l'effet du stress de salin (Han et Lee 2005). Ces PGPR comme *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter* et *Bacillus* utilisent l'osmorégulation, le métabolisme oligotrophique endogène, et des processus métaboliques efficaces pour s'adapter dans des environnements salins (Lugtenberg et al.2001; Egamberdiyeva et Islam 2008). Par exemple, *M. cicero*, *M. mediterraneum* et *S. medicae* ont amélioré la nodulation des pois chiches plantés en serre sous 25 mM de NaCl (Mhadhbi et al., 2004). Islam et al., (2013) ont rapporté que certaines souches de rhizobia étaient capables d'augmenter la biomasse végétale, le nombre de nodules et le poids sec des nodules dans une expérience sur le terrain sous 5.5 Ds.m-1.

4.4 Effets synergiques de la co-inoculation des rhizobia

Certaines co-inoculations spécifiques provoquent une synergie en fonctionnant comme des bactéries auxiliaires pour améliorer les performances des autres bactéries. Par conséquent, dans de

telles co-inoculations, la combinaison de bactéries PGP, de rhizobium et du génotype de l'hôte doit être sélectionnée après des évaluations minutieuses (Remans et al. 2007, 2008). Une gamme de microbes PGP peut être utilisée avec les rhizobium pour améliorer non seulement la croissance et le rendement des légumineuses, mais aussi également rentable en termes d'argent. *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Enterobacter* font partie des genres qui sont utilisés avec succès avec le rhizobium comme co-inoculants. Il a été rapporté qu' *Azospirillum* est capable d'améliorer la croissance et le rendement de plusieurs légumineuses lors de l'inoculation (Roseline et al. 2008). Une nodulation améliorée a été trouvée lorsque *A. lipoferum* et *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ont été co-inoculés chez le trèfle blanc (Tchebotar et al. 1998), le pois cajan et le pois chiche (Deanand et al. 2002). De plus, *Azotobacter* s'est avéré être un co-inoculant potentiel avec le rhizobium qui améliorerait la production de phytohormones et de vitamines et augmentait la nodulation (Akhtar et al. 2012; Chandra et Pareek 2002; Dashadi et al. 2011; Qureshi et al. 2009). *Bacillus* sp. a également été signalé qu'elle induisait la capacité de PGP, le rendement (Mishra et al. 2009; Ahmad et al. 2008) et l'absorption de nutriments (Stajkovic et al. 2011), y compris le phosphore (Singh et al. 2011). Une augmentation significative du poids du rendement en racines et en graines de pois chiches a été signalée lors de l'inoculation de *Rhizobium* avec *B. subtilis* OSU-142 et *B. megaterium* M-3 (Elkoca et al. 2008). Une nodulation et une fixation de l'azote améliorée ont été remarquées lors de l'inoculation par *Bacillus* et *Azospirillum* sp. ainsi que des inoculants rhizobium chez le pois cajan (Rajendran et al. 2008; Roseline et al. 2008). Il a été démontré que l'interaction entre *Streptomyces lydius* WYEC108 et *Rhizobium* favorise la croissance du pois (Tokala et al. 2002), y compris le nombre de nodules et la croissance, probablement par la colonisation de *Streptomyces* des racines et des nodules. *Enterobacter* est une autre bactérie PGP qui a augmenté le rendement des nodules lorsqu'il est co-inoculé avec *Bradyrhizobium* sp. (Gupta et al. 1998). Lorsque *R. tropici* CIAT899 a été co-inoculé avec *C. balustinum* Aur9, cela a entraîné une augmentation de la formation de poils sur les racines et des sites d'infection menant au développement précoce de nodules et à une augmentation de la formation de nodules (Estevez et al. 2009). Un résultat similaire a été obtenu lorsque *Medicago truncatula* cv. Caliph a été co-inoculé avec *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 et *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *medicae* WSM419 (Fox et al. 2011).

Parmar et Dadarwall (1999) n'ont également observé que la co-inoculation de *Pseudomonas* et *Bacillus* sp. avec des souches de *Rhizobium* a amélioré le poids des nodules, la longueur des racines, la biomasse des pousses et l'azote total des plantes des pois chiche, lorsqu'ils sont cultivés dans des

pots stérilisés ou dans des conditions de culture en pot. Bien qu'il existe de nombreuses combinaisons de bactéries qui ont été explorées pour l'utilisation, il existe toujours un besoin pour une recherche approfondie et avancée dans le domaine.

5. La phylogénie moléculaire

➤ Généralités

La phylogénie moléculaire est l'étude de la relation évolutionnaire entre les organismes en utilisant les données moléculaires (séquences d'ADN, d'ARN ou de protéines). Zuckerkandl et Pauling (1965) ont proposé la théorie de reconstruction phylogénétique qui considère les macromolécules comme des documents d'histoire évolutionnaire qui pourrait aider à la construction phylogénétique. Ils ont aussi introduit le concept de `` l'horloge moléculaire`` c'est à dire que le changement aléatoire des acides nucléotides et acides aminés se produit à un taux plus ou moins constant, de sorte que le nombre de différences entre les fonctions concernées de deux organismes devraient approximativement être proportionnelle au temps d'évolution passée depuis divergence. L'arbre phylogénétique est un diagramme composé de noeux et de branches avec des noeux connectant chaque branche adjacente. Une branche représente une unité taxonomique qui pourrait être une espèce, population ou un individu. La relation des unités taxonomiques est définie par branche en termes de descendants et ancêtres, ce groupe de branches est connu sous le nom d'arbre topologique (Graur & Li, 2000). Suivant une approche cladistique, seulement le groupe monophylétique dérivé d'un ancêtre commun, devrait former une unité taxonomique comme un genre, tribu, famille, espèce ou sous-espèce (Wink, 2007).

➤ Robustesse de la phylogénie moléculaire

Les données moléculaires, notamment les séquences d'ADN, d'ARN, et d'acides aminés sont plus fiables que les données morphologiques et physiologiques en ce qui concerne les études évolutionnaires. Les données morphologiques peuvent être convergentes et adaptives dans la nature (Wink, 2007), tandis que les données moléculaires sont strictement héréditaires et ont moins tendance à converger.

Les séquences d'AND son relativement résistantes au changement du fait qu'il y a divers systèmes de réparation et de relecture. La description des données moléculaires est simple et définie, tandis que les descriptions morphologiques contiennent toujours des modificateurs ambigus tels que « mince », « réduit », « légèrement allongé », « partiellement fermé » ou « quelque peu aplati ».

De plus, les traits moléculaires évoluent d'une manière plus régulière que les traits physiologiques et morphologiques, ainsi une meilleure résolution peut résulter de l'analyse des séquences d'AND, ARN, et acides aminés. Plusieurs modèles mathématiques et statistiques ont été développés pour l'analyse des données moléculaires (Nei & Kumar, 2000). Enfin, les données moléculaires sont abondantes dans les bases de données publiques et beaucoup plus accessibles que les données morphologiques. Les procaryotes ont très peu de variations morphologiques et physiologiques à utiliser dans les études phylogénétiques (Nei & Kumar, 2000). Les caractères moléculaires susmentionnés sont donc particulièrement importants pour l'étude de la phylogénétique des microorganismes tels que les bactéries et les archées.

5.1 La phylogénie des Rhizobia

Bien que la caractérisation, la classification et l'identification des Rhizobia aient commencé sur la base de la capacité de nodulation et des caractéristiques morphologiques, les analyses des séquences géniques de l'ARNr 16S ont par la suite permis d'éliminer les caractères plasmidiques (nodulation, pouvoir pathogène ou formation de racines poilues) et ont contribué de façon significative à l'identification des non-rhizobia traditionnels. Par conséquent, après la proposition de Woese *et al.* (1984), le séquençage des gènes de l'ARNr 16S est devenu un critère principal de la taxonomie des Rhizobia et la nodulation est devenue secondaire (Rivas *et al.*, 2010).

Les taxonomistes bactériens suggèrent différentes méthodes d'identification des espèces bactériennes. Ces méthodes incluent le séquençage du gène ARNr 16S, le typage par polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP), l'analyse des séquences de différents gènes de ménages qui codent pour des protéines (MLSA), l'analyse de la séquence du génome entier, la spectroscopie infrarouge transformée (FTIR) et spectrométrie de masse par pyrolyse. Cependant, le séquençage des gènes de ménage, le profilage de l'ADN et l'application de puces à ADN sont préférés (Brenner *et al.*, 2008). Il existe également de puissantes techniques basées sur la PCR, telles que REP- et ERIC-PCR, disponibles pour la taxonomie bactérienne, et leur pouvoir discriminant est supérieur aux techniques sérologiques, RFLP et d'électrophorèse multi-locus (MLEE) (Vinuesa *et al.*, 2005). Cependant, pour la description des bactéries nodulantes des racines et des tiges, une norme minimale a été proposée par Graham *et al.* (1992), qui ont suggéré d'utiliser une combinaison de caractéristiques morphologiques et de cultures traditionnelles, de propriétés symbiotiques, de méthodes de séquençage des gènes d'ARNr et hybridation de l'ADN.

5.2 Gènes utilisés pour la phylogénie moléculaire

5.1.1 Gène 16S rRNA

L'utilisation des données des séquences nucléotides du gène 16S rRNA a été adoptée comme étant la plus pratique méthode non seulement pour l'identification mais aussi pour étudier la relation entre les microorganismes à travers le dessin des arbres phylogénétiques. La raison pour laquelle le gène 16S rRNA est utilisée c'est qu'il se trouve chez tous les microorganismes, contient des régions conservées, variables et hypervariables, et il représente une séquence d'à peu près 1500pb (paire de bases) qui reste relativement facile à séquencer (Clarridge, 2004). Cette technique est devenue populaire seulement après le dépôt d'une importante base de données des séquences du gène 16S rRNA et aussi le développement d'amorces très précises et universelles (Das, 2014).

5.1.2 Gènes de nodulation (gènes *nod*)

Les gènes *nod* contrôlent la reconnaissance, l'infection et la nodulation. Les fonctions des protéines codées par les différents gènes *nod* chez certaines espèces de Rhizobia diffèrent d'une espèce à une autre. Les gènes *nod* sont organisés en opérons. Il s'agit des opérons *nodABCIIJ*, *nodFEL*, *nodMNT*, *nodO* et *nodD*. Toutefois, on retrouve des gènes *nod* au niveau du matériel génomique chez quelques espèces de Rhizobia, comme *Bradyrhizobium*.

Le *nodD* est le gène codant de la protéine NodD responsable de l'activation et la régulation de l'expression des autres gènes *nod* tel que le *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodI* et *nodJ* qui jouent un rôle essentiel dans le processus de la nodulation (Davet, 1996). *nodD* est le premier gène transcrit du processus de nodulation. L'expression du gène *nodD* est constitutive. La protéine résultante du gène *nodD* est le récepteur des molécules flavonoïdes excrétées par les plantes. Une fois le complexe "flavonoïdes-NodD" est formé, il se lie au promoteur Nod-Box pour déclencher l'expression des autres gènes *nod*. En effet, ces gènes sont indispensables pour induire la déformation des poils absorbants en forme de crosse et inciter les cellules végétales à se diviser (Gordon, 2001).

Les gènes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodI* et *nodJ* sont communs à tous les Rhizobia et sont conservés chez toutes les espèces des Rhizobia et leurs mutations provoquent une perte complète de la capacité à noduler les plantes hôtes. Les gènes communs *nodABC* déterminent la synthèse de la structure de base commune à tous les facteurs Nod (Denarie *et al.*, 1996). La protéine NodC

catalyse la synthèse du chito-oligomère. L'unité de glucosamine à l'extrémité non réductrice est désacétylée par *nodB*, et substituée par une chaîne d'acide gras par *nodA*. Les gènes *nod* spécifiques modifient le squelette oligo-chitinique à l'aide de substitutions particulières et confèrent aux facteurs Nod leurs spécificités.

Les gènes *nodI* et *nodJ* ont été identifiés chez de nombreux Rhizobia (Fellay *et al.*, 1995 ; van Rhijn et Vanderleyden, 1995). Ces gènes se situent avant le gène *nodC*, codent pour les protéines transport externe NodI et NodJ de la membrane bactérienne lesquelles présentent des homologues dans l'exportation de polysaccharides. Une mutation dans l'un de ces deux gènes se traduit par une diminution importante de la quantité de facteurs Nod (Rosenberg, 1997).

5.1.3 Gènes de fixation d'azote (gènes *nif*)

Les Rhizobia possèdent d'autres gènes intervenant après la formation des nodules. Ils sont plus de 17 gènes organisés en opérons (Dupuy et Nougier, 2005). Les gènes *nif* sont localisés sur les plasmides bactériens et codent pour la synthèse et le fonctionnement d'un complexe enzymatique catalysant la réduction de l'azote et connu sous le nom de Nitrogénase (Hopkins, 2003). Cette enzyme a été mise en évidence uniquement chez les procaryotes. Elle est très conservée chez les bactéries fixatrices d'azote tant au niveau de sa séquence que de sa structure. L'enzyme est constituée de deux métalloprotéines de tailles différentes. La protéine MoFe ou dénitrégénase (245KDa) qui est responsable de la réduction du substrat et la protéine Fe ou dénitrégénase réductase (64KDa), joue le rôle de donneur d'électrons.

L'expression des gènes *nif* dépend d'un activateur de la transcription appelé *nifA* et d'un facteur sigma spécifique produit de *rpoN*, qui reconnaît des sites promoteurs particuliers en amont des opérons *nif* (régulation positive). Il existe aussi une protéine de régulation négative *nifL* qui a une activité antagoniste à celle de *nifA*. elle consiste à inhiber la synthèse des gènes *nif* en condition d'aérobie (Spaink *et al.*, 1998).

5.1.4 Gènes de ménages

Un gène de ménage est un gène qui s'exprime dans tous les types cellulaires et dont les produits assurent les fonctions indispensables à la survie des cellules. Ils ne subissent donc pas de

régulation. Les gènes de ménage forment l'expression des gènes ou l'expression génétique et sont codés dans le chromosome.

De nombreuses études utilisent ces gènes constitutifs en posant l'hypothèse qu'ils ne « bougent » pas. Mais la littérature fait maintenant apparaître que l'expression de ces gènes ménagers peut considérablement varier selon les tissus et les conditions expérimentales.

En effet, les « *housekeeping genes* » présentent habituellement une variation génétique supérieure à celle du gène de l'ARNr 16S et permettent ainsi une classification et une identification plus précise des bactéries. Ces gènes sont donc considérés comme un outil de choix dans les expériences de typage moléculaire afin de permettre la différenciation entre les espèces très proches.

➤ Le gène *rpoB*

Le gène *rpoB*, codant la sous-unité B de l'ARN polymérase, fournit une résolution phylogénétique comparable, en particulier dans l'analyse des isolats étroitement liés avec le gène ARNr 16S, donc il permet de révéler de nouvelles espèces bactériennes et d'affiner l'analyse de la communauté bactérienne.

➤ Le gène *recA*

Le *recA* est un gène qui code pour la protéine Recombinase A qui joue un rôle essentiel dans la réparation et la maintenance de l'ADN. La protéine RecA a un intérêt particulier pour la phylogénie moléculaire en raison de ses propriétés stables (Pleckaityte, 2010). Lloyd and Sharp (1993) ont montré que le RecA représente une bonne alternative pour les études systématiques moléculaires de toutes les bactéries.

➤ Le gène *dnaK*

DnaK empêche l'agrégation des protéines et favorise le repliement des protéines endommagées.

Le gène *dnaK* code une protéine chaperon hautement conservée qui remplit plusieurs fonctions dans la cellule, y compris le repliement des polypeptides naissants, l'assemblage et le désassemblage des structures protéiques multimériques, la translocation membranaire des protéines sécrétées et la dégradation des protéines.

De plus, *DnaK*, l'homologue procaryote de la protéine Hsp70 eucaryote, a été trouvé chez toutes les espèces eubactériennes examinées à ce jour.

➤ Le gène *glnA*

Le gène *glnA* codant pour la glutamine synthétase II, est un autre gène de ménage qui peut être employé dans les études phylogénétiques des rhizobia. Il catalyse la condensation du glutamate et de l'ammoniaque pour former de la glutamine, l'un des acides aminés essentiels (Batista *et al.*, 2013; Behrmann *et al.*, 1990; Chahboune *et al.*, 2012; Menna *et al.*, 2009b).

➤ Le gène *atpD*

Le gène *atpD* code la sous-unité bêta de l'ATP synthase membranaire essentielle à la production d'énergie. C'est un gène omniprésent et conservé, mais il n'y a pas de séquences publiées de rhizobia.

➤ Le gène *dnaJ*

Le *dnaJ* a déjà été utilisé avec succès pour la discrimination d'espèces et de sous-espèces. Son degré élevé de conservation des séquences, de préservation fonctionnelle et de distribution universelle parmi les bactéries sont des caractéristiques clés qui rendent le gène *dnaJ* approprié pour inférer des relations phylogénétiques.

➤ Le gène *gyrB*

Le *gyrB* code pour l'ADN gyrase (Onodera and Sato, 1999). La présence des régions hautement conservées lui confère d'être un outil utile pour désigner des amorces universelles pour l'étude de l'identification bactérienne et de la diversité. La taille du gène est d'approximativement 1.2 kb permettant d'identifier avec succès les variations taxonomiques du groupes α , β - and γ -protéobactéries (Wang *et al.*, 2007).

5.3 Méthode d'analyse phylogénétique

Plusieurs méthodes ont été développées pour construire un arbre phylogénétique à partir d'un ensemble de données mesurées ou observées sur un ensemble d'individus. Ces données peuvent être phénotypiques (caractères morphologiques, physiologiques, etc.) ou génotypiques (séquences

d'ADN ou de protéines). Dans ce présent travail, l'analyse phylogénétique a été essentiellement basée sur les données génotypiques.

➤ *Étapes de l'analyse phylogénétique*

L'analyse phylogénétique des séquences moléculaires nécessite quatre étapes. (1) La sélection des marqueurs moléculaires (gènes à séquencer), (2) l'obtention des séquences à partir des gènes sélectionnés, (3) l'alignements multiples des séquences, et (4) la construction de l'arbre phylogénétique.

➤ *Sélection des marqueurs phylogénétique*

Plusieurs critères sont recherchés dans les marqueurs phylogénétiques. Parmi les marqueurs moléculaires les plus appropriés sont les gènes orthologues à copie unique et cela pour la traçabilité des relations phylogénétiques (Rashid, 2013). Les marqueurs doivent être omniprésents au moins parmi tous les organismes étudiés (Robert *et al.*, 2014). Les marqueurs doivent aussi être hautement conservés, ne présentent pas de déséquilibre de liaison sur le chromosome mais devraient contenir suffisamment de positions de nucléotides variables pour établir avec précision les relations entre souches étroitement apparentées (Robert *et al.*, 2014). Cependant, les marqueurs phylogénétiques avec des régions hautement conservées ne fournissent pas non plus d'informations importantes en raison d'un manque de variation, et les gènes très variables sont sujets à des mutations répétées dans la même position. Par conséquent, les deux sont ignorés pour les analyses phylogénétiques (Chun et Hong, 2010).

➤ *Assemblage des séquences*

Le séquençage de gènes sélectionnés, de fragments d'ADN ou de génomes entiers est important et généralement effectué par un séquenceur. L'ADN et l'ARN peuvent être séquencés en utilisant des approches ciblées ou aléatoires. Dans l'approche ciblée, des gènes spécifiques ou des éléments génétiques sont choisis parmi des unités taxonomiques opérationnelles (UTO), puis amplifiés et séquencés à l'aide d'amorces spécifiques pour obtenir des séquences nucléotidiques. Dans une approche aléatoire, des méthodes de séquençage du génome sont utilisées pour séquencer des régions aléatoires d'ADNc ou d'ADN génomique, et des gènes ou des éléments d'intérêt sont identifiés à partir des séquences obtenues à l'aide d'une recherche informatique. Pour comprendre

l'évolution du génome, le séquençage du génome entier et le séquençage métagénomique ont récemment été introduits.

➤ *Alignements multiples des séquences*

La qualité des données de séquençage et leur alignement sont très importants pour la reconstruction et l'interprétation phylogénétique. Outre la qualité du séquençage, la qualité de l'alignement est également cruciale, car la reconstruction phylogénétique et les conclusions dépendent fortement de l'alignement correct de la séquence (Ludwig, 2010). Des corrélations directes existent entre les erreurs d'alignement et une interprétation phylogénétique inexacte (Kumar & Filipski, 2007).

Dans l'inférence phylogénétique à partir des données de séquence, chaque position de la séquence peut être considérée comme un trait de caractère indépendant. L'alignement est essentiel pour identifier les positions homologues dans les séquences en affectant chaque séquence à une rangée distincte et en organisant les positions homologues dans des colonnes. Un alignement correspond donc à une matrice de données. Chaque colonne dans l'alignement correspond à des traits homologues, et des résidus spécifiques (acides aminés ou nucléotide) représentent les états des caractères (Capellini *et al.*, 2010).

Il est possible d'obtenir un bon alignement des séquences de gènes codant pour des protéines homologues d'espèces proches, car la présence d'une forte pression sélective positive sur les gènes homologues permet à leurs séquences de diverger les unes des autres. Il est beaucoup plus difficile d'obtenir un bon alignement à partir de gènes codant pour des protéines distantes et de gènes comportant de nombreuses insertions et délétions. Différents logiciels sont disponibles pour aligner des séquences en utilisant différents algorithmes pour l'insertion de trous. Bien que des lacunes soient introduites pour augmenter la similarité de séquences, elles ne garantissent pas une correspondance parfaite. L'insertion manuelle et judicieuse des espaces par un spécialiste est donc importante pour un bon alignement. Plusieurs algorithmes sont disponibles pour l'alignement de séquences. Parmi ceux-ci, Clustal-X (Chenna *et al.*, 2003) est largement utilisé en raison de sa capacité à produire facilement des alignements de haute qualité.

➤ *Construction de l'arbre phylogénétique*

Le principal objectif des analyses phylogénétiques est de déterminer les relations évolutives des organismes étudiés, généralement représentées par un arbre phylogénétique. Il existe quatre méthodes différentes pour reconstruire les arbres phylogénétiques : (1) matrice de distance (Distance matrix), (2) parcimonie maximale (Maximum parsimony), (3) vraisemblance maximale (Maximum likelihood) et (4) inférence bayésienne (Bayesian inference).

➤ *Matrice de distance (Distance matrix)*

Les méthodes basées sur la distance utilisent la quantité de dissimilarité (la distance) entre deux séquences alignées pour dériver des arbres. Une méthode de distance reconstruirait le véritable arbre si tous les événements de divergence génétique étaient enregistrés avec précision dans la séquence (Swofford *et al.*, 1996). Cependant, la divergence rencontre une limite supérieure lorsque les séquences sont saturées par mutation. Lorsqu'une séquence d'une paire divergente a muté sur un site particulier, les mutations ultérieures dans l'une ou l'autre séquence ne peuvent plus rendre les sites "différents". En fait, les mutations suivantes peuvent les rétablir, une isoleucine, qui revient à la valine).

Par conséquent, la plupart des méthodes basées sur la distance corrigent ces substitutions "invisibles". En pratique, l'application de la matrice de taux présuppose effectivement qu'une certaine proportion des identités de base paires par paires observées représente en réalité de multiples mutations et que cette proportion augmente avec l'augmentation de la divergence globale des séquences. Certains programmes implémentent, au moins facultativement, le calcul des distances non corrigées, tandis que, par exemple, le programme MEGA (Kumar *et al.*, 1994) ne met en œuvre que des distances non corrigées pour les données de codons et d'acides aminés. À moins que les divergences globales soient très faibles, cette dernière approche est pratiquement garantie de donner des résultats inexacts.

La distance par paires est calculée à l'aide d'estimateurs du maximum de vraisemblance des taux de substitution. Les programmes de création d'arborescences de distance les plus populaires utilisent un nombre limité de modèles de substitution, mais PAUP 4.0 implémente un certain nombre de modèles, notamment le modèle réel estimé à partir des données en utilisant le maximum de vraisemblance, ainsi que la méthode de distance par log-det.

Les méthodes de distance sont beaucoup moins gourmandes en calculs que le maximum de vraisemblance mais peuvent utiliser les mêmes modèles d'évolution de séquence. C'est leur plus gros avantage. L'inconvénient est que les données de caractère réelles sont ignorées. Les méthodes les plus couramment utilisées sont la méthode des groupes de paires non pondérées avec moyenne arithmétique (UPGMA), la jonction entre voisins (NJ) et les méthodes qui optimisent l'additivité d'un arbre de distance, notamment la méthode d'évolution minimale (ME).

Plusieurs méthodes sont disponibles dans plusieurs progiciels phylogénétiques, mais toutes les implémentations ne permettent pas les mêmes spécifications de paramètre et / ou les mêmes fonctionnalités d'optimisation de l'arborescence (par exemple, permutation de branche).

➤ *Parcimonie maximale (Maximum parsimony)*

Parcimonie maximale (MP) : La parcimonie maximale est un critère d'optimisation reposant sur le principe selon lequel la meilleure explication des données est la plus simple, celle qui nécessite le moins d'hypothèses ad hoc. Sur le plan pratique, l'arbre MP est le plus court - celui qui présente le moins de changements - qui, par définition, est également celui qui présente le moins de changements parallèles. Plusieurs variantes de MP diffèrent en ce qui concerne le sens autorisé du changement d'état de caractère (Swofford *et al.*, 1996).

Pour compenser le biais de substitution, MP peut être pondérée, par exemple, la transformation d'une transversion peut être pondérée par rapport à une transition. Pour ce faire, le moyen le plus simple consiste à créer une matrice par étapes de pondération dans laquelle les pondérations sont l'inverse des taux estimés à l'aide de ML, comme décrit ci-dessus. Cependant, la pondération pas à pas peut considérablement ralentir le calcul de la MP.

La méthode MP fonctionne mal lorsque l'hétérogénéité des taux entre les sites est importante (Huelsenbeck, 1995). Il y a peu de bonnes solutions à ce problème. Une approche consiste à modifier l'ensemble de données pour n'inclure que les sites qui présentent une hétérogénéité faible ou nulle, telle que déterminée par l'estimation de vraisemblance. Une autre approche consiste à repérer récursivement les positions en fonction de leur propension à changer comme observé dans les arbres préliminaires. Cette approche des « approximations successives » est automatiquement facilitée par le PAUP, mais elle est sujette aux erreurs dans la mesure où les arbres sont incorrects.

Les analyses MP ont tendance à donner de nombreux (et parfois des milliers d'arbres) qui ont le même score. Étant donné que chacun est considéré comme étant aussi optimal que tout autre, seuls les groupes présents dans le strict consensus de tous les arbres sont considérés comme étant pris en charge par les données. La raison pour laquelle les méthodes de distance et d'arborescence ML tendent à aboutir à un seul meilleur arbre est que leurs calculs impliquent une division et des nombres décimaux, alors que MP ne compte que des étapes discrètes. Pour un ensemble de données, un consensus strict de tous les arbres ME ou ML qui ne sont pas significativement plus mauvais que l'optimum donnerait probablement une résolution plus ou moins comparable au consensus de MP. Malheureusement, alors que les utilisateurs de MP présentent généralement un consensus strict (et parfois un consensus d'arbres d'une ou deux étapes plus mauvaises), les utilisateurs de ME et de ML ne le font généralement pas.

Des études de simulation ont montré que MP ne donne pas de meilleurs résultats que ME et plus mauvais que ML lorsque l'évolution de la séquence depuis la divergence des lignées est beaucoup plus grande que la divergence survenue entre les scissions de lignées entre-nœuds internes) (Huelsenbeck, 1995).

Cette condition produit une "attraction de longue branche"- les branches longues deviennent artificiellement connectées car le nombre de similitudes non homologues accumulées par les séquences dépasse le nombre de similitudes homologues qu'ils ont conservées avec leurs parents les plus proches (Swofford *et al.*, 1996). La pondération des caractères améliore les performances de MP dans ces conditions (Huelsenbeck, 1995).

➤ *Vraisemblance maximale (Maximum likelihood)*

ML renverse le problème phylogénétique. ML recherche le modèle évolutif, y compris l'arbre lui-même, qui présente la probabilité la plus élevée de produire les données observées.

En pratique, ML est dérivée pour chaque position de base dans un alignement. La probabilité est calculée en termes de probabilité que le modèle de variation sur un site soit produit par un processus de substitution particulier, en fonction d'un arbre particulier et des fréquences de base globales observées. La probabilité devient la somme des probabilités de chaque reconstruction possible de substitutions dans un processus de substitution particulier. Les probabilités pour tous les sites sont

multipliées pour donner une 'probabilité de l'arbre' globale (c'est-à-dire la probabilité que les données soient données avec l'arbre et le processus de substitution). Comme on peut l'imaginer, pour un arbre en particulier, la probabilité que les données soient disponibles sur certains sites et manquant sur d'autres. Pour un arbre « bon », de nombreux sites auront une probabilité plus élevée, de sorte que le produit de la probabilité est élevé. Pour un arbre « pauvre », l'inverse sera vrai. Le modèle de substitution doit être optimisé pour s'adapter aux données observées. Par exemple, s'il existe un biais de transition, évident par un nombre démesuré de sites n'incluant que des purines ou des pyrimidines, la probabilité que les données d'un modèle qui suppose un non-biais ne sera jamais aussi bonne que celle-ci. De même, si une proportion substantielle des sites est occupée par une seule base et une autre proportion substantielle ont des fréquences de base égales, la probabilité que les données d'un modèle supposant que tous les sites évoluent de manière égale sera inférieure à celle d'un modèle permettant hétérogénéité. La modification des paramètres de substitution modifie toutefois la probabilité que les données soient associées à des arbres particuliers. Ainsi, l'arbre présentant la probabilité la plus élevée sous un modèle de substitution peut générer une probabilité beaucoup plus faible sous un autre.

Comme ML utilise beaucoup de temps de calcul, il est généralement peu pratique d'effectuer une recherche complète optimisant simultanément le modèle de substitution et l'arborescence d'un ensemble de données. Une approche heuristique économique est recommandée (Adachi et Hasegawa, 1996; Swofford *et al.*, 1996). Le meilleur gain de temps à cet égard est peut-être l'estimation préliminaire du modèle de substitution par ML (telle qu'elle peut être réalisée à l'aide de PAUP). Cette procédure peut être appliquée de manière itérative, en recherchant de meilleurs arbres ML, puis en réestimant les paramètres, puis en recherchant de meilleurs arbres. À mesure que les algorithmes, les ordinateurs et la compréhension phylogénétique se sont améliorés, le critère ML est devenu plus populaire pour l'analyse phylogénétique moléculaire. Dans les études de simulation, ML a constamment surperformé ME et MP lorsque l'analyse des données a été réalisée selon le même modèle que celui utilisé pour générer les données (Huelsenbeck, 1995). ML restera toujours la méthode la plus intensive en calcul, cependant, il y aura donc toujours des situations dans lesquelles ce n'est pas pratique.

➤ *Inférence bayésienne (Bayesian inference).*

La méthode d'inférence bayésienne est intéressante et puissante pour la reconstruction d'arbres phylogénétiques. L'inférence bayésienne est basée sur la notion de probabilités postérieures, ce qui signifie que les probabilités sont estimées à partir d'un modèle (attentes antérieures) après avoir appris quelque chose sur les données. Il génère une distribution de probabilité a posteriori pour un paramètre en fonction des attentes antérieures et de la probabilité que les données soient générées par plusieurs alignements (Hall, 2008). Comme les méthodes MP et ML, elle traite de chaque caractère, nucléotide ou résidu d'acide aminé.

Le progiciel MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) implémente la méthode bayésienne d'inférence phylogénétique. MrBayes utilise le processus MCMC (Monte Carlo Markov Chain) couplé à Metropolis, qui peut être visualisé comme un ensemble de recherches indépendantes échangeant occasionnellement des informations. Ce programme permet une recherche dans des vallées de probabilité qui autrement emprisonneraient la recherche sur une colline sous-optimale. Le produit final est un ensemble d'arbres visités à plusieurs reprises par le programme, qui constituent le sommet de la colline. Bien que cette méthode soit également puissante, la reconstruction des arbres prend beaucoup de temps (Nei & Kumar, 2000).

L'analyse bayésienne est similaire à la méthode ML en ce que l'utilisateur doit postuler un modèle d'évolution (Rannala *et al.*, 1996 ; Mau *et al.*, 1999). Cependant, les analyses ML obtiennent l'arbre qui maximise la probabilité d'observer les données d'un arbre donné, tandis que les analyses bayésiennes recherchent l'arbre maximisant la probabilité d'observer les données et modélisent celui-ci. Plus important encore, les analyses bayésiennes analysent les probabilités en probabilités réelles de sorte que les probabilités pour tous les arbres soient de 1,0 (Nei & Kumar, 2000). En outre, les analyses ML tentent de trouver le meilleur arbre, tandis que les analyses bayésiennes tentent de trouver le meilleur ensemble d'arbres.

6. Objectifs principaux

Le présent travail avait comme principal objectif de mieux comprendre l'association rhizobia-lentilles en termes de choix de partenaires et les facteurs prédominant dans ce choix. Il est rapporté dans plusieurs travaux que la fixation symbiotique chez les légumineuses, entre autres la lentille, est une symbiose de nature très spécifique et, en même temps, est régulée par plusieurs facteurs, à savoir (1) le facteur climatique, (2) le facteur édaphique (texture du sol), (3) le facteur de la diversité

génétique des rhizobia et enfin (4) le facteur de la diversité génétique de la plante hôte. Plusieurs travaux ont montré l'effet des facteurs climatiques et édaphiques sur la diversité de la population rhizobial la légumineuse hôte. Mais, peu de travaux ont montré l'impact de la diversité des génotypes de la plante hôte sur la diversité rhizobial nodulant cette même plante. Afin d'élucider l'effet du facteur du génotype de la plante hôte sur la diversité génétique des rhizobia et sur l'efficacité symbiotique des partenaires, différents génotypes de lentille ont été planté dans le même site expérimentale sous les mêmes conditions climatiques et même condition édaphique. Ainsi, la plante hôte est le seul facteur variable dans le complexe symbiotique Rhizobia-Plante hôte.

Le deuxième objectif de cette présente étude est d'évaluer les traits de la promotion de la croissance des plantes PGPR (Plant Growth promoting Rhizobia) de cette même population de rhizobia et aussi d'évaluer leurs activités PGPRs dans les conditions de stress abiotiques, et cela pour une utilisation plus large comme microflore bénéfique aux légumineuses et non-légumineuses dans les zones arides. Les rhizobia sont un sous-groupe rhizo-bactérien du grand groupe des rhizobacteriacea connu par leur pouvoir de promotion de la croissance des plantes. Les rhizobia sont jusqu'à présent connus par leur habilité à entrer en symbiose avec les légumineuses mais sont peu utilisés comme PGPR pour les autres cultures. Dans le but de valoriser les rhizobia comme PGPRs à être utilisé dans les zones arides, certains caractères de Promotion de la Croissance des plantes ont été évalués (à savoir : l'activité de solubilisation de phosphate, la production des phytohormones (Production de l'acide indole acétique et de l'acide gibbérellique) et la production des sidérophores sous stress abiotiques (le stress hydrique et le stress salin)).

Ainsi, l'étude avait comme principaux objectifs d'évaluer :

- La diversité génétique et l'efficacité symbiotique des rhizobia nodulant différents génotypes de la lentille.
- Certains caractères de Promotion de la Croissance des plantes des rhizobia,
- Leur tolérance à croître dans des conditions de stress hydrique et de stress salin
- Leurs activités PGPRs sous stress hydrique et stress salin.

III. Matériel et méthodes

1. Constitution de la collection des *rhizobia*

➤ *Collecte des nodules*

La collecte des nodules a été réalisée à partir des plantes de 10 accessions différentes de lentille appartenant à la banque de gène d'ICARDA (Tableau 18). Les accessions ont été plantées dans le domaine expérimental de Marchouch à la province de Khemisset région Rabat-Sale-Zemmour-Zaer (Marchouch-Maroc, Latitude : 33.561319, Longitude : -6.69188, Altitude :428 m).

La collecte des nodules a été réalisée en suivant la procédure de Prevost et Antoun (2006). Après la sélection de la plante de lentille, un trou d'environ 15cm de diamètre jusqu'à une profondeur d'au moins 20 cm et creusé autour de la plante en utilisant une bêche. Le bloc de sol avec le système racinaire est retiré soigneusement de la terre. Ensuite, le bloc de sol est immergé dans l'eau ainsi le sol se détache facilement des racines. L'utilisation d'un tamis à maillage approprié, en fonction de la taille du nodule, est utile pour attraper les nodules qui peuvent se détacher de la racine.

Les racines collectées (y compris les nodules) ont été mises dans le sac d'échantillonnage et transportées au laboratoire dans une glacière. Une fois au laboratoire, les nodules frais avec racines ont été mis dans de l'eau distillée stérilisée et laissés s'imbiber pendant 3 jours.

➤ *Conservation et stérilisation des nodules*

Les nodules sont enveloppés dans une serviette en papier stérile puis le tout est imbibé avec une solution de glycérol 50%, placés dans des sacs en plastique et conservés à -20°C. Cette méthode peut garantir la conservation des nodules pendant plus d'une année (Prevost et Antoun, 2006).

La stérilisation des nodules se fait par leur immersion dans de l'éthanol à 95% pendant 5-10 s, puis dans de l'Hypochlorite de Sodium à 5% pendant 3-4 min. les désinfectants sont rincés au moins 5 fois dans de l'eau stérile. Une vérification de la stérilisation des nodules est effectuée en les faisant passer à la surface d'une boîte pétrie contenant le Milieu de culture YAM.

➤ *Isolement des bactéries à partir des nodules*

Les nodules sont broyés avec une tige de verre stérile dans un tube à essai stérile. De l'eau stérile est ajoutée au tube à essai pour préparer une suspension trouble. Une goutte est transférée et étalée sur une boîte pétrie contenant le milieu de culture YAM.

➤ *Purification et conservation des isolats*

Les nodules sénescents peuvent contenir des champignons qui peuvent provoquer une prolifération excessive de champignons sur les boîtes de pétri. Ce problème peut être réduit en ajoutant 20 mg de cycloheximide au Milieu YAM.

Un repiquage successif des les isolats est effectué (prendre une colonie visiblement homogène et la transmettre à une nouvelle boîte pétrie contenant le milieu YMA), et cela jusqu'à ce que l'aspect des colonies devienne homogène.

La conservation des isolats, après purification, a été effectuée selon la méthode de Simione (1995). Une seule colonie a été prélevée d'une boîte pétri fraîchement cultivée et inoculée dans 5 ml de milieu YAM (contenant du cycloheximide (100 mg / L) dans un flacon de culture stérile. Le flacon est ensuite mis sous agitation (150 RPM) pendant 48 heures à 28 ° C (jusqu'à A600 = 1.0).

La suspension bactérienne est centrifugée à une vitesse de 4500 RPM pendant 10 min, le surnageant est retiré et est remplacé par 5 ml de YAM-glycérol (30%) (Dans des conditions stériles). Le mélange est dispatché dans des tubes Eppendorf de cryoconservation (cryotube) stériles de 1.8 ml. Les tubes sont ensuite conservés à -80 ° C.

➤ *Préparation des milieux de cultures*

Le milieu utilisé pour l'isolement des Rhizobia est le Milieu Yeast extract Agar Mannitol (YAM) et dont la composition est (g/L) : Mannitol : 10,0, K₂HPO₄: 0,5, MgSO₄.7H₂O: 0,2, NaCl: 0,1, extrait de levure: 1,0, agar: 15. Ajuster le pH à 7,0 avec 1 M NaOH ou HCl avant d'autoclaver à 121 ° C pendant 20 min.

Pour préparer le Milieu YAM+ Cycloheximide, une solution stock de fongicide est préparée en dissolvant 0,5 g de cycloheximide dans 25 ml d'éthanol à 95% (v/v). 1,2 mL de solution mère de fongicide est ajoutés à 1 litre de YAM refroidi à 50 -55 ° C. Après autoclavage, le milieu est refroidi à 45 ° C puis versé dans des boîtes de Pétri de 20ml.

2. Caractérisation biochimique des isolats

➤ *Coloration Gram*

La coloration de GRAM a été réalisée grâce à un Kit (RAL Diagnostics, Kit Gram-Nicolle) de coloration prêts à l'emploi. La coloration a été effectuée en suivant le protocole du constructeur.

➤ *Test du Rouge Congo*

Les bêta-Rhizobia peuvent être différenciés des bactéries en incorporant du rouge Congo dans le milieu YAM à une concentration de 25 mg mL⁻¹ (Ajouter à chaque Litre du Milieu YAM 10 ml d'une solution mère de 250 mg de rouge Congo dans 100 ml d'eau).

Lorsqu'elles sont incubées dans l'obscurité, les Gamma-Rhizobia montrent peu ou pas d'absorption du rouge Congo, ils forment des colonies qui sont blanches, opaques ou parfois roses, tandis que d'autres bactéries absorbent le colorant rouge et leurs colonies sont rouge foncé. Il y a cependant des exceptions, certaines souches de *Sinorhizobium meliloti* peuvent fortement absorber le colorant. De plus, les α -Rhizobiums absorberont le colorant si les boîtes sont exposées à la lumière pendant une heure ou plus (Somasegaran et Hoben 1994).

➤ *Culture sur milieu YAM + BTB (Bromothymol blue)*

La capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YAM a été évaluée par l'addition de l'indicateur coloré bromothymol bleu à une concentration de 0,0025% (w/v) (0,5g de BTB est mélangé dans 100ml d'éthanol, puis stérilisé par filtration) (Vincent, 1970). La solution est conservée à 4°C. 5ml de la solution est ajoutée dans 1 litre de YAM préalablement stérilisé. La concentration finale du BTB dans le milieu est de 25ppm. Les boîtes inoculées ont été mises en incubation à 28°C pendant 24 heures. Les réactions ont été identifiées par le changement de la coloration du milieu. Une coloration jaune indique une réaction acide et une coloration bleu foncé indique une réaction basique.

➤ *Culture sur milieu LB (Luria-Bertani)*

Selon Garrity *et al.* (2004), les *Rhizobiacea* du genre *Rhizobium leguminosarum* ne croient pas sur le milieu LB (Luria-Bertani) (Atlas., 1983). Les isolats dont la croissance est négative sont considérés comme étant des *Rhizobium* potentiels.

La composition du milieu LB est (g/L) : Casein enzymic hydrolysate : 10,0, Extrait de Levure: 5,0, Sodium chloride 10,0. Ajuster le pH à 7.5±0.2 avec 1 M NaOH ou HCl avant d'autoclaver à 121 °C pendant 20 min.

➤ *Culture sur milieu YAM avec 2% de NaCl*

Les *Rhizobiacea* du genre *Rhizobium leguminosarum* sont très sensibles vis-à-vis du stress salin surtout quand celui-ci dépasse les 2% (Garrity *et al.*, 2004). Les isolats dont la croissance est négative ou à croissance difficile sont considérés comme étant des *Rhizobium* potentiels.

La composition du milieu est (g/l) : 2 g de NaCl est ajouté à 100 ml d'eau distille. La solution est ensuite filtrée par des filtres à diamètre de 0,22 µm. 100 ml de la solution est ajouté à 1L de milieu YAM stérile.

➤ *Test de catalase*

La catalase est une enzyme produite par les microorganismes aérobies pour neutraliser la forme toxique d'oxygène H₂O₂. L'intérêt de ce test est de différencier entre nos souches par la présence ou l'absence de l'enzyme catalase.

Pour cela, une colonie est transférée et étalée sur une lame en verre. Une goutte de H₂O₂ à raison de 3% est déposée sur la colonie. Les isolats catalase positifs montrent une effervescence au niveau du mélange après 5-10 secondes. Alors que les isolats catalase négatif ne montrent aucune réaction d'effervescence.

➤ *Test d'hydrolyse de l'amidon*

Ce test est utilisé pour vérifier la capacité des Microorganismes, en général, à produire l'enzyme extracellulaire alpha-amylase et oligo-1,6-glucosidase qui hydrolyse l'amidon. D'après Garrity *et al.* (2004) les bactéries du genre *Rhizobium* ne dégradent pas l'amidon (Amylases-).

Après 48h d'incubation des isolats sur le milieu Starch Agar, Le réactif bleu d'Iodine est ajouté ainsi pour révéler la présence ou l'absence de l'activité enzymatique. Les isolats ayant gardé les couleurs bleues sont des amylases -. Les isolats avec des zones orange clair autour des bactéries sont des amylases +.

La composition du milieu "Starch Agar" est (g/L) : Mannitol : 5,0, K₂HPO₄ : 0.5, MgSo₄ : 0.2, Extrait de viande : 3, NaCl: 0.1, Amidon: 10, Agar: 18. Ajuster le pH a 6.8 ± 0.2 avec 1 M NaOH ou HCl avant d'autoclaver à 121 ° C pendant 20 min.

Le réactif d'iode est préparé comme suit : Placer dans un mortier 1g d'iode et 2g d'iodure de potassium et les écraser soigneusement avec un pilon. Ajouter ensuite peu à peu 100 ml d'eau distillée.

➤ *Test d'hydrolyse de l'urée (test de l'uréase)*

L'intérêt de ce test est de différencier entre nos souches par rapport à leur capacité à hydrolyser l'urée. Le test de l'uréase a été réalisé par l'incubation des isolats sur le milieu Christensen's liquide, à 28 °C pendant 48 heures.

La composition du milieu Christensen's (g/L) (Murray *et al.*, 2003) : Glucose : 1,0, Peptone : 1,0, KH₂PO₄: 2,0, NaCl: 5,0, Phenol red: 0.012, Agar: 20. Ajuster le pH à 6.8 avec 1 M NaOH ou HCl avant d'autoclaver à 121 °C pendant 20 min.

Dans le milieu de base, 20ml de solution de 20% d'urée est ajouté. La couleur initiale du milieu doit être jaune. Les isolats sont transférés au milieu de culture et incubés à 28 °C pendant 24 heures. La réaction est positive si le milieu devient rouge (l'urée décomposé donne l'ammoniac qui rend le pH basic, ainsi la couleur vire vers le rouge). Il faut noter qu'un faux positif peut résulter de l'hydrolyse des protéines quand l'incubation est prolongée plus de 24 heures.

➤ *Test d'oxydase*

Le test d'oxydase est utilisé pour différencier entre les souches (oxydase +) et (oxydase -). Un colorant dimethyl-p-phenyldiamine hydrochloride donne des électrons pour le cytochrome C et devient oxydé en produisant une couleur violette.

Une colonie bactérienne est déposée sur des disques d'oxydase (Bioanalyse oxydative test discs). Après 45 secondes, les disques prennent une couleur violette pour les bactéries (oxydase +) ou restent blancs pour les (oxydases -).

➤ *Test du Crystal violet*

Le test du Crystal violet permet de distinguer entre les bactéries en se basant sur leur type de Gram (+/-). Pour cela, 2 µg/litre de Crystal violet est ajouté dans le milieu de culture YAM. La croissance des isolats sur ce milieu indique que leur paroi est GRAM NEGATIVE.

3. Analyse binaire des profils biochimiques des isolats

Les résultats des tests biochimiques ont été traités par le logiciel *DARwin6*. Une analyse binaire du profil biochimique de chaque isolat a été faite ainsi pour étudier la ressemblance des isolats entre eux. La souche *Rhizobium* sp. CIAT899 a été considérée comme souche de référence dans cette étude. Dix variables, dont chaque variable représente un test biochimique, ont été traités par l'indice

de dissimilarité non allélique (*Présence/Absence*) ou *Présence = Test+* et *Absence = test-*. Le résultat du traitement des profils biochimiques est présenté sous forme d'arbre phylogénique construit par le même logiciel.

4. Caractérisation moléculaire des isolats

4.1 Extraction de l'ADN bactérien

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont connues par leur habilité à produire une grande quantité d'exo-polysaccharides (EPS) dans le milieu de culture durant leur croissance (Tayeb et Khodair, 2006, Sayyed *et al.*, 2011). Cependant, l'extraction de l'ADN de bonne qualité et à quantité acceptable à partir de cette matrice devient très difficile, voire impossible (Moore *et al.*, 1999). De ce fait, il est recommandé de préparer les isolats sur milieu R2A et les incuber à 28 °C pendant 48 heures.

La composition du milieu R2A en (g/L) (Eaton *et al.*, 1995) : Extrait de levure : 0.5, Peptone : 0.5, Casamino Acids: 0.5, Dextrose: 0.5, Amidon Soluble: 0.5, Sodium Pyruvate: 0.3 g, Phosphate Dipotassium: 0.3, sulfate Magnesium: 0.05, Agar: 15.0 g. Ajuster le pH à 7.0 ± 0.2 avec 1 M NaOH ou HCl avant d'autoclaver à 121 °C pendant 20 min.

L'ADN a été extrait suivant la méthode d'Ausubel *et al.* (1987) en utilisant la digestion SDS/CTAB et l'extraction phenol/chloroform. Le protocole utilisé a été développé et optimisé par Edward Moore *et al.*, (1999).

Une quantité d'à peu près 0.1g de colonies bactériennes est prélevée et suspendue dans 564ul TE buffer. 10 µg de lysozyme est ajouté à la suspension, le tout est mélangé en inversant le tube Eppendorf plusieurs fois puis incubé à 37 °C pendant 10–60 minutes. 6 µl de Proteinase K (10 mg/ml), et 30 µl SDS (10–20%) est ajouté. Le tout est mélangé en inversant le tube Eppendorf est incubé à 37 °C jusqu'à ce que le mélange devienne claire et visqueux. 100 µl de NaCl (5 M) est ajouté et incubé à 65 °C pendant 2 minutes. 80 µl de solution CTAB/NaCl est ajouté, mélangé minutieusement puis la suspension est incubée à 65°C pendant 10 minutes. La suspension est extraite par 800 µl de solution de chloroform/isoamyl alcohol (24 :1). La suspension est centrifugée (10,000 ×g, 5 minutes) puis le surnageant est transféré à un nouveau tube Eppendorf. La même étape est refaite deux autres fois puis le tout est centrifugé à (15,000 × g, 5 minutes). 560 ul d'isopropanol est ajouté à la suspension pour la précipitation des acides nucléiques. La suspension est mélangée plusieurs fois puis laisser à la température ambiante pendant 5 minutes à 1 heure. La suspension est centrifugée (12,000–15,000×g 15–30 minutes) à température ambiante. 500 µl

d`éthanol (70%) est ajouté et le tout est mélangé plusieurs fois puis centrifugé ($12,000\text{--}15,000 \times g$, 15–30 minutes) à température ambiante. L`éthanol est retiré en renversant les tubes Eppendorf sur du papier absorbant puis asséché à la température ambiante. L`ADN extrait est dissous dans 50–60 μl de TE. La concentration de l`ADN est estimée par spectrophotométrie à une longueur d`onde de 260 nm en utilisant le Nano-drop (Jenway, genova nano). La qualité de l`ADN est mesurée par les rapports A260/A280 et A260/A230 (Rodriguez et al., 1983).

Préparation des solutions tampon : Tampon d`extraction CTAB : 1% CTAB, 1,4M NaCl, 100mM Tris pH 8, 20 mM EDTA. Tampon d`extraction TE : 1mM EDTA, 10Mm Tris HCl pH 8.0. Tampon de Lysozyme : 25Mm Tris HCl, 2,5Mm EDTA, 1% Triton $\times 100$.

4.2 Amplification par PCR des gènes symbiotiques et de ménages

➤ *Les amorces*

Plusieurs gènes de ménages et gènes symbiotiques ont été ciblés pour une amplification par PCR. Ces gènes sont la sous-unité ribosomique (16S rRNA), l`ATP synthase beta-sous unité (*atpD*), la glutamine synthase II (*glnA*), l`ADN recombinase A (*recA*), le gène producteur de la protéine chaperonne (*dnaK*), le gène codant pour la β sous-unité de l`ARN polymérase (*rpoB*), le gène producteur de la protéine chaperonne (*dnaJ*), le gène codant pour la protéine nodulante A acyl transférase (*nodA*), Le gène régulateur (*nodD*) et le gène codant pour la protéine N-acetylglucosaminyltransférase (*nodC*). La majorité des amorces utilisées ont été testées et confirmées dans des études précédentes. Les amorces ont été fabriquées par la société Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) et la société Biologio. Toutes les amorces ont été reçues sous forme lyophilisée et ont été reconstituées à une concentration de 100 μM à l`aide d`une solution Tampon TE. La solution stock est diluée 10 fois et dispatchée dans des aliquotes de 100 μl d`une concentration finale de 10 μM . Les amorces sont conservées à $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Les séquences des amorces et leur source sont indiquées dans le tableau ci-dessous (Tableaux 4 et 5).

Tableau 4. Amorces pour l'amplification des gènes de maintien.

Gènes cibles	Amorces	Séquences	Taille du fragment amplifié (pb)	Fabricants	Références
<i>16S rRNA</i>	16S 27F 16S 1492R	3`-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-5` 3`-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-5`	1500	Biologio	(Turner <i>et al.</i> 1999)
<i>dnaK</i>	DnaK1468F DnaK1772R	3`-AAG GAGCAGCAGATCCGCATCCA-5` 3`-GTACATGGCCTCGCCGAGCTTCA-5`	330	Invitrogen	(Stepkowski <i>et al.</i> 2003)
<i>recA</i>	recAF recAR	3`-ATCGAGCGGTCGTTCCGCAAGGG-5` 3`-TTGCGCAGCGCCTGGCTCAT-5`	1059	Invitrogen	(Gaunt <i>et al.</i> 2001)
<i>gyrB</i>	gyrB343F gyrB1043	3`-TTCGACCAGAAYTCTAYAAGG-5` 3`-AGCTTGTCTTSGTCTGCG-5`	960	Invitrogen	(Martens <i>et al.</i> 2008)
<i>rpoB</i>	rpoB83F rpoB1061R	3`-CCTSATCGAGGTTACAGAAAGGC-5` 3`-AGCGTGTGCGGATATAGGCG-5`	305	Invitrogen	(Martens <i>et al.</i> 2008)
<i>glnA</i>	glnA532F glnA1124R	3`-AAGGGCGGCTAYTTCCCG GT-5` 3`-GTCGAGACCGGCCATCAGCA-5`	660	Invitrogen	(Turner and Young, 2000)
<i>dnaJ</i>	dnaJF dnaJR	3`-CAGATCGAGGTSACCTTCGAC-5` 3`-CGTCRYCATMGAGATCGGCAC-5`	1131	Invitrogen	(Alexandre <i>et al.</i> 2008)
<i>dnaK</i>	DnaK1468F DnaK1772R	3`-AAG GAGCAGCAGATCCGCATCCA-5` 3`-GTACATGGCCTCGCCGAGCTTCA-5`	1917	Invitrogen	(Stepkowski <i>et al.</i> 2003)
<i>atpD</i>	atpDF atpDR	3`-ATCGGCGAGCCGGTCGACGA-5` 3`-GCCGACACTTCCGAACCNGCCTG-5`	828	Invitrogen	(Gaunt <i>et al.</i> 2001)

H = Adenine, Cytosine or Thymine, I = Inosine, N= Adenine, Cytosine, Guanine or Thymine, Y = Cytosine or Thymine.

Tableau 5. Amorces pour l'amplification des gènes symbiotiques.

Gènes cibles	Amorces	Séquences	Taille du fragment amplifié (pb)	Fabricants	Références
<i>nodA</i>	nodAF nodCAR	3`-TGCRGTGGAARNTRNNCTGGGAAA-5` 3`-GNCCGTCRTCRAAWGTCARGTA-5`	660	Biolegio	Haukka et al. (1998)
<i>nodA</i>	nodA-3 nodA-4	3`-TCA TAG CTC YGR ACC GTTCCG-5` ATC ATC KYN CCG GNN GGC CA-5`	660	Biolegio	Zhang et al. (2000)
<i>nodC</i>	nodCF4 nodCI	3`-AYGTHGTYGACGGATC-5` 3`-CGYGACAGCCANTCKCTATTG-5`	900	Biolegio	Laguerre et al. (2001)
<i>nodD</i>	Y5 Y6	3`-ATGCGKTTYARRGGMCTN GAT CT 3`-CGCAWCCANATRTTYCCNGGRTC	900	Biolegio	Haukka et al. (1998)
<i>nif-H</i>	nifH-F nifH-I	3`-TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA-5` 3`-AGCATGTCYTCAGYTCNTCCA-5`	780	Biolegio	Laguerre et al. (2001)

H = Adenine, Cytosine or Thymine, I = Inosine, N= Adenine, Cytosine, Guanine or Thymine, Y = Cytosine or Thymine.

L'amplification des gènes étudiés a été réalisée par PCR (Polymerase Chain Reaction) pour un séquençage ultérieur. Toutes les réactions PCR ont été effectuées grâce au thermocycleur (MultiGene optiMAX, Labnet). Le mélange réactionnel de l'amplification PCR a été réalisé suivant les données indiquées dans le tableau 6. Toutes les réactions PCR ont été effectuées par un Master Mix préalablement optimisé par le constructeur (MyTaq Mix, Bioline). La température d'hybridation (T_m) de toutes les amorces a été optimisée en se basant sur la température proposée par le constructeur et par la bibliographie (Tableaux 4 et 5). Les programmes PCR de tous les gènes amplifiés sont indiqués dans les tableaux ci-dessous (Tableaux 7-17).

Tableau 6. Les concentrations utilisées du mélange réactionnel de toutes les réactions PCR.

Composé	Volume/réaction	Concentration initiale
MyTaq Mix, 2x	12,5µl	5U My Taq ADN polymerase 2 x Tampon PCR contenant 3mM de MgCl ₂ 400µM de chaque dNTP
Amorce Forward	1µl	0,1 – 0,5µM
Amorce Reverse	1µl	0,1 – 0,5 µM
Matrice d'ADN	1µl	ADN (10-20ng/µl)
Eau ultrapure sterile	9,5µl	
Volume totale	25µl	

➤ *Amplification de l'16S rDNA*

Tableau 7. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène 16S rDNA.

Étapes	Temps	Température
Activation initiale	5 min	95°C
Cycles selon 3 étapes:		
Dénaturation:	0,45min	95°C
Hybridation:	0,45min	50°C
Elongation:	2min	72°C
Nombre de cycles: 30		
Extension finale	10min	72°C

➤ *Amplification du glnA*

Tableau 8. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *glnA*.

Étapes	Temps	Température
Activation initiale	5 min	95°C
Cycles selon 3 étapes:		
Dénaturation:	0,45min	95°C
Hybridation:	0,45min	52°C
Elongation:	0,40min	72°C
Nombre de cycles: 35		
Extension finale	7min	72°C

➤ *Amplification du recA*

Tableau 9. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *recA*.

Étapes	Temps	Température
Activation initiale	5 min	95°C
Cycles selon 3 étapes:		
Dénaturation:	0,45min	95°C
Hybridation:	0,60min	53°C
Elongation:	0,40min	72°C
Nombre de cycles: 35		
Extension finale	7min	72°C

➤ *Amplification du dnaK*

Tableau 10. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *dnaK*.

Étapes	Temps	Température
Activation initiale	5 min	95°C
Cycles selon 3 étapes:		
Dénaturation:	0,45min	94°C
Hybridation:	0,50min	54°C
Elongation:	1min	72°C
Nombre de cycles: 30		
Extension finale	7min	72°C

➤ *Amplification du rpoB*

Tableau 11. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *rpoB*.

Étapes	Temps	Température
Activation initiale	5 min	95°C
Cycles selon 3 étapes:		
Dénaturation:	0,45min	94°C
Hybridation:	0,45min	50°C
Elongation:	2min	72°C
Nombre de cycles: 30		
Extension finale	10min	72°C

➤ *Amplification du dnaJ*

Tableau 12. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *dnaJ*.

Étapes	Temps	Température
Activation initiale	15 min	95°C
Cycles selon 3 étapes:		
Dénaturation:	0,45min	94°C
Hybridation:	0,45min	50°C
Elongation:	2min	72°C
Nombre de cycles: 30		
Extension finale	10min	72°C

➤ *Amplification d'atpD*

Tableau 13. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *atpD*.

Étapes	Temps	Température
Activation initiale	5 min	95°C
Cycles selon 3 étapes:		
Dénaturation:	0,45min	94°C
Hybridation:	0,60min	55°C
Elongation:	2 min	72°C
Nombre de cycles: 30		
Extension finale	7 min	72°C

➤ *Amplification du nodD*

Tableau 14. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *nodD*

Étape	Temps	Température
Activation initiale	2 min	94°C
Cycles selon 3 étapes:		
Dénaturation:	1 min	93°C
Hybridation:	1 min	58°C
Elongation:	2 min	72°C
Nombre de cycles: 30		
Extension finale	7 min	72°C

➤ *Amplification du nodA*

Tableau 15. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *nodA*.

Étapes	Temps	Température
Activation initiale	4 min	95°C
Cycles selon 3 étapes:		
Dénaturation:	0,45 min	95°C
Hybridation:	1 min	50°C
Elongation:	2 min	72°C
Nombre de cycles: 30		
Extension finale	7 min	72°C

➤ *Amplification du nodC*

Tableau 16. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *nodC*.

Étapes	Temps	Température
Activation initiale	3 min	95°C
Cycles selon 3 étapes:		
Dénaturation:	1 min	94°C
Hybridation:	1 min	52°C
Elongation:	3 min	72°C
Nombre de cycles: 35		
Extension finale	7 min	72°C

➤ *Amplification du nif-H*

Tableau 17. Le programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification du gène *nif-H*.

Étapes	Temps	Température
Activation initiale	2 min	93°C
Cycles selon 3 étapes:		
Dénaturation:	0,45 min	93°C
Hybridation:	1 min	59,5°C
Elongation:	2 min	72°C
Nombre de cycles: 35		
Extension finale	5 min	72°C

➤ *Système électrophorèse*

La qualité de l'ADN total extrait à partir des isolats a été vérifiée par gel électrophorèse. 10 µl de l'ADN extrait + 2 µl de tampon de charge avec colorant (EZ-Vision, AMRESCO) sont déposés sur gel d'agarose à concentration de 0,8% préparé à base de Tampon TE. La migration des gènes a été à 180V pendant 30 Min.

Les produits PCR ont été révélés sur gels d'agarose à 1%. 7 µL de produit PCR + 2 µl de tampon de charge avec colorant (EZ-Vision, AMRESCO) sont déposés sur gel d'agarose à concentration de 0,8 à 180V pendant 30 Min. Un marqueur de taille de 200-10037pb est utilisé pour déterminer la taille des bandes des produits PCR. Les gels sont visualisés sous un système d'imagerie à lumière UV (Enduro GDS, Labnet). Les images sont capturées à l'aide du logiciel *Enduro GDS*.

Dans le cas de l'utilisation des amorces dégénérées dans le Mélange PCR. La plupart de temps, des multi-bandes sont régénérée même aux conditions optimales de température d'hybridation (T_m). Pour récupérer la bande du gène ciblé, une extraction de la bande correspondante à la taille du gène ciblé est réalisée. L'extraction des bandes amplifiées a été effectuée en utilisant le kit d'extraction (PureLink, Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen). L'isolement et l'extraction des bandes ont été réalisés en suivant le protocole du constructeur.

5. Séquençages des produits PCR

Le séquençage de l'AND génomique implique la détermination séquentielle des bases nucléotides (adenine, guanine, cytosine and thymine) (Howieson, 2016). La méthode des variations de la terminaison de chaîne d'origine (méthode Sanger) utilisant les dideoxynucleotide triphosphates (ddNTPs) radioactives ou fluorescents pour la détection automatique des séquences est le choix le plus populaire en ce qui concerne le séquençage partiel. Le séquenceur utilise l'électrophorèse capillaire pour la séparation, la détection et l'enregistrement de la fluorescence. En effet, chacun des quatre ddNTPs terminaux est marqué par une coloration fluorescente (Smith *et al.*, 1986). Cependant, cette technologie ne peut pas dépasser un séquençage de plus de 700–900 bp (Howieson, 2016). Vue cette limitation, il est recommandé que le séquençage se produit des deux sens opposés de chaque gène étudié ainsi pour avoir la séquence totale, tel est le cas du gène *16Sr RNA* (Howieson, 2016).

Les produits PCR ont été purifiés à l'aide du système de purification ExoSAP-IT (réactif de nettoyage, Invitrogen) conformément au protocole du fabricant. Le séquençage a été effectué à

l'aide du kit de séquençage de cycle Bigdye Terminator V3.1 (Applied Biosystems) dans les deux sens, avec les mêmes amorces que celles utilisées pour la PCR. Les données de séquence ont été recueillies à partir d'un séquenceur de capillaires à ADN ABI 3730XL (Applied Biosystems, France) au centre de recherche (NeoBiotech, France). Les séquences nucléotidiques obtenues ont été déterminées sur le site Web NCBI (Centre national d'information sur la biotechnologie).

6. Analyse phylogénétique des séquences

Pour l'analyse phylogénétique, les séquences nucléotidiques des souches apparentées pour chaque gène analysé ont été extraites de la GenBank (NCBI) et alignées à l'aide du programme ClustalW du logiciel MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Une fois alignés, les arbres de vraisemblance maximale (Maximum Likelihood) ont été construits à l'aide du logiciel MEGA X (Felsenstein, 1981) avec le meilleur modèle suggéré. La signification statistique des nœuds a été évaluée par analyse de rééchantillonnage par bootstrap (1000 répliques) (Kumar *et al.*, 2018).

L'évaluation de l'existence d'une congruence topologique entre les arbres a été réalisée à l'aide du calcul en ligne de l'indice de congruence *Icong* (De Vienne, 2007). Le calcul de similarité de séquence intergénique/intragénique a été effectué avec l'outil SIAS (Identité de séquence et similarité) (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias>) en utilisant la méthode de la matrice de score d'alignement BLOSUM62 (Eddy, 2004). Les propriétés des locus ont été étudiées avec MegaX en calculant différents paramètres d'analyse statistique, notamment le test de distance de composition moyenne, le test de moyenne d'indice de disparité, les sites variables (%), la teneur moyenne en G + C (% molaire), le test de transition / conversion et la distance par paire.

Pour l'analyse des séquences des multi-locus (MLSA), un arbre de vraisemblance maximale (Maximum Likelihood) a été construit en utilisant des séquences concaténées des gènes sélectionnés (*16S-rpoB-recA-gyrB*). Les séquences d'isolats ont été comparées à neuf références de *Rhizobium* : *Rhizobium acidisoli* souche FH13, *Rhizobium laguerreae* souche ES8, *Rhizobium leucaenae* souche CCGE523, *Rhizobium pisi* souche DSM30132, *Rhizobium anhuiense* souche CCBAU 23252, *Rhizobium etli* souche NBRC15573, *Rhizobium gallicum* souche R602, *Rhizobium leguminosarum* souche NGB-FR-151 and *Rhizobium multihospitium* souche CCBAU83401.

7. Test d'authentification

➤ *Prégermination des graines de lentille stérilisées*

Trois différentes variétés de lentille ont été choisies pour cette étude, **Bakria**, **Chakkouf** et **Zaria**. Les trois variétés sont parmi les variétés améliorées les plus répandues et utilisées au MAROC. Chacune des variétés est choisie selon différents critères. **Bakria** est une variété précoce considérée comme étant tolérante aux stress abiotiques et à la maladie de la rouille causée par le champignon pathogène *Uromyces* (Sarker et Kumar, 2011). **Chakkouf**, variété connue par ses larges grains jaunes, est résistante à la rouille, et *Ascochyta blight*, et tolérante au stress hydrique (Idrissi *et al.*, 2012). **Zaria** est une variété appréciée du fait qu'elle est récoltable par machine (Kumar, 2013).

La surface des graines de chaque variété a été stérilisée en suivant le protocole décrit par Howieson et Dilworth (2016). Les graines sont stérilisées essentiellement pour éviter toute sorte de contamination potentielle par des souches Rhizobiennes externes. Les graines ont été lavées plusieurs fois avec de l'eau de robinet pour alléger la charge microbienne sur la surface. Les graines ensuite sont trempées dans une solution d'Ethanol 70% et sont laissées pendant 30 à 60 s avec agitation, puis rincées 5 fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines ensuite sont trempées dans de l'hypochlorite de sodium (5%) pendant 2 minutes avec agitation, puis rincées de nouveau 5 fois par de l'eau distillée stérile. Finalement, les graines sont trempées dans l'eau distillée stérile pendant 30 à 60 minutes et laissées sécher sur papier wattman stérile sous hotte laminaire.

La prégermination est effectuée par la mise des graines stérilisées dans des boîtes pétri stériles contenant du papier wattman stérile imbibé d'eau distillée stérile. Le tout est incubé à 25 °C pendant 2 jours à l'obscurité.

➤ *Stérilisation du sol et des pots*

Le sol a été mis dans des sacs en plastique autoclavable. Les sacs sont autoclavés deux fois en alternance avec 1 jour d'intervalle entre chaque cycle d'autoclavage. Le cycle d'autoclavage est de 30 minutes à 131 °C. Des pots en polyéthylène de (25 cm de diamètre × 50 cm de hauteur) ont été stérilisés avec une solution d'hypochlorite de sodium à 20% et rempli avec 1 Kg de sol stérilisé.

➤ *Préparation de la suspension bactérienne*

Des cultures pures de chaque isolat ont été cultivées dans du YAM liquide est incubées à 28 °C pendant 48 heures et ajustées à une concentration finale de (D.O= 0,5 ≈ 10⁸ UFC.ml⁻¹) dans du milieu YAM liquide (25 %).

➤ *Culture dans les pots*

Trois graines ont été semées aseptiquement dans chaque pot (une graine de chaque variété). Chaque graine a été inoculée par 1ml de culture bactérienne préalablement préparé avec trois répétitions pour chaque couple hôte-symbionte. Trois pots de chaque variété ont été inoculés par 1ml de milieu de culture YAM stérile. Ces 3 pots ont été considérés comme pots témoin. Les pots sont placés aléatoirement sur une plate-forme dans une serre à condition contrôlée sous une température entre 25/22 °C et une photopériode de 16 heures lumière/ 8 heures obscurité. Les pots ont été irrigués 2 fois par semaine avec une solution nutritive sans azote (Broughton and Dilworth, 1970) (Tableau 19).

Tableau 18. Composition de la solution nutritive dépourvue d'azote (Broughton and Dilworth, 1970).

Solution stock	Eléments chimiques	g/litre
1	CaCl ₂ • 2H ₂ O	294.1
2	KH ₂ PO ₄	136.1
3	FeSO ₄ • 7H ₂ O	6.7
	MgSO • 7H ₂ O	123.3
	K ₂ SO ₄	87.0
	MnSO • H ₂ O	0.338
4	H ₃ B ₃ O ₆	0.247
	ZnSO • 7H ₂ O	0.288
	CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.100
	CoSO • 7H ₂ O/	0.056
	Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.048

Quatre solutions stocks sont préparées suivant les concentrations des éléments chimiques indiquées au tableau 18. Pour la préparation de 10 litres de solution nutritive, 5 ml de chaque solution est ajouté dans 5 litres d'eau. Puis le tout est dilué jusqu'à un volume de 10 litres. Le pH est ajusté à 6.6-6.8 avec NaOH (1N).

8. Détermination de l'efficience symbiotique des isolats.

Les plantes de lentille ont été récoltées après 1 mois de l'inoculation bactérienne. Plusieurs paramètres ont été pris en compte pour mesurer la promotion de la croissance des variétés de lentille par les isolats utilisés. En effet, chaque plante a été déterrée et lavée au niveau des racines pour inspecter la présence/absence et le nombre de nodules. Des mesures de la taille et du poids secs des racines et tiges ont été effectuées. La taille de la plante est mesurée du collet jusqu'à l'extrémité

apicale et est exprimée en cm (Gholami *et al.*, 2012). Les poids secs des racines et des tiges sont mesurés après séchage dans l'étuve à 65 °C pendant 48 heures (Gholami *et al.*, 2012). Le dosage de l'azote totale foliaire et du sol post-cultural a été effectué suivant la méthode de Kjeldahl Bradstreet (1954), suivi d'un dosage par spectrophotométrie (T 80 UV/VIS spectromètre, PGInstrument) (Horneck et Miller, 1998).

Pour la digestion, les échantillons sont broyés avec un mortier : 0.3g de la plante/sol est mesuré et mis dans des tubes de digestion. Dans chaque block de digestion, 2.5ml de la mixture de la digestion est ajouté à l'aide d'une pipette sérologique, puis ajouté jusqu'à ce que le matériel de la plante devienne humide. Le matériel est laissé dans cet état pendant une nuit dans les tubes de digestion. Le jour d'après, les tubes de digestion sont chauffés à 100 °C pendant 2 heures dans le bloc de digestion, puis laissés se refroidir. 1ml d'H₂O₂ (30%) est ajouté doucement et soigneusement avec une douce agitation. Les deux dernières étapes sont répétées 2 fois. Les tubes sont remis une autre fois dans le bloc de digestion et sont incubés à 30 °C pendant 2 heures. A la fin la couleur du mélange devient jaune-claire et sans résidus. Les tubes sont laissés se refroidir.

Les réactifs pour la digestion sont :

3.5g de sélénium poudre est ajouté soigneusement dans 1 litre de l'acide sulfurique concentré (95 à 97%). La couleur de l'échantillon à ce stade est noir-foncée. Le mélange a été chauffé à 300 °C pendant 5 heures jusqu'à ce que la couleur de la solution devienne jaune claire en passant par les couleurs bleue et verte. Après refroidissement de la solution, 10.8g de l'acide salicylique poudre est ajouté à la solution puis agité en inversant et ré-inversant la bouteille. Cette solution est appelée mixture de la digestion et elle est stable seulement pendant 48 heures.

Pour le dosage de l'azote totale des échantillons par spectrophotométrie, les produits de la digestion sont dilués 50 fois par de l'eau distillée 1ml/50ml. 5.5 ml de du tampon T est ajouté à 1 ml de produit de la digestion dilué dans un tube, puis le mélange est vortexé. 4 ml de la solution Na salicylate-Na nitroprusside est ajouté au mélange précédent puis vortexé de nouveau. 2ml de la solution Na hypochlorite est ajouté puis le tout est mélangé soigneusement. Les produits finaux sont incubés en bain marie à 37 °C pendant 15 minutes.

Une gamme d'étalonnage a été préparée pour la mesure de l'azote : 4.715g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ poudre est dissous dans 1 L d'eau distillée pour préparer un stock qui contient 1000 mg N/L. Des solutions qui contiennent des concentrations de 5 mg, 10 mg 15 mg 30 mg 50 mg sont préparées à partir de de la solution 1000mg N/L. La gamme d'étalonnage et les produits ont été mesurés par spectrophotométrie sur une longueur d'onde de 650 nm. Le logiciel Excel est utilisé pour tracer la courbe de la gamme d'étalonnage.

Les réactifs du dosage de l'azote total sont :

Tampon T (0.1 M Na_2HPO_4 , 5% Na-K tartrate, 5, 4% NaOH) : 26.8g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a été dissous dans 600ml de solution d'ammonium libre. Puis 50g de Na-K Tartrate et 108g de solution de NaOH 50% w /w sont ajoutés, et le tout a été ramené à 1 L par de l'eau distillée.

Solution de Na salicylate-Na nitroprusside (15M – 0.03%): 150g de Na salicylate et 0.30g de Na nitroprusside est dissous dans 1 L d'eau distillée. Cette solution est conservée à l'abri de la lumière dans une bouteille intransparente.

La Solution de Na hypochlorite 5.25% : 6 ml de Na hypochlorite est diluée dans 100ml d'eau distillée.

9. Viabilité des souches *Rhizobium* aux stressés abiotiques

➤ Croissance bactérienne

L'étude de la croissance bactérienne a été réalisée suivant la méthode de Hilali *et al.* (1996). Dans cette étude, *Rhizobium* sp. Souche CIAT988 a été considérée comme souche de référence. Une culture de 12h de *Rhizobium* CIAT899 est réalisée dans le milieu BIII (Dazzo, 1984). La culture est diluée dans le milieu YMA stérile à raison de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32. Des suspensions dilutions de 10^{-1} à 10^{-9} ont été réalisées dans le Milieu YAM liquide (25%) pour chaque solution bactérienne préalablement diluée et puis étalée sur boîtes du milieu YMA. Le comptage des colonies permet de déterminer le nombre de bactéries en UFC (Unités Formant Colonie) pour chaque solution diluée. La densité optique est déterminée à la longueur d'onde de 600nm.

Cette méthode détermine la concentration en (UFC) correspondante à chaque D.O en utilisant

l'équation du facteur de croissance suivante :
$$Fc = \frac{UFC}{DO}$$

Composition du Milieu BIII (Dazzo, 1984) g/l : Mannitol : 10, K₂HPO₄ : 0.23, Sulfate de Magnésium (MgSO₄ 7H₂O) : 0.10, Glutamate de Na : 1.10. Solution stock de vitamine : 1 ml, stock d'oligoéléments : 1 ml.

Solution stock de vitamines (mg/l de tampon Na₂HPO₄, 0,05 M, pH 7,0) : Riboflavine : 20, Acide para-amino-benzoïque: 20, Acide nicotinique: 20, Biotine: 20, Thiamine-HCl: 20, Pyridoxine-HCl: 20, Panthotenate de Ca: 20, Inositol: 120.

Solution stock d'oligoélément (g/l): CaCl₂: 5, H₃BO₃: 0.145, FeSO₄. 7 H₂O: 0.125, CoSO₄. 7 H₂O: 0.070.

➤ *Préparation de la suspension bactérienne*

Des cultures pures des isolats étudiés ont été cultivées dans du YAM liquide à 28 °C jusqu'à atteindre une D.O= 0,5 ≈10⁸ UFC/ml.

9.1 Viabilité des souches Rhizobium au stress Hydrique

Le stress hydrique a été simulé en utilisant le PEG (polyéthylène glycol) comme molécule à fort potentiel osmotique (B. Michel et E. Merrill 1973). Le milieu BIII (F. Dazzo, 1984) a été choisi pour cette étude étant donné qu'il contient des composants dont le potentiel osmotique est mesurable. Des milieux de culture liquide à base de PEG à différents potentiels osmotiques ($\psi = -0,21$, $\psi = -0,5$, $\psi = -0,7$, $\psi = -1,2$, $\psi = -1,7$) ont été préparés suivant la formule suivante :

$$\psi = -R \times T \times C \times M$$

Où :

Ψ = Potentiel hydrique MPa.

R= 0,0083143 (MPa.l.Mol⁻¹ .K⁻¹).

T= Température du milieu (28 °C).

C= Concentration Molaire du milieu (Mol.l⁻¹).

5ml du milieu BIII, 0 différents potentiel osmotique a été inoculé par 1 % de chaque isolat cultivé dans du milieu YAM a concentration de 10⁸ UFC/ml. La croissance en UFC des isolats est déterminée par la D.O (Densité Optique) à l'aide de la formule du facteur de croissance $Fc = \frac{UFC}{DO}$.

9.2 Viabilité des souches *Rhizobium* au stress salin

Le stress Salin a été simulé en ajoutant différentes concentrations de NaCl au milieu BIII (F. Dazzo, 1984). Des milieux de culture liquide à base de NaCl à différentes concentrations (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%) ont été préparés. 1% de chaque isolat cultivé dans du milieu YAM a concentration de 108 UFC/ml a été inoculé dans 5ml du milieu BIII à différentes concentrations NaCl. La croissance en UFC des isolats est déterminée par la D.O (Densité Optique) à l'aide de la

formule du facteur de croissance $Fc = \frac{UFC}{DO}$.

10. Activité (PGP) des souches *Rhizobium*

10.1 Solubilisation du Phosphate inorganique

➤ *Test qualitatif*

Des cultures pures d'isolats ont été inoculées dans le centre des boîtes pétri contenant le milieu de révélation de la solubilisation de Phosphate, Pikovskaya's agar, (Paul & Rao, 1971). Les boîtes sont incubées à 28 °C pendant 7 à 10 jours. Les colonies formant plus de 5.0 mm de diamètre de solubilisation sont considérées des bactéries solubilisatrices de phosphate. La zone de solubilisation de phosphate est enregistrée chaque 24 heures pendant 10 jours.

L'efficacité de la solubilisation de phosphate est calculée en utilisant la formule suivante:

L'efficacité de solubilisation : $E.S \% = \frac{Z-C}{C} \times 100$

Z = Zone de solubilisation (mm)

C = Diamètre de Colonie (mm)

➤ *Test quantitatif*

L'estimation de la quantité de phosphate solubilisée par les bactéries est effectuée par la méthode de coloration vanado-molybdo-phosphorique jaune (Kothamasi et al., 2006) dans le milieu NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) (C. Nautiyal, 1999) contenant 1000 µg/ml tri-calcium phosphate (TCP).

100 ml de NBRIP contenant 1000 µg P/ml sous forme TCP est inoculé par 1ml de chaque culture à concentration de 108UFC/ml. Les cultures sont incubées à 28 °C sous agitation de 150 rpm pendant 11 jours. 5 ml de chaque inoculum est récupéré le 3eme, 5eme, 7eme et 11eme jour, et

filtré par papier Whatman No.1 et centrifugé à 10,000 rpm pendant 20 minutes. Le phosphore (P₂O₅) dans le surnageant est déterminé par un dosage colorimétrique.

Pour cela, 0.5 ml du surnageant est récupéré dans un tube. 2.5 ml du réactif de Barton est ajouté, le volume du mélange est ajusté à un volume de 50 ml par de l'eau distillée. Après 10 minutes, l'intensité de la couleur jaune est mesurée par spectrophotométrie à une D₀= 430 nm.

➤ *Préparation de la gamme d'étalonnage*

0.2195g de potassium dihydrogène ortho-phosphate est pesé et est dissous dans 1 litre d'eau distillée. Pour la préparation de la solution de travail, 150 ml de la solution stock est diluée à un volume final de 250 ml. La courbe standard est préparée en prenant 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25 and 30 ml de la solution préparée et sont ajustées à un volume final de 50ml. 2.5ml du réactif de Barton est ajouté dans les solutions de 50 ml. Après 10 minutes, l'intensité de la couleur jaune est mesurée par spectrophotométrie à 430 nm. Le pH est déterminé à un intervalle régulier par un pH mètre digital (senSION+, HACH).

La composition du milieu Pikovskaya's agar en g/l : Glucose: 10.0, Tricalcium phosphate: 5.0, Ammonium sulphate: 0.5, Potassium chloride: 0.2, Magnesium sulphate: 0.1, Ferrous sulphate: 0,0012, Manganese sulphate: 0,002, Yeast extract: 0.5, Agar: 15.0. Le pH est ajusté à 7.0±0.2 avec 1 N de NaOH.

La composition du milieu NBRIP en g/l: Glucose: 10.0, Tricalcium phosphate: 5.0, Magnesium chloride hexahydrate: 5.0, Magnesium sulphate heptahydrate: 0.25, Potassium chloride: 0.2, Ammonium sulphate: 0.1. Le pH est ajusté a 7.0±0.2 avec 1 N de NaOH.

La préparation du réactif Barton: Solution A: 25 g ammonium molybdate est dissous dans 400ml d'eau distillée. Solution B: 1.25 g ammonium metavanadate est dissous dans 300ml d'eau distillée en ébullition, refroidi et 250ml HNO₃ concentré est ajouté. Les solutions A et B sont mélangées et le volume final est ajusté à 1 litre.

10.2 Solubilisation du Phosphate inorganique sous stress hydrique

Pour étudier la solubilisation inorganique des isolats sous stress hydrique, des milieux NBRIP liquide à différents potentiels osmotique ($\psi = -0,21$, $\psi = -0,5$, $\psi = -0,7$, $\psi = -1,2$, $\psi = -1,7$) ont été préparées.

10.3 Solubilisation du Phosphate inorganique sous stress salin

Pour étudier la solubilisation inorganique des isolats sous stress salin, des milieux NBRIP liquide à différentes concentration d`NaCl (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%) ont été préparées.

10.4 Production de l`AIA (Acide Indole Acétique)

➤ *Test qualitatif*

A l`aide de cure-dents stériles, des colonies de chaque souche ont été déposées au centre de chaque quadrant de la boîte Pétri contenant un milieu YAM additionné du L-tryptophane (5mM), puis sont incubées pendant 11 jours à 28°C.

A la fin de l`incubation, la révélation est réalisée en trempant des disques de papier whatman dans le réactif de Salkowski [1ml FeCl₃ (0.5 mM) dans 50ml de l`acide perchlorique (35%)], puis les disques sont déposés sur chaque colonie avec ajout de quelques gouttes de l`acide orthophosphorique. Le virage de la coloration de chaque colonie vers le rose, indique que cette souche est productrice de l`AIA. La souche *Azospirillum Brasiliens* a été utilisée comme témoin positif.

La composition du milieu Yeast Mannitol Agar (YAM) (Vincent, 1970) en g/l: Extrait de levure: 1 g, Mannitol: 10g, Dipotassium phosphate: 0,5g, Chlorure de sodium: 0,1g, Agar: 15g. Ajuster le pH a 7.0 ± 0.2 avec 1 M NaOH ou HCl avant d`autoclaver à 121 °C pendant 20 min.

➤ *Test quantitatif*

La production de l`AIA a été mesurée par la méthode de Gordon et Weber (1951). Les cultures bactériennes ont été incubées dans du milieu (YAM + du 5mM de Tryptophan) à 28 °C pendant 3-4 jours. Les cultures sont centrifugées à 10,000 rpm pendant 20 min. 2 ml de surnageant est mélangé avec 2 gouttes d`acide orthophosphoric et 4 ml du réactif Salkowski. Les tubes sont ensuite incubés à une température ambiante pendant 25 minutes.

Une solution stock standard de 100 µg/ml est préparée dans 50% d`éthanol. La courbe standard est préparée dans des tubes en prenant 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 and 1.0 ml de la solution stock standard. Les tubes sont remplis jusqu`à 2 ml avec de l`eau distillée et ensuite par 4 ml du réactif de Salkowski puis incubés pendant 25 minutes à température ambiante. L`intensité de la couleur rose est mesurée à D.O= 530 nm par spectrophotométrie et la concentration de l`AIA

est déduite à travers la courbe standard. La composition du réactif de Salkowski: 1 ml de FeCl₃ 0.5 M dans 50 ml d'acide perchlorique 35%.

10.5 Production de l'AIA sous stress hydrique

Pour étudier la production de l'acide Indole Acétique des isolats sous stress hydrique, des milieux YAM avec 5mM de tryptophane à différents potentiels osmotique ($\psi = -0,21$, $\psi = -0,5$, $\psi = -0,7$, $\psi = -1,2$, $\psi = -1,7$ MPa) ont été préparées.

10.6 Production de l'AIA sous stress salin

Pour étudier la solubilisation inorganique des isolats sous stress salin, des milieux YAM avec 5mM de tryptophane à différentes concentration NaCl (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%) ont été préparées.

10.7 Production des Gibbérellines

Détection de l'acide gibbérellique par spectrophotométrie :

Les souches bactériennes ont été incubées à 28 °C pendant 48 heures (Pandya et Desai, 2014). La suspension bactérienne a été centrifugée à 10000 rpm pendant 10-15 Min. 2 ml du surnageant a été ajouté à une solution de HCl de 5N (1:2). Pour l'extraction, La solution acidifiée a été ajoutée à de l'Acétate d'éthyle à un ratio de (1:3) trois fois. 25 ml du surnagent final a été ajoutée à 2ml d'une solution de Potassium et incubée pendant 5 Min. 2 ml d'Acétate de Zinc a été ajouté au surnageant. Le mélange a été centrifugé à la vitesse maximale (15,000 rpm) pendant 15 Min. 5 ml du surnageant a été ajouté à 5ml de HCl 30% et incubé à 20 °C pendant 2 Min (Patel, K. et al , 2015). L'absorbance a été mesurée à une D.O= 254 nm par spectrophotométrie (Vikram et al. 2007).

Tableau 19. La gamme d'étalonnage pour la détection de l'acide gibbérellique par spectrophotométrie.

Solution mère (SM) = 100ug/ml

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solution Mère	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
E.Distillée (ml)	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1	1
HCl (5N) (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Acétate d'éthyle (ml)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

10.8 Production des Siderophores

La production des siderophore des isolats a été estimée par le test chimique universel (chrome azurol S assay) comme décrits par Schwyn et Neilands (1987). Toute la verrerie est lavée par de l'acide hydrochlorique 6M puis rincée avec de l'eau distillée et cela pour se débarrasser de toute trace de fer.

Le test chrome azurol sulfonate (CAS) est utilisé pour la détection des sidérophores. Ce test utilise un complexe fer-colorant qui change de couleur du bleu au jaune en l'absence du fer. Etant donné que les sidérophores ont une affinité supérieure au colorant, le sidérophore chélate le fer, une couleur jaune est révélée sous les colonies productrices de sidérophores. Le complexe fer-colorant est incorporée au milieu King's B (King *et al.*, 1954).

La solution CAS-HDTMA est préparée en dissolvant 121 mg chrome azurol sulfate (CAS) dans 100 ml d'eau distillée, dans laquelle, une solution de 20 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM (une solution de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM est préparée et est ajoutée dans 10 mM HCl). Une solution de 20 ml hexadecyltriméthylammonium bromide (HDTMA) (729 mg HDTMA dans 400 ml d'eau distillée) est ajoutée et autoclavée à 121°C pendant 15 minutes.

Une solution de 100 ml CAS-HDTMA est ajoutée minutieusement à 900 ml du milieu King's B stérile pour éviter la formation de mousse. Les isolats sont inoculés et incubés à 28 °C pendant 3-4 jours. Les isolats produisant une couleur orange sous forme d'halo autour de la colonie sont considérés comme producteurs de sidérophores.

L'intensité de la production des siderophores est calculée selon la formule suivante :

L'intensité de production : $I.P\% = \frac{Z-c}{c} \times 100$

Z = Zone de production (mm)

C = Diamètre de Colonie (mm)

La composition du milieu King's B en g/l: Proteose peptone: 20.0, Dipotassium hydrogen phosphate: 1.50, Magnesium sulfate heptahydrate: 1.50, Agar: 20. Ajuster le pH à 7.5 ± 0.2 avec 1 M NaOH ou HCl avant d'autoclaver à 121°C pendant 20 min.

11. Analyse statistique

➤ *Efficience symbiotique des Rhizobium*

L'analyse des données a été réalisée avec Excel 2013 (Microsoft, Redmond, USA) et SPSS 20 (IBM Corp., Chicago, USA) en effectuant le test d'homogénéité des variances, tests de robustesse d'égalité des moyennes (test de Welch et Brown-Forsythe) et analyse de variance (ANOVA one way) avec une différence significative minimale de ($P \leq 0.05$) utilisée pour comparer les moyennes d'association différente.

La variable indépendante comprenait les associations symbiotiques isolats-variétés. Des comparaisons (test post-hoc) ont été effectuées pour évaluer les différences par paires entre les moyennes de groupe avec l'utilisation du test Tukey HSD. La corrélation bivariée entre les paramètres de croissance et la corrélation partielle pour chaque variété ont été réalisées à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson et du test de signification de Two-tailed.

➤ *Analyse statistique du pouvoir (PGP) de Rhizobium sous stress abiotiques*

L'analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) a été menée pour évaluer l'hypothèse nulle selon laquelle il n'y a pas de différence dans la croissance bactérienne et l'activité de Promotion de la Croissance des plantes (production de phytohormones et solubilisation de phosphate inorganique) dans des conditions de stress dû au sel et à la sécheresse. Les souches bactériennes ont été considérées comme des variables indépendantes. Des comparaisons (test post-hoc) ont été effectuées pour évaluer les différences par paires entre les moyennes de groupe avec l'utilisation des tests de Duncan et de Tukey HSD.

Les graphiques ont été réalisés avec la version 7.00 de GraphPad Prism pour Windows (Logiciel GraphPad, San Diego, Californie, États-Unis, www.graphpad.com).

IV. Résultats

1. Caractérisation biochimique des isolats

Soixantes huit souches ont été isolées des nodules de 10 différents accessions de lentille (*Lens culinaris* subsp. *culinaris*) (26 isolats de l'accession IG694552, 5 isolats de l'accession IG73856, 6 isolats de l'accession IG789, 4 isolats de l'accession IG1737, 5 isolats de l'accession IG 315, 5 isolats de l'accession IG69452, 5 isolats de l'accession IG795, 5 isolats de l'accession 4351, 4 isolats de l'accession IG2292 et 3 isolats de l'accession IG4774) (Tableau 20).

Tableau 20. Liste des isolats et de leurs hôtes attribués. Les souches en gras représentent les 14 souches représentatives de *Rhizobium*.

Isolates	NI	IG	AO
1159N11 ; 1159N112; 1159N12; 1159N12; 1159N13; 1159N14; 1159N15; 1159N21; 1159N22; 1159N23; 1159N24 ; 1159N25; 1159N31; 1159N32; 1159N33; 1159N34; 1159N35; 1159N43; 1159N44; 1159N45; 1159N51; 1159N52 ; 1159N53; 1159N54; 1159N541 ; 1159N55	26	69452	NA
1574N13; 1574N2; 1574N3; 1574N4 ; 1574N52	5	73856	NA
318N1; 318N21; 318N211 ; 318N2111 ; 318N42; 318N42	6	789	Egypt
996N2 ; 512N13; 512N3; 512N4	4	1737	Ethiopia
115N1; 115N2 ; 115N3; 115N4; 115N5	5	315	Ethiopia
1145N1 ; 1145N2; 1145N3; 1145N4; 1145N5	5	69452	NA
322N1; 322N2; 322N32 ; 322N5; 322N51	5	795	Egypt
938N1; 938N2; 938N3 ; 938N4; 938N13	5	4351	Iran
686N3; 686N4; 686N1; 686N5	4	2292	Iran
512N1; 996N4; 996N5	3	4774	Romania

Les 68 isolats et la souche de référence *Rhizobium* sp. CIAT899 ont été testés utilisant 10 différents tests biochimiques et physiologiques afin de construire un profil spécifique de chaque souche (Tableau 21).

Tableau 21. Caractérisation biochimique de la souche *Rhizobium* sp. CIAT899 et des 68 isolats

Souche	Gram	Cata	BBT	CR	Star	Urea	OX	LB	NaCl	CV
CIAT899	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
1159N11	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
1159N11	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
1159N12	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
1159N12	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
1159N13	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
1159N14	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
1159N15	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
1159N21	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
1159N22	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
1159N23	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
1159N24	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
1159N25	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
1159N31	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
1159N32	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
1159N33	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
1159N34	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
1159N35	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
1159N41	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
1159N43	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
1159N44	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
1159N45	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
1159N51	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
1159N52	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
1159N53	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
1159N54	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
1159N541	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
1159N55	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
1574N13	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
1574N2	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
1574N3	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
1574N4	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
1574N52	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
318N1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+

318N21	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
318N211	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
318N2111	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
318N42	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
318N42	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
512N1	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
512N13	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
512N3	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
512N4	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
115N1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
115N2	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
115N3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
115N4	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
115N5	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
1145N1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
1145N2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
1145N3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
1145N4	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
1145N5	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
322N1	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
322N2	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
322N32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
322N5	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
322N51	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
938N1	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
938N2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
938N3	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
938N4	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
938N13	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
686N3	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
686N4	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
686N5	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
686N1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
996N2	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
996N4	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
996N5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+

Gram : le test Gram-/+ , Cata : test de catalase , BBT : test du Bleu de Bromothymol, CR : test du Rouge Congo, Star : test de la réduction de l'amidon, Urea : test de la réduction de l'urée, OX : test de l'oxydase, LB : le test de la croissance sur le milieu Luria-Bertani, NaCl : test de croissance sur milieu a 2% de NaCl, CV : test de croissance sur milieu à base de Crystal Violet.

2. Analyse binaire des profils biochimiques des isolats

L'analyse binaire des isolats et la souche de référence *Rhizobium sp.* CIAT899 partage les bactéries en plusieurs groupes selon leur similarité en termes de profil biochimique. Le groupe A se divise en deux sous-groupes représentant la population bactérienne isolée la plus proche de la souche de référence *Rhizobium sp.* CIAT899 en termes de profil biochimique (Fig.13).

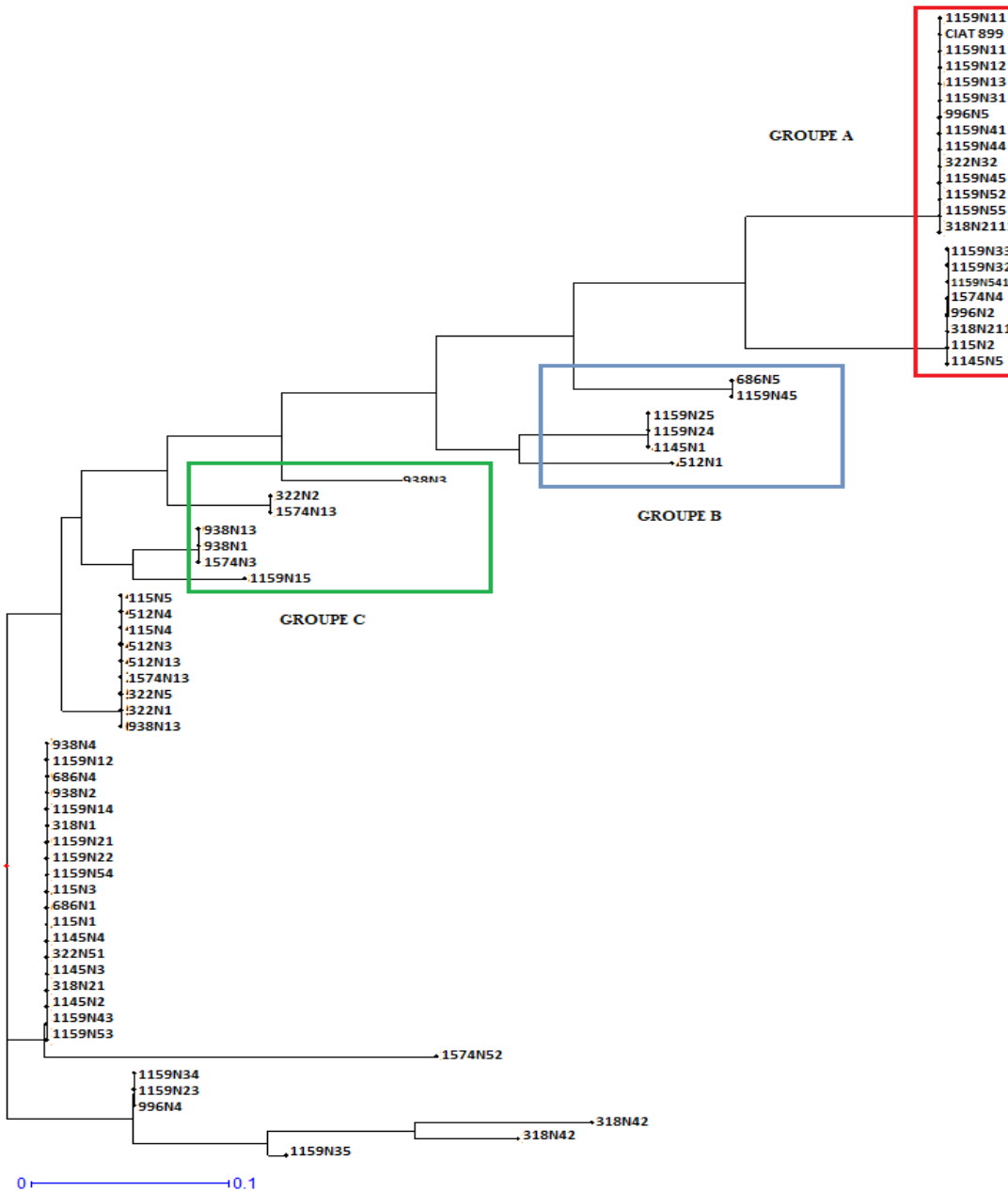


Fig13. Qrbre phylogénétique représente l'analyse des résultats de la caractérisation biochimique des isolats et de la souche *Rhizobium sp.* CIAT899. L'arbre est construit à l'aide du logiciel *Darwin6.0*

3. Caractérisation moléculaire des isolats

➤ Résultats de l'extraction de l'ADN

Les concentrations de l'extraction de l'ADN des isolats sélectionnés varient de 9.476 ng/ul comme valeur la plus faible à 713 ng/ul comme valeur la plus forte. Le Ratio DO260/DO280 a été de 1.6, comme ratio le plus faible, et de 1.9 comme ratio le plus élevé. Le Ratio DO260/DO230 a été de 1.6, comme ratio le plus faible, et de 2.21 comme ratio le plus élevé (Tableau 22). Les extraits ADN sur gel révèlent que la qualité de l'ADN extrait est élevée avec une faible quantité d'ADN dégradé (Fig 14).

Tableau 22. Concentrations de l'ADN génomique des isolats en (ng/μl) déterminées par le Nanodrop (Jenway, Genova nano). Ratio DO260/DO280 : la pureté en protéines, Ratio DO260/DO230 : la pureté en solvants.

Souches	Concentration d'ADN (ng/μl)	Ratio DO260/DO280	Ratio DO260/DO230
R. CIAT899	9.476	1.7	1.7
318N211	746.9	1.76	1.74
686N5	184.1	1.65	1.6
115N2	74.44	1.9	2
1574N4	162.1	1.9	2.1
318N2111	713.8	1.73	1.82
996N2	252.5	1.76	2.06
322N32	247.2	1.8	2.07
1145N5	523	1.84	2.07
1159N32	394.4	1.8	2.16
938N3	145.9	1.86	2.22
1159N24	194.5	1.76	1.95
996N5	191.4	1.92	2.12
1159N52	485.6	1.87	2.1
1145N1	318.7	1.77	2.09
512N1	402.6	1.91	2.21

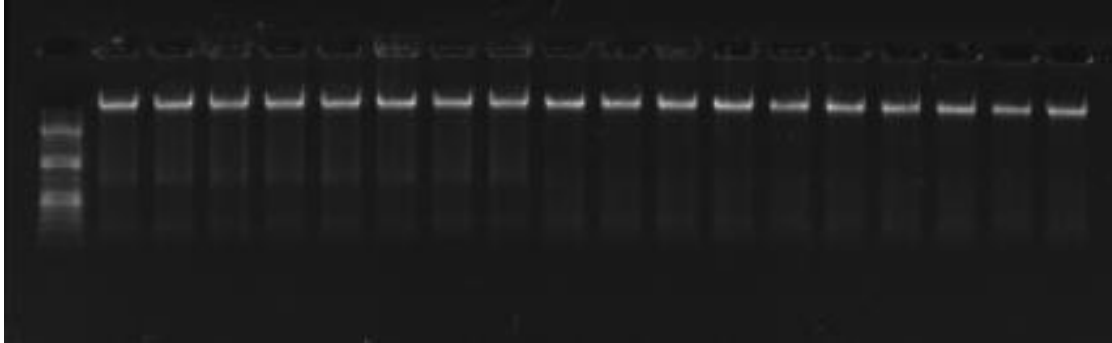


Fig 14. Image de l'ADN extrait prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1, 1159N11, 1159N41** respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées sont de taille de plus de 2000pb.

4. Amplification par PCR des gènes symbiotiques et de ménages

➤ *Amplification de l'ADNr16S*

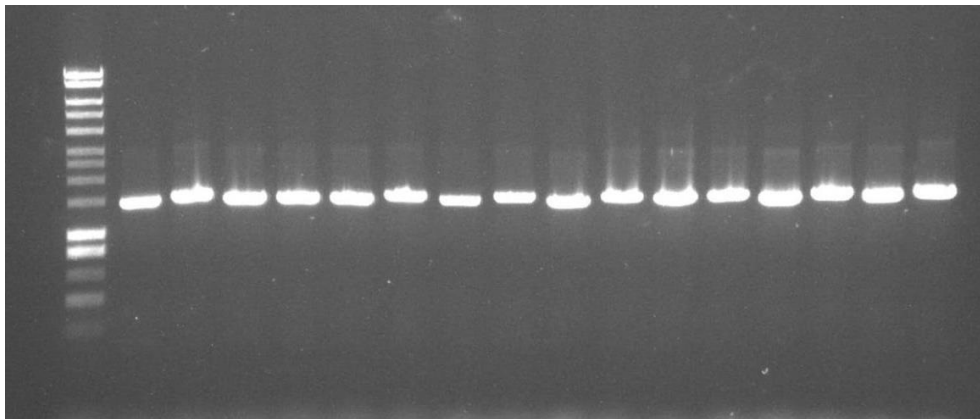


Fig.15 Image de l'amplification du gène 16S rDNA prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1**, respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées sont de taille 1500pb.

➤ *Amplification du glnA*

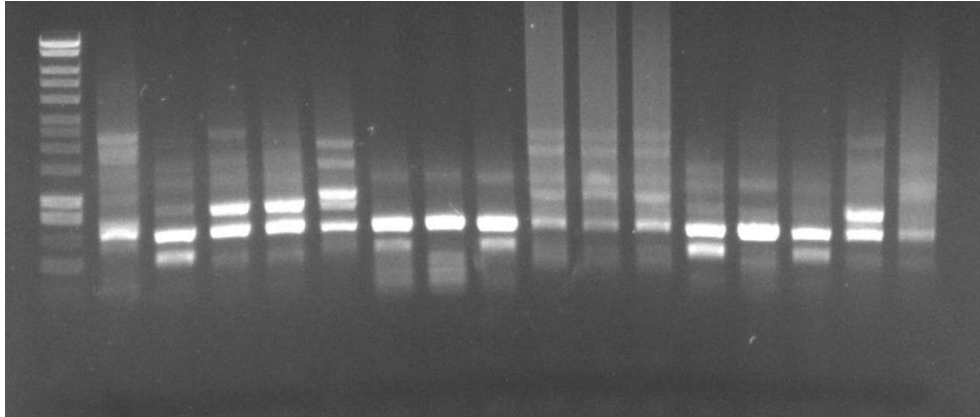


Fig 16. Image de l'amplification du gène *glnA* prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1**, respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 660pb.

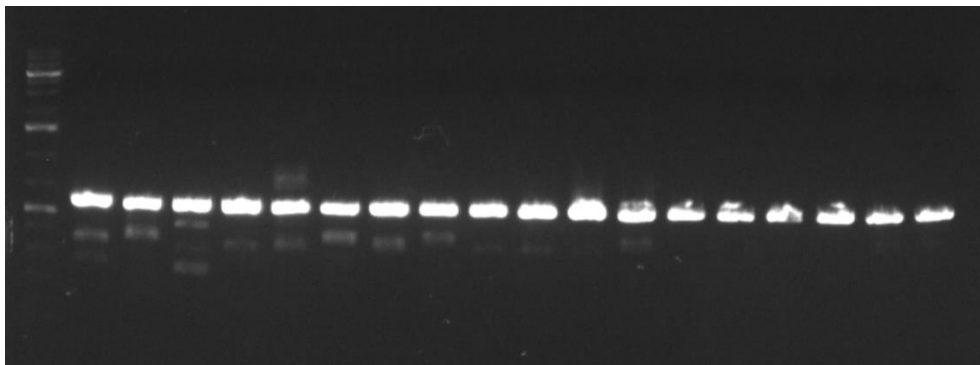


Fig 17. Image de l'amplification du gène *glnA*, après extraction des bandes, prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1, 1159N11, 1159N41** respectivement.. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 660pb.

➤ *Amplification du recA*

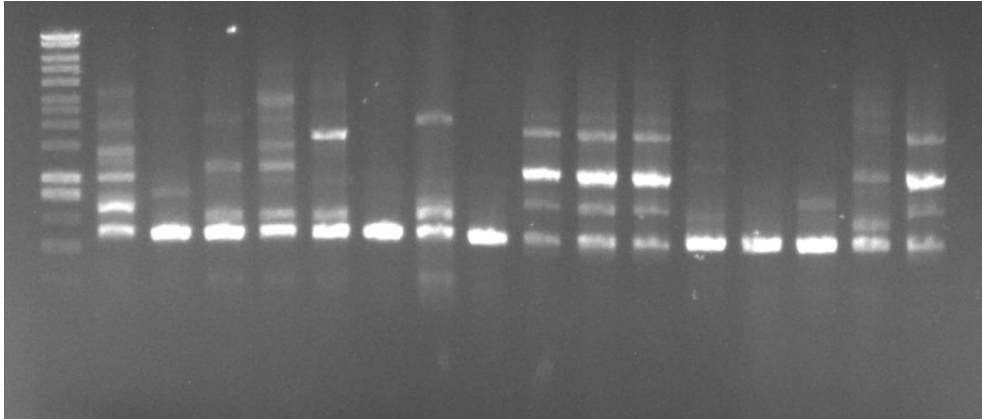


Fig 18. Image de l'amplification du gène *recA* prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1**, respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 500pb.

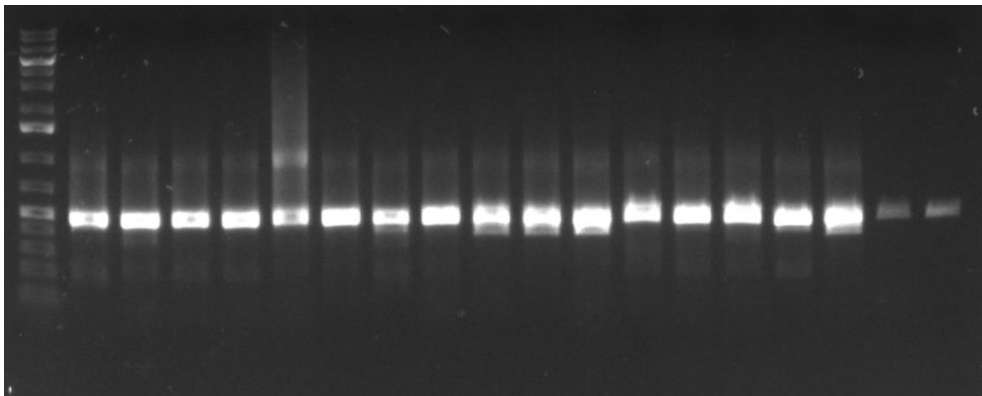


Fig 19. Image de l'amplification du gène *recA*, après extraction des bandes prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1, 1159N11, 1159N41**, respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 500pb.

➤ *Amplification du dnaK*

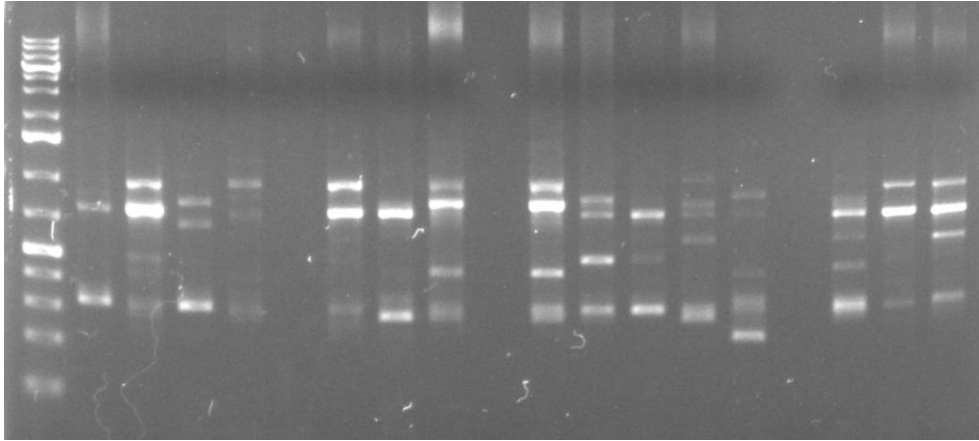


Fig 20. Image de l'amplification du gène *dnaK* prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1, 1159N11, 1159N41,** respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 720pb.

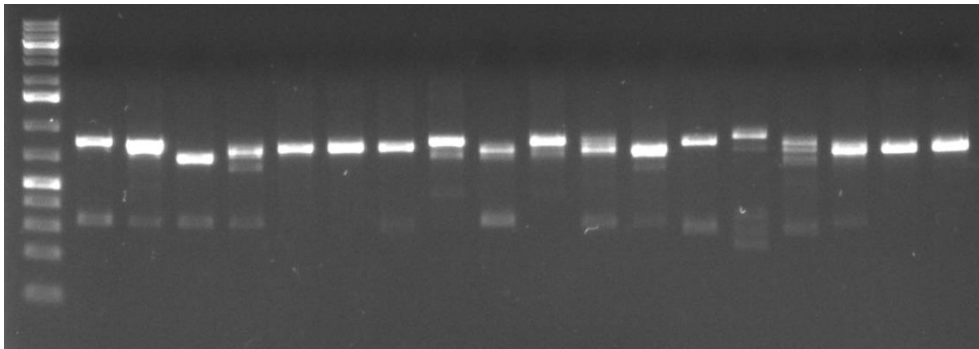


Fig 21. Image de l'amplification du gène *dnaK* après extraction des bandes prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1, 1159N11, 1159N41,** respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 720pb.

➤ *Amplification du rpoB*

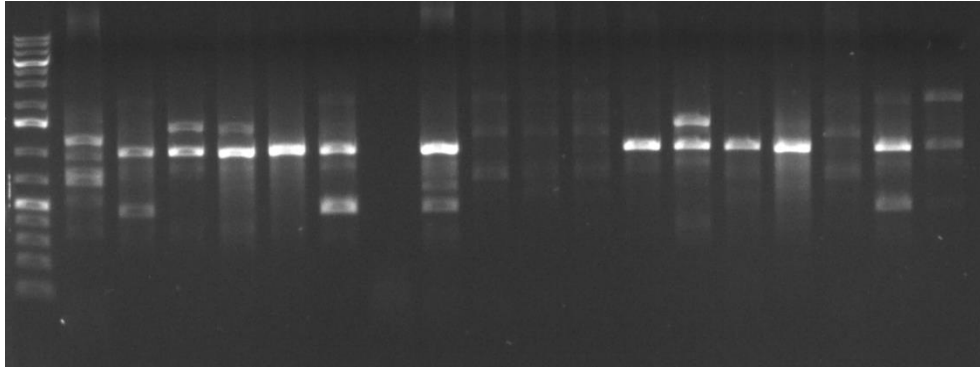


Fig 22. Image de l'amplification du gène *rpoB* prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1, 1159N11, 1159N41,** respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 990pb.

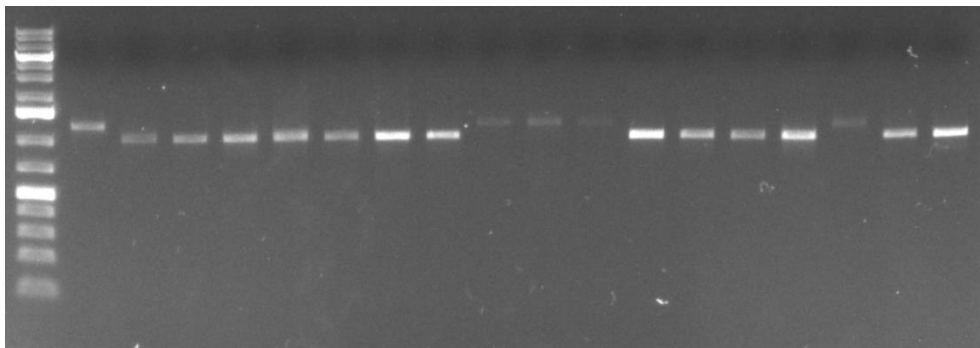


Fig 23. Image de l'amplification du gène *rpoB* après extraction des bandes prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1, 1159N11, 1159N41,** respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 990pb.

➤ *Amplification du dnaJ*

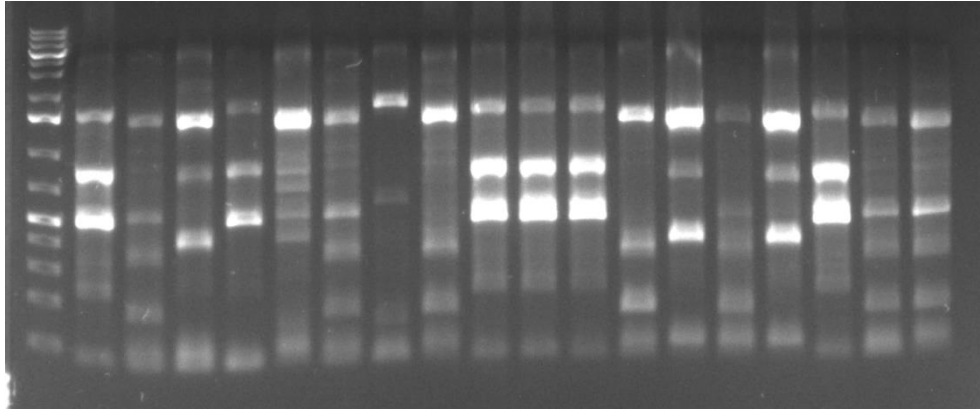


Fig 24. Image de l'amplification du gène *dnaJ* prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1, 1159N11, 1159N41,** respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 1130pb.

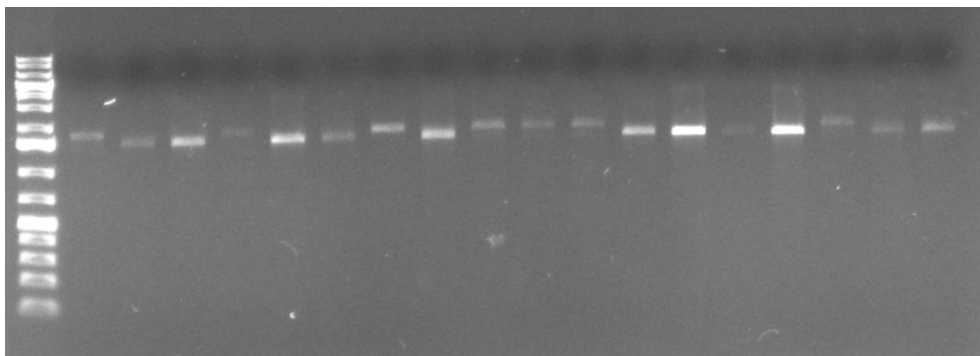


Fig 25. Image de l'amplification du gène *dnaJ* après extraction des bandes prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1, 1159N11, 1159N41,** respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 1130pb.

➤ *Amplification de l'atpD*

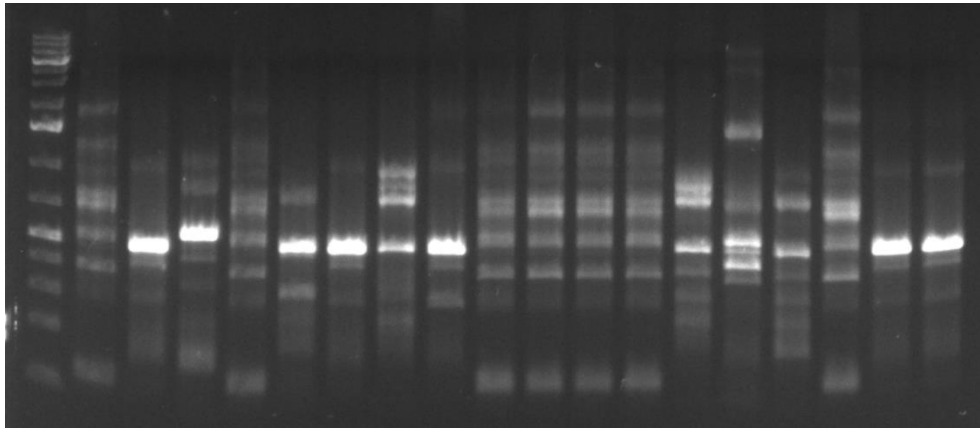


Fig 26. Image de l'amplification du gène *atpD* prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1, 1159N11, 1159N41,** respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Biorline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 550pb.

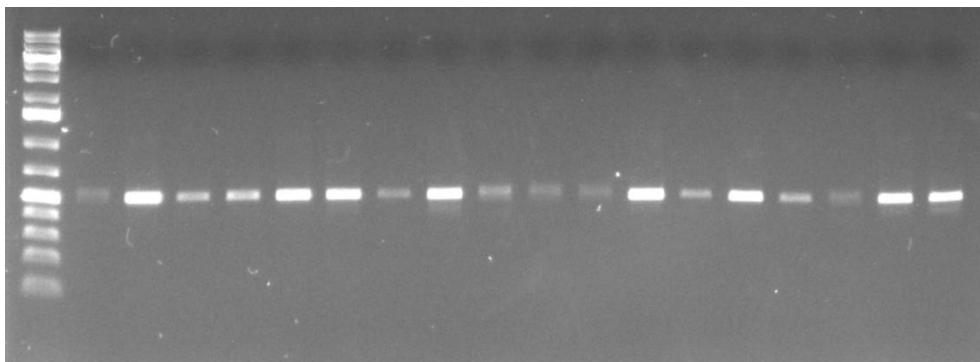


Fig 27. Image de l'amplification du gène *atpD* après extraction des bands prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1, 1159N11, 1159N41,** respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Biorline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 550pb.

➤ *Amplification du NodD*

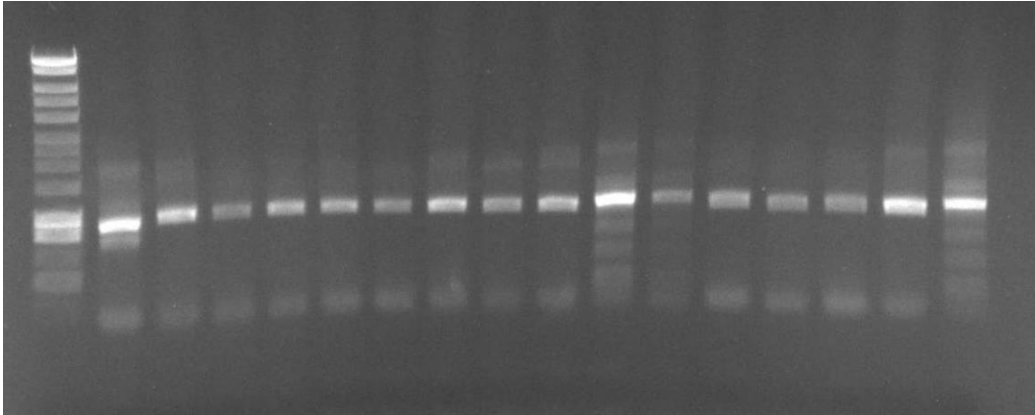


Fig 28. Image de l'amplification du gène symbiotique *nodD* prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1**, respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées sont de taille 900pb.

➤ *Amplification du NodA*

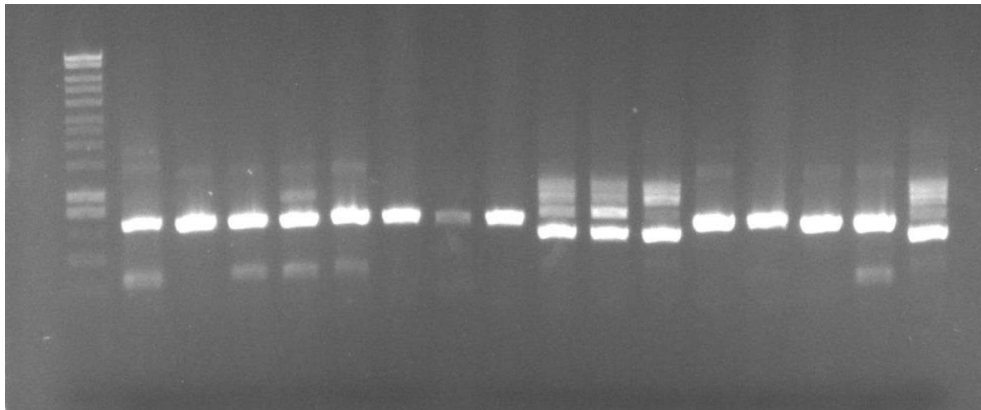


Fig 29. Image de l'amplification du gène symbiotique *nodA* prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1**, respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 660pb.

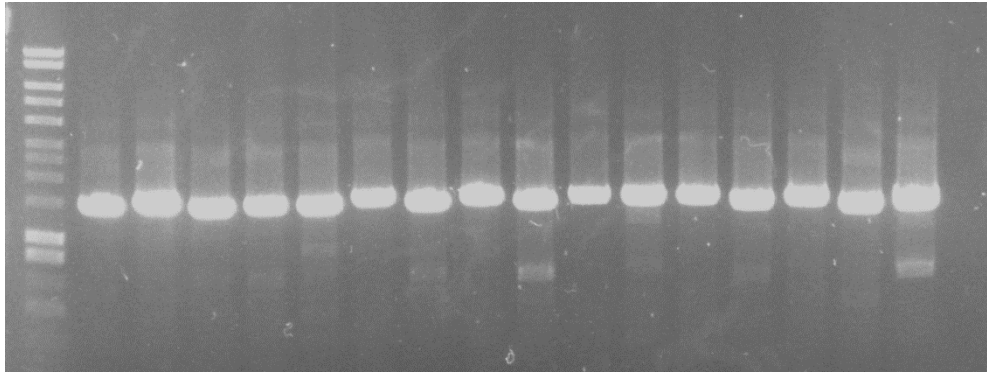


Fig 30. Image de l'amplification du gène symbiotique *nodA* après extraction des bandes prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1**, respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 660pb.

➤ *Amplification du nif-H*

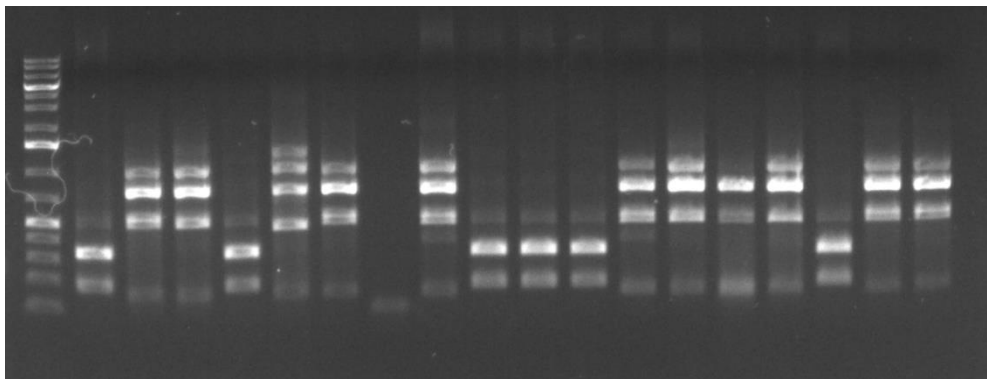


Fig 31. Image de l'amplification du gène symbiotique *nif-H* prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899, 318N211, 686N5, 115N2, 1574N4, 318N2111, 996N2, 322N32, 1145N5, 1159N32, 938N3, 1159N24, 996N5, 1159N52, 1145N1, 512N1**, respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 660pb.

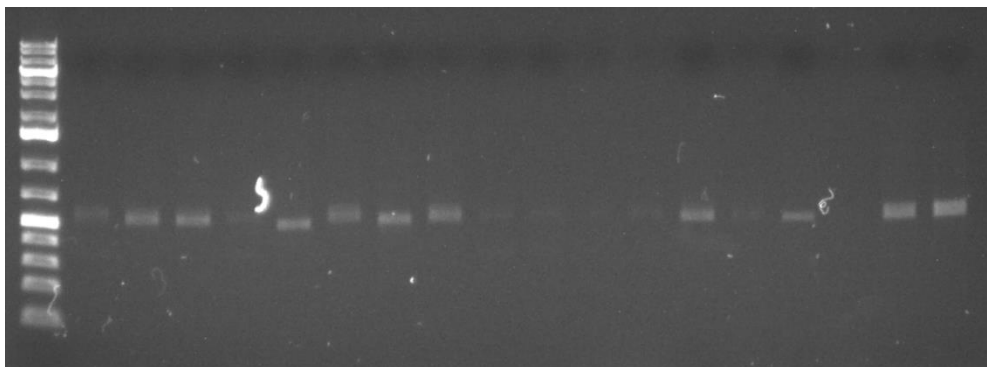


Fig 32. Image de l'amplification du gène symbiotique *nif-H* après extraction des bandes prise par le système d'imagerie (Enduro, Labnet). La ligne 1 : Marqueur de taille 1kb. Les lignes 2-16 : **CIAT899**, **318N211**, **686N5**, **115N2**, **1574N4**, **318N2111**, **996N2**, **322N32**, **1145N5**, **1159N32**, **938N3**, **1159N24**, **996N5**, **1159N52**, **1145N1**, **512N1**, respectivement. L'échelle du marqueur de taille (HyperLadder 1kb, Bioline) indique que les bands amplifiées concernées sont de taille 660pb.

5. Analyse phylogénétique des séquences

➤ L'arbre phylogénétique des séquences du gène *16S rDNA*

Les isolats ont été groupés en deux groupes selon le gène *16S rDNA* (Fig. 33), deux groupes apparentés à *Rhizobium* avec une grande similarité de séquences de 96%-100% avec *R. indigoferae* CCBAU71042 and 97-100% avec *R. anhuiense* CCBAU23252, *R. laguerreae* FB206, *R. leguminosarum* CCBAU15396, *R. acidisoli* FH13. L'isolat **1159N11** a montré 97% de similarité avec *R. leucaenae* CCGE 523. Le deuxième groupe est apparenté à *Mesorhizobium* ou l'isolat **938N3** avait 100% de similarité avec *Mes. huakuii* ATCC 33669 et *Mes. Jarvissi* ATCC 33669 (Tableau 5).

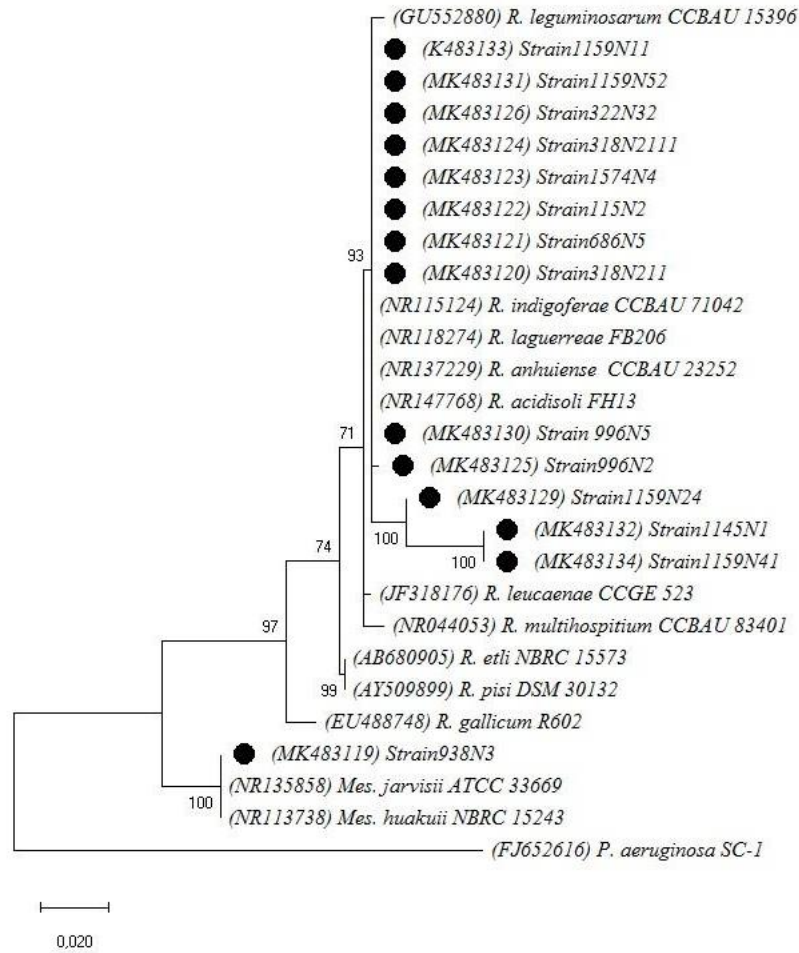


Fig 33. Arbre phylogénétique construit en se basant sur l'analyse individuelle des séquences du gène 16S rDNA des isolats sélectionnés et des séquences les plus proches en termes Max Scores sur le site web NCBI. L'arbre est généré en utilisant MEGAX avec le model de distance Kimura 2-parameter (K2), avec l'analyse Bootstrap 1000 et la valeur Bootstrap (B.V \geq 50%). Les isolats ont été regroupés en utilisant *Pseudomonas aeruginosa* SC-1. Bars : 2% nucléotide substitutions. ● représente les séquences des isolats étudiés.

➤ L'arbre phylogénétique des séquences du gène *glnA*

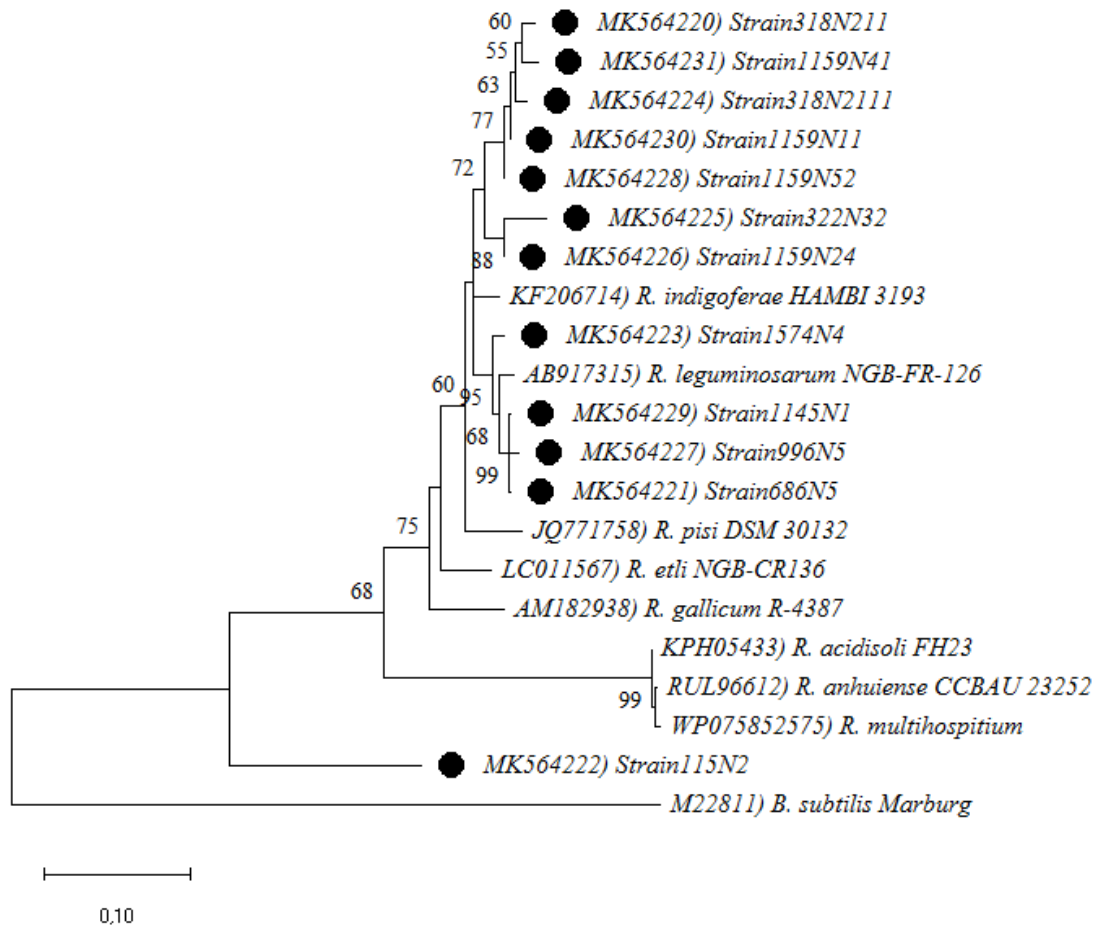


Fig 34. Arbre phylogénétique construit en se basant sur l'analyse individuelle des séquences du gène *glnA* des isolats sélectionnés et des séquences les plus proches en termes Max Scores sur le site web NCBI. L'arbre est généré en utilisant MEGAX avec le model de distance Kimura 2-parameter (K2), avec l'analyse Bootstrap 1000 et la valeur Bootstrap (B.V \geq 50%). Les isolats ont été regroupés en utilisant *Bacillus subtilis* Marburg. Bars : 2% nucléotide substitutions. ● représente les séquences des isolats étudiés.

➤ L'arbre phylogénétique des séquences du gène *recA*

Selon le gène *recA* (Fig. 35), les isolats ont été divisés en trois groupes, deux groupes apparentés au *Rhizobium* avec des pourcentages de similarité de 96%-100% avec *R. laguerreae* ES8, 95%-100% avec *R. leguminosarum* CCBAU15396 et *R. indigoferae* CCBAU71042. L'isolat **1574N4** a été le plus proche de *R. laguerreae* ES8 avec un pourcentage de similarité of 100% comparé aux autres isolats. Le troisième groupe été relié à *Mesorhizobium* ou l'isolat **938N3** a montré 100% de similarité avec *Mes. huakui* (Tableau 5).

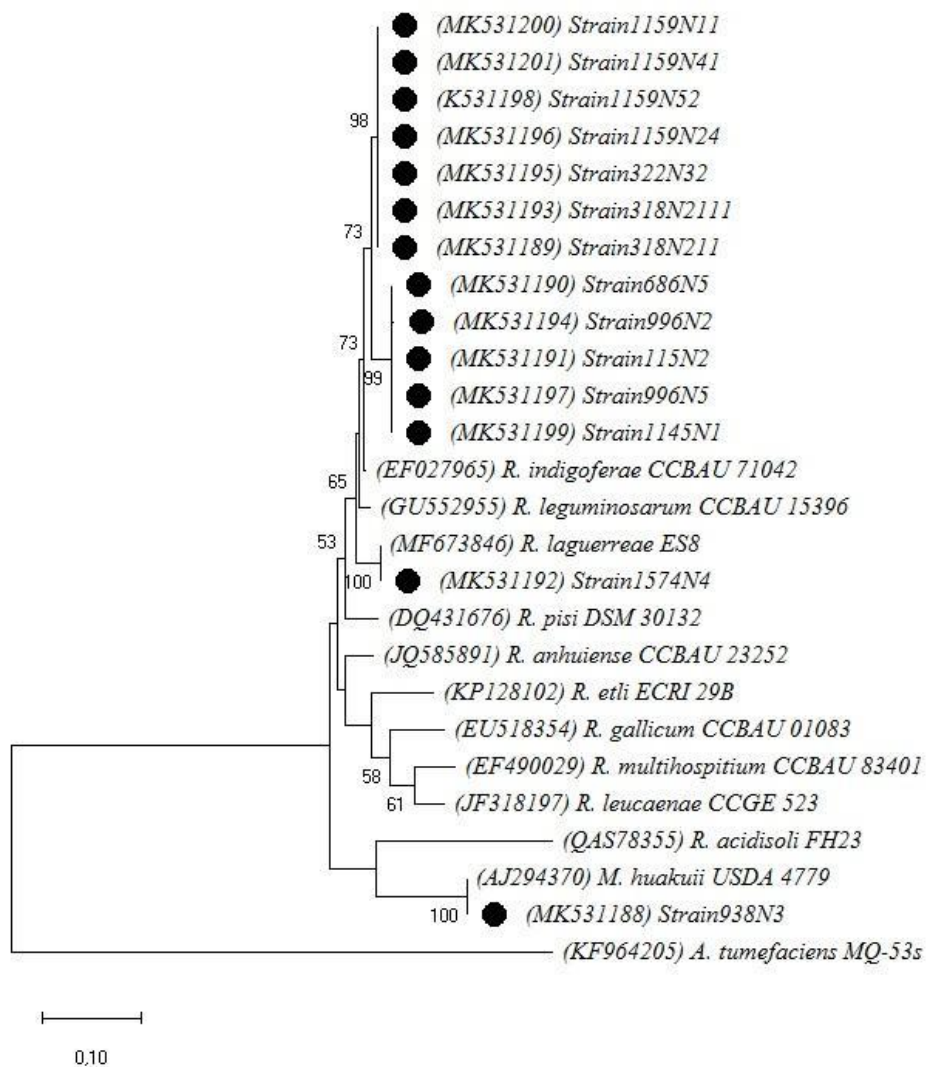


Fig 35. Arbre phylogénétique construit en se basant sur l'analyse individuelle des séquences du gène *recA* des isolats sélectionnés et des séquences les plus proches en termes Max Scores sur le site web NCBI. L'arbre est généré en utilisant MEGAX avec le model de distance Kimura 3-parameter (T92) (K2), avec l'analyse Bootstrap 1000 et la valeur Bootstrap (B.V \geq 50%). Les isolats ont été regroupés en utilisant *Agrobacterium tumefaciens* MQ-53s. Bars : 10% nucléotide substitutions. ● représente les séquences des isolats étudiés.

➤ L'arbre phylogénétique des séquences du gène *gyrB*

Selon l'arbre phylogénétique du gène *gyrB* (Fig. 36), les isolats ont été partagés en deux groupes apparentés au *Rhizobium* dans lesquels les isolats ont été subdivisés en trois sous-groupes avec un pourcentage de similarité de 94%-97% avec *R. leguminosarum* NGB-FR-151 et le deuxième groupe apparenté à *Mesorhizobium* ou l'isolat **938N3** a montré 100% de similarité avec *Mes. huakuii* CCBAU2609 (Tableau 5).

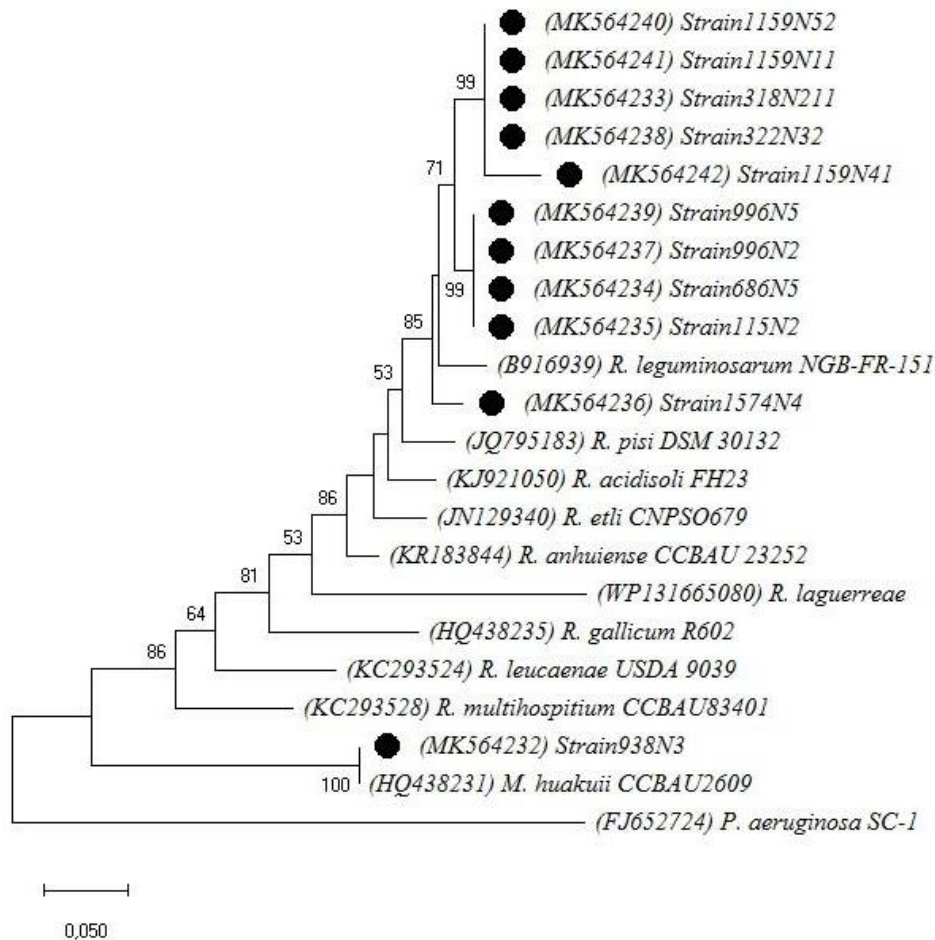


Fig 36. Arbre phylogénétique construit en se basant sur l'analyse individuelle des séquences du gène *gyrB* des isolats sélectionnés et des séquences les plus proches en termes Max Scores sur le site web NCBI. L'arbre est généré en utilisant MEGAX avec le model de distance Kimura 3-parameter (T92) (K2), avec l'analyse Bootstrap 1000 et la valeur Bootstrap (B.V \geq 50%). Les isolats ont été regroupés en utilisant *Pseudomonas aeruginosa* SC-1. Bars : 5% nucléotide substitutions. ● représente les séquences des isolats étudiés.

➤ *L'arbre phylogénétique des séquences du gène rpoB*

Selon le gène *rpoB* (Fig. 37), les isolats ont été groupés dans un seul groupe appartenant à *Rhizobium* qui est subdivisé en deux sous-groupes. Un sous-groupe apparenté à *R. laguerreae* ES8 avec un pourcentage de similarité de 96%-100%. Le deuxième sous-groupe apparenté à *R. leguminosarum* CCBAU15396 et *R. indigoferae* CCBAU71042 avec un pourcentage de similarité de 96%-97% and 95%-97%, respectivement (Tableau 5).

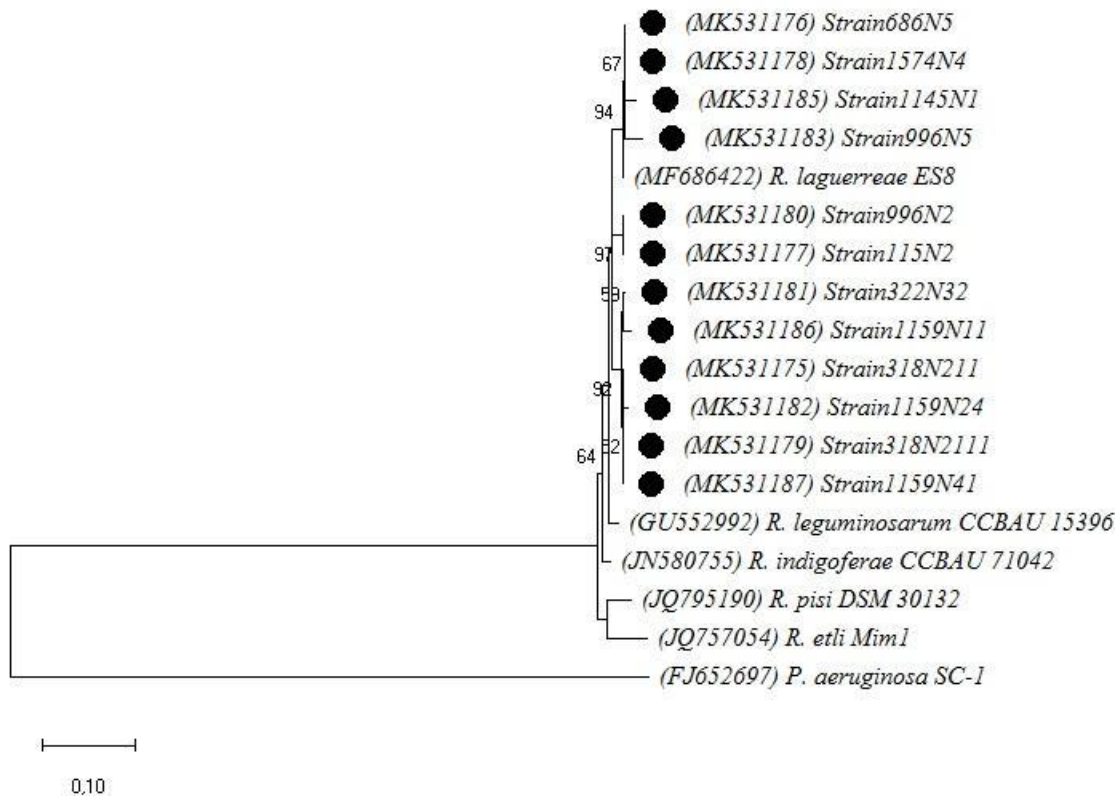


Fig 37. Arbre phylogénétique construit en se basant sur l'analyse individuelle des séquences du gène *rpoB* des isolats sélectionnés et des séquences les plus proches en termes Max Scores sur le site web NCBI. L'arbre est généré en utilisant MEGAX avec le model de distance Kimura 3-parameter (T92) (K2), avec l'analyse Bootstrap 1000 et la valeur Bootstrap (B.V \geq 50%). Les isolats ont été regroupés en utilisant *Pseudomonas aeruginosa* SC-1. Bars : 10% nucléotide substitutions. ● représente les séquences des isolats étudiés.

➤ *Arbres phylogénétiques des séquences du gène nodD et du gene nodA*

Concernant les gènes symbiotiques, les isolats ont été groupés au sein du genre *Rhizobium* (Figs. 38 et 39) avec des pourcentages de similarité entre 96%-100% avec *R. laguerreae* et 97%-100% avec *R. leguminosarum* pour le gène *nodA* et le gène *nodD*, respectivement (Tableau 5). Pour le gène *nodA*, les isolats ont été subdivisés en trois groupes. Le premier groupe apparenté à *R. leguminosarum* CTG-22Ps, le deuxième groupe est lié à *R. laguerreae* R106 et le troisième est

associé avec l'isolat **1574N4** lié à *R. etli* NGB-FR-141. Pour le gène *nodD*, l'arbre phylogénétique a montré deux sous-groupes liés étroitement au genre *Rhizobium* avec un groupe proche de *R. leguminosarum* bv. *viciae* SS21 avec un isolat (**1574N4**) and le second lié étroitement aux *R. leguminosarum* 248 et *R. laguerreae* ES8.

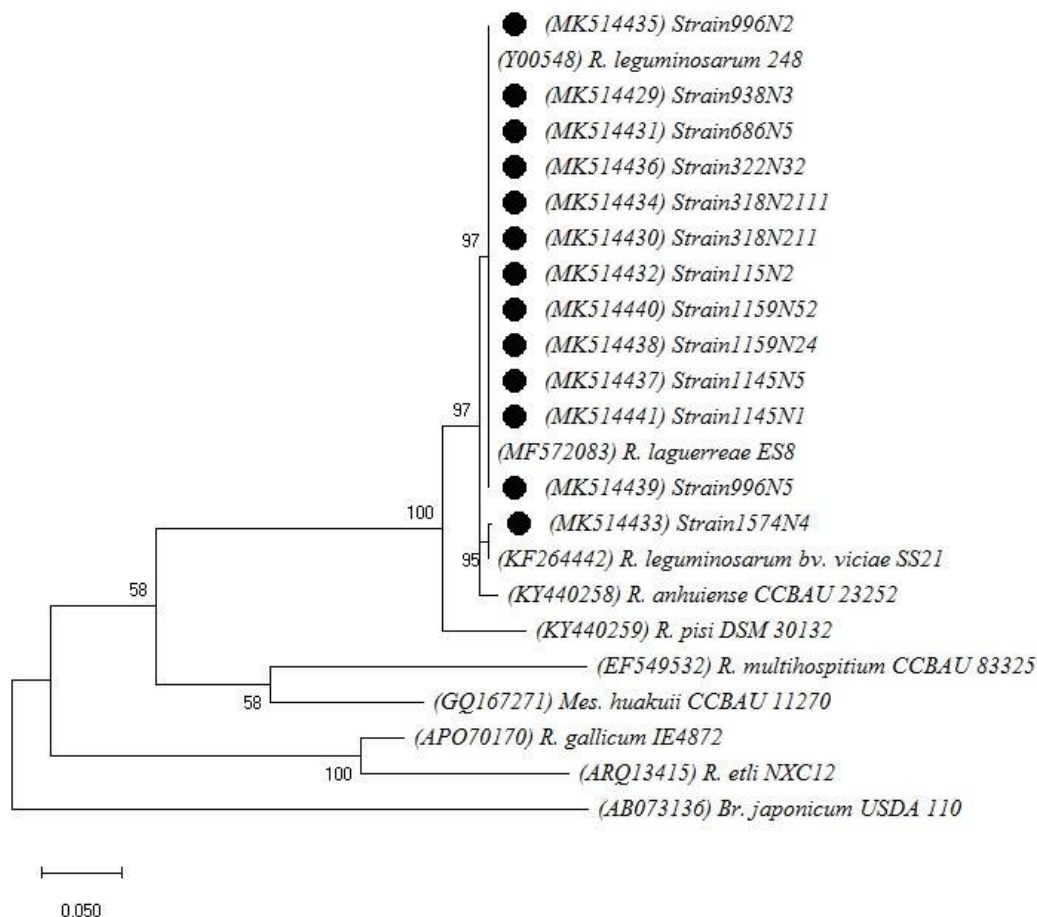


Fig 38. Arbre phylogénétique construit en se basant sur l'analyse individuelle des séquences du gène *nodD* des isolats sélectionnés et des séquences les plus proches en termes Max Scores sur le site web NCBI. L'arbre est généré en utilisant MEGAX avec le model de distance Kimura 2-parameter (K2), avec l'analyse Bootstrap 1000 et la valeur Bootstrap (B.V \geq 50%). Les isolats ont été regroupés en utilisant *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Bars : 5% nucléotide substitutions. ● représente les séquences des isolats étudiés.

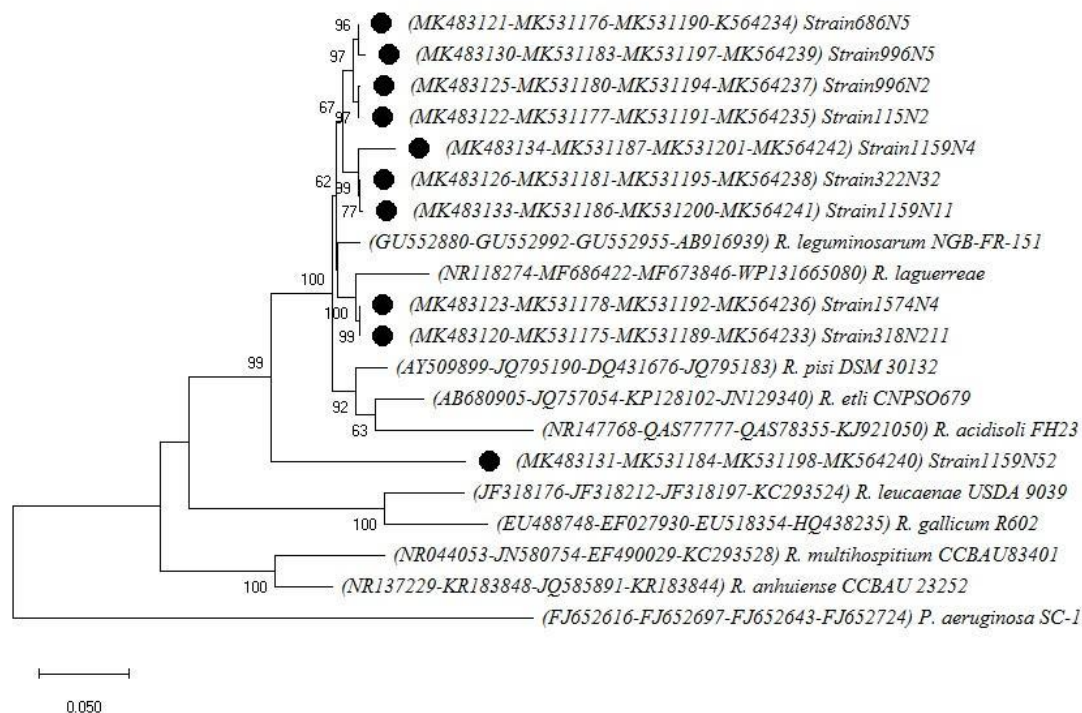


Fig 40. Arbre phylogénétique construit en se basant sur les séquences concaténées des gènes (*16S-rpoB-recA-gyrB*) des isolats sélectionnés et des souches de *Rhizobium* de référence récupérées du site web the NCBI. L'arbre est généré en utilisant MEGAX avec le model de distance général Time réversible avec l'analyse Bootstrap 1000 et la valeur Bootstrap (B.V \geq 50%). Les isolats ont été regroupés en utilisant *Pseudomonas aeruginosa* SC-1. Bars : 5% nucléotide substitutions. ● représente les séquences des isolats étudiés.

6. Caractérisation symbiotique des isolats

➤ Efficience des isolats sur la croissance de trois variétés de lentille

Les 14 isolats ont pu former un nombre important de nodules sur les différentes variétés de lentilles allant de 4 à 37 nodules par plante (Fig. 41 et tableau 23). Le test d'égalité des moyennes a montré une différence significative en utilisant les tests de Welch et de Brown – Forsythes avec une valeur de $p \leq 0.05$. Un total de 10 isolats a montré une efficience symbiotique significative sur la variété Bakria en terme du poids sec de la plante, la hauteur de la plante et la teneur totale en azote des feuilles (valeur $p \leq 0.05$), par rapport au témoin non inoculé (Figs 41-44). Pour les variétés Chakkouf et Zaria, seuls trois isolats ont montré une efficience symbiotique significative basée sur les mêmes paramètres de croissance. Les corrélations partielles et bivariées étaient positivement significatives entre les paramètres de croissance pour les associations isolat-Bakria, alors qu'aucune corrélation significative n'a été observée entre la teneur totale en azote des feuilles et les autres

paramètres de croissance (nombre de nodules, poids sec de la plante et hauteur de la plante) pour les combinaisons isolat-Chakkouf et isolat-Zaria.

Tableau 23. Efficience symbiotique des isolats sur les trois variétés de lentilles marocaines (Bakria, Chakkouf et Zaria).

Variété	Souche	Moyenne du nombre de Nodules	Moyenne poids sec des plantes (g)	Moyenne de la Taille des plantes (cm)	Moyenne de l'Azote totale des feuilles
	Témoin	0	0.1	6	6.000
Bakria	318N211	4	0.053	14.333	18.442
	686N5	14	0.1	19	9.289
	115N2	14	0.116	17.666	20.696
	1574N4	30	0.25	32	20.666
	318N2111	21	0.35	31.333	6.419
	996N2	36	0.516	34	20.749
	322N32	32	0.386	32.666	20.895
	1145N5	30	0.373	34.3333	21.031
	1159N32	27	0.17	19.66	15.583
	938N3	23	0,28	27	0,5
	1159N24	30	0.276	31.666	20.613
	996N5	3	0.23	30	20.885
	1159N52	15	0.1	17.5	20.697
	1145N1	26	0.14	23.5	20.916
512N1	31	0,29	28.666	0,5	
	Témoin	0	0.13	7	6.000
Chakkouf	318N211	22	0.316	29	17.169
	686N5	14	0.226	28.333	20.739
	115N2	22	0.186	25.333	20.968
	1574N4	29	0.243	31.666	13.756
	318N2111	23	0.13	22	20.728
	996N2	9	0.04	14.666	19.987
	322N32	16	0.183	23	18.714
	1145N5	28	0.153	28	21.146
	1159N32	20	0.146	19.666	20.906
	938N3	28	0.25	26	12.345
	1159N24	20	0.146	25.666	20.436
	996N5	6	0.06	18	11.825
	1159N52	15	0.213	21	20.697
	1145N1	36	0.26	29.5	3.830
512N1	18	0,23	23,33	13.567	
	T	0	0.17	5	6.000
Zaria	318N211	5	0.025	8.5	6.680
	686N5	8	0.083	13	9.247
	115N2	13	0.095	19.5	13.600
	1574N4	15	0.365	25.5	19.893
	318N2111	29	0.26	31.333	21.104
	996N2	17	0.086	21.666	8.005

322N32	17	0.175	28.5	20.801
1145N5	27	0.13	28	21.146
1159N32	23	0.146	25	6.607
938N3	33	0,206	26	5.741
1159N24	32	0.14	26.666	20.968
996N5	12	0.243	27	20.749
1159N52	14	0.146	21.333	20.436
1145N1	13	0.123	22	15.353
512N1	16	0,16	29,5	9.384

Les valeurs sont la moyenne de trois répliques \pm écart type, * représente une différence significative par rapport au contrôle non inoculé utilisant une ANOVA à une valeur $p < 0.05$.

➤ *Effizienz des isolats exprimée par la formation de nodules sur les trois variétés de lentille*

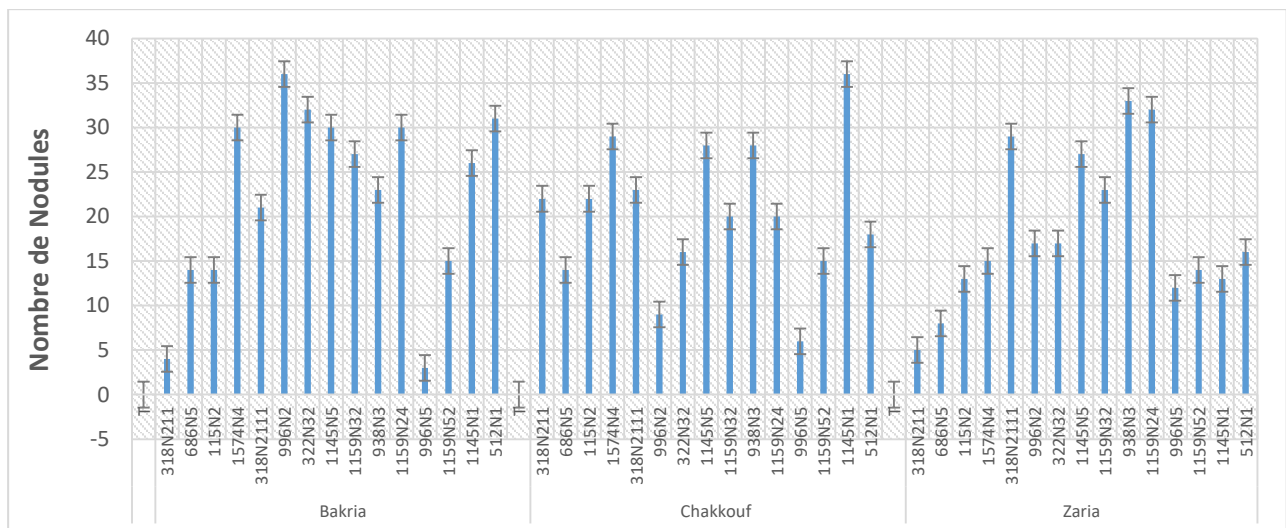


Fig 41. Nombre de nodules par variété de lentille (Bakria, Chakkouf et Zaria) suite à l'inoculation par différents isolats de *Rhizobium*.

➤ *Efficiéncie des isolats exprimée par le poids sec des trois variétés de lentille*

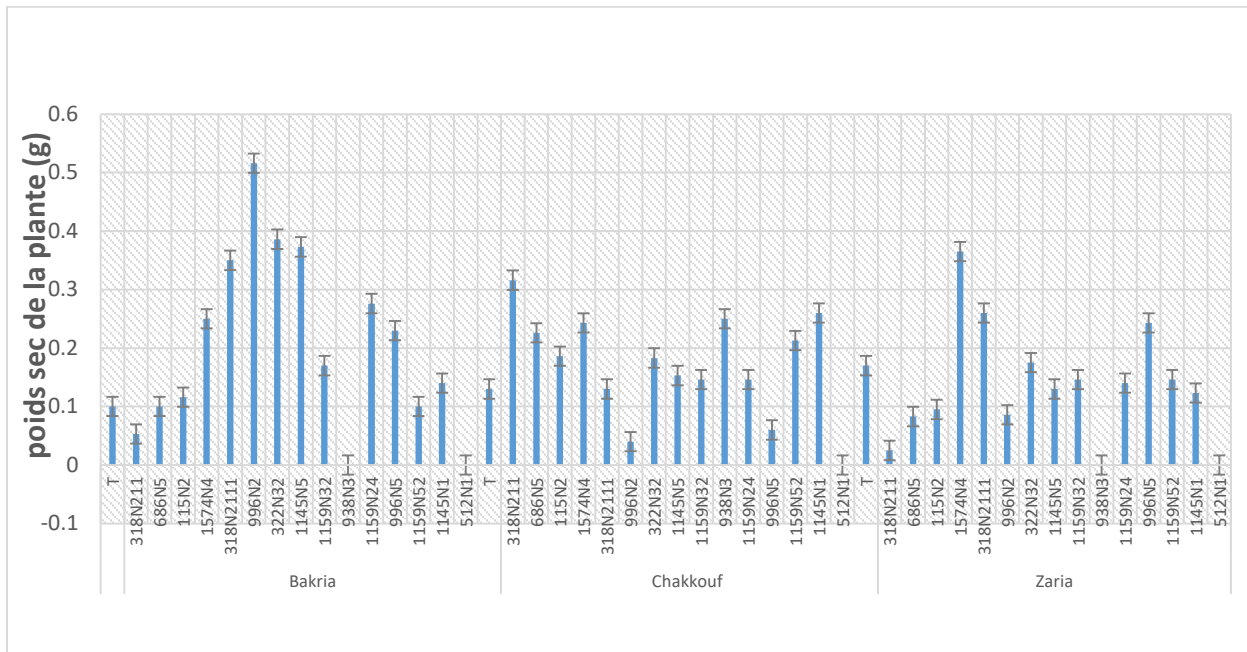


Fig 42. Poids sec en (gramme) des trois variétés de lentille (Bakria, Chakkouf et Zaria) suite à l'inoculation par différents isolats de *Rhizobium*.

➤ *Efficiéncie des isolats exprimée par la taille des plantules trois variétés de lentille*

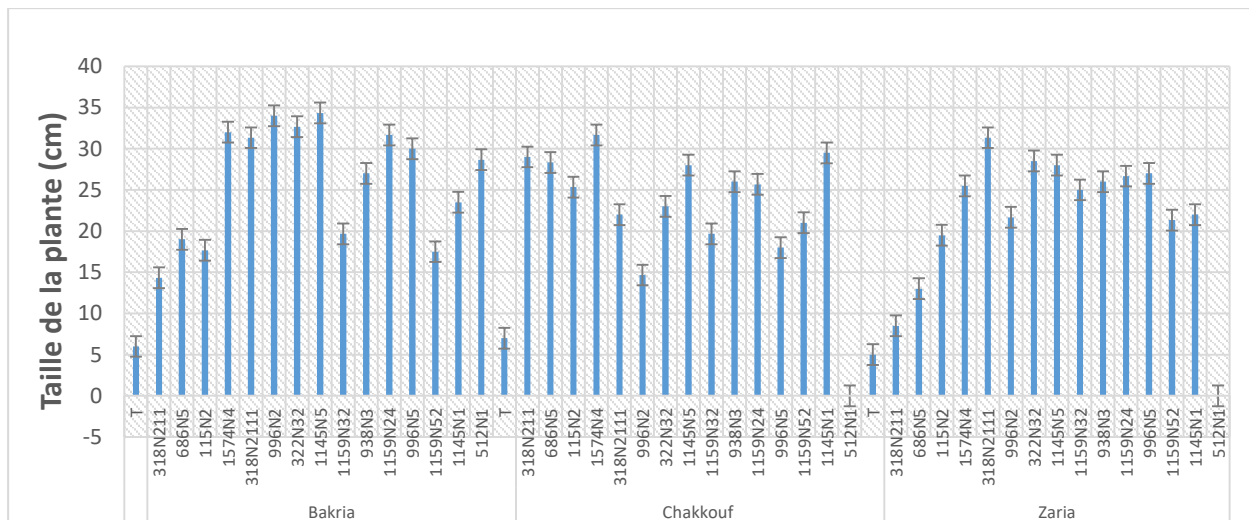


Fig 43. Taille de la tige en (Cm) des trois variétés de lentille (Bakria, Chakkouf et Zaria) suite à l'inoculation par différents isolats.

➤ *Effizienz des isolats exprimée par la teneur en Azote totale des feuilles des trois variétés de lentille*

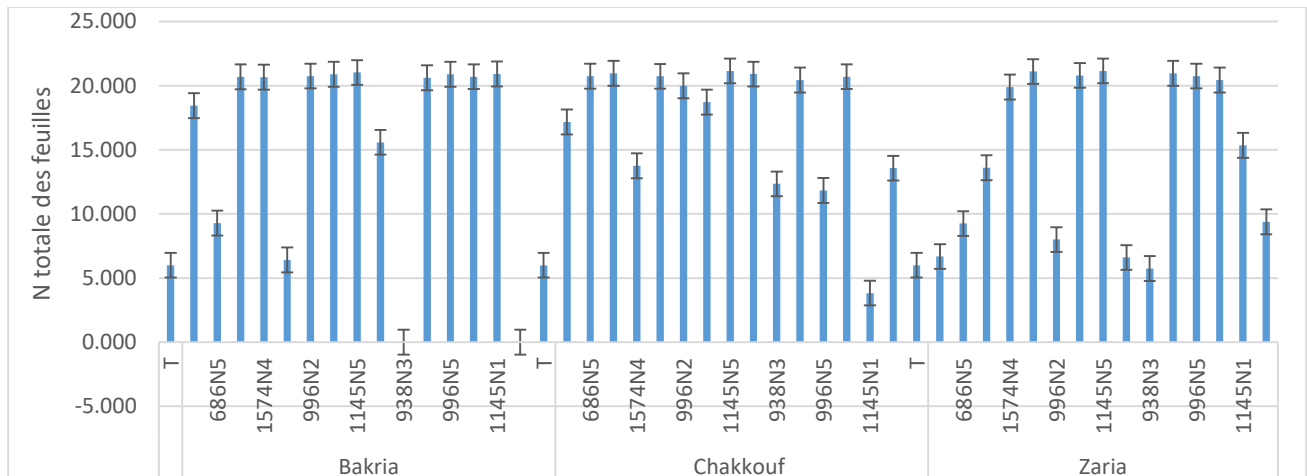


Fig 44. Poids sec des trois variétés de lentille (Bakria, Chakkouf et Zaria) suite à l'inoculation par différents isolats de *Rhizobium*.

7. Croissance des souches de *Rhizobium* sous stress abiotiques

7.1 Croissance sous stress hydrique

Les résultats acquis ont montré un effet significatif du stress hydrique sur la croissance des bactéries (Fig. 45). La diminution de la croissance des souches devient significative à la pression osmotique $\psi = -0.75$ MPa ou, par exemple, la croissance de la *R. leguminosarum* souche **996N2** ne dépasse pas 0.17 ± 0.001 (O.D) (Fig. 45). La *R. laguerreae* souche **1145N1** a montré une tolérance osmotique modérée avec un taux de croissance de 0.62 ± 0.005 (O.D) sous $\psi = -1.2$ MPa. Une haute tolérance osmotique a été exprimée par la *R. leguminosarum* souche **1159N32** avec un taux de croissance de 0.42 ± 0.04 (O.D) à $\psi = -2.6$ MPa, tandis que *Rhizobium* CIAT899 a montré une tolérance osmotique extrême avec 0.31 ± 0.05 (O.D) à $\psi = -3.7$ MPa (Fig. 45).

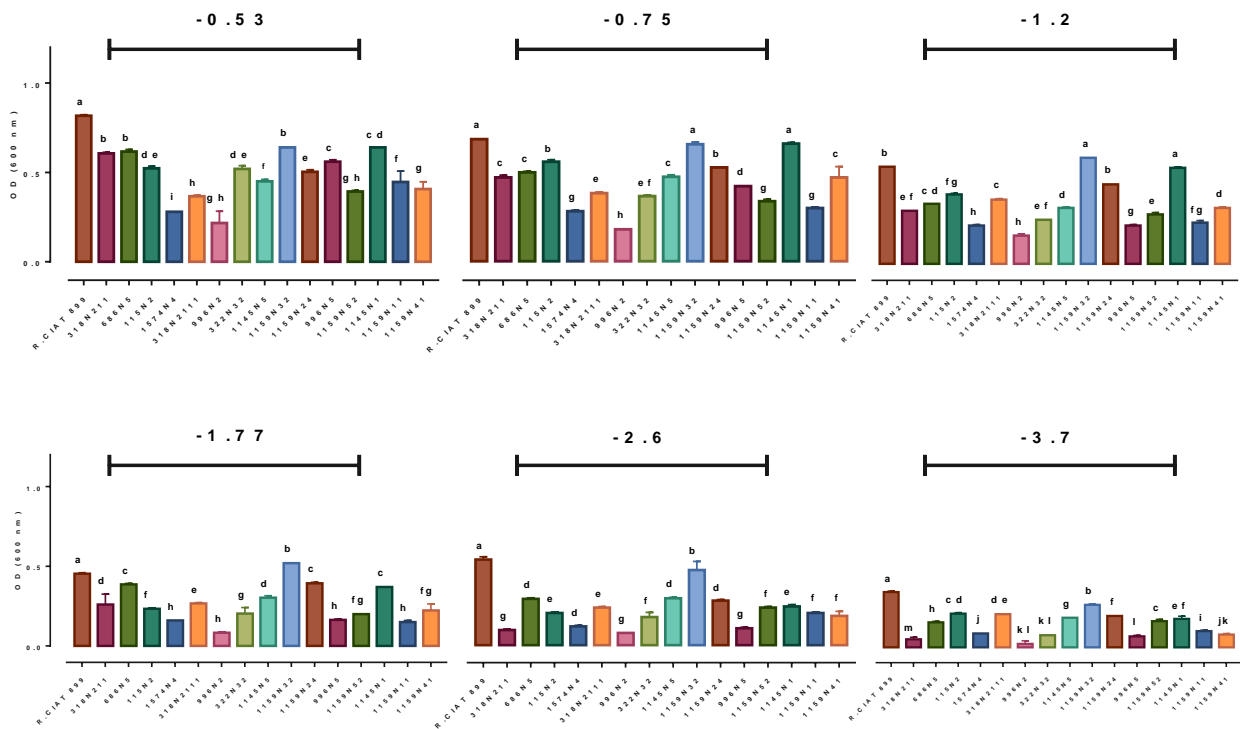


Fig 45. Croissance bactérienne sous des conditions de stress hydrique utilisant différents potentiels osmotiques ($\psi = -0,53$, $\psi = -0,75$, $\psi = -1,203$, $\psi = -1,77$, $\psi = -2,6$, $\psi = -3,7$ MPa). Les différentes lettres représentent les différences significatives entre les souches avec (LSD) ($P < 0,05$). O.D: Densité Optique.

7.2 Croissance sous stress salin

Le test qualitatif de tolérance au stress salin a montré différentes réponses parmi les souches étudiées. Par exemple, les souches *R. leguminosarum* 1159N11, *R. leguminosarum* 322N32 et *R. leguminosarum* 686N5 ont exprimé une sensibilité élevée à la salinité, alors que la tolérance au stress salin était extrêmement élevée chez *Rhizobium* sp. CIAT899, et les souches *R. leguminosarum* 686N5 et *R. leguminosarum* 318N211 (Fig. 46). Ces résultats ont été confirmés par le test quantitatif de salinité dans lequel les souches de *Rhizobium* ont été divisées en quatre catégories en termes de tolérance au sel. Les souches les plus sensibles au sel étaient *R. laguerreae* 318N211, *R. laguerreae* 1574N4, *R. leguminosarum* souche996N2, *R. leguminosarum* 322N32, *R. leguminosarum* 996N5, *R. leguminosarum* 1159N11 et *R. leguminosarum* 1159N41 avec un taux de croissance extrêmement faible sous 1% de NaCl. Les souches *R. leguminosarum* 115N2, *R. leguminosarum* 1159N5 et *R. laguerreae* 1145N1 présentaient une tolérance au sel modérée sous 3% de NaCl avec un taux de croissance de 0.56 ± 0.011 (OD), 0.67 ± 0.01 (OD) et 0.54 ± 0.01

(OD), respectivement. La souche *R. laguerreae* 1145N5 a montré une tolérance élevée au sel avec un taux de croissance de 0.58 ± 0.011 (OD). Les souches extrêmement halotolérantes étaient *Rhizobium* sp. CIAT899, *R. leguminosarum* 686N5 et *R. laguerreae* 318N2111 avec un taux de croissance de 0.30 ± 0.005 (OD), 0.36 ± 0.005 (OD) et 0.40 ± 0.005 (OD), respectivement, sous 5% de NaCl (Fig. 46).

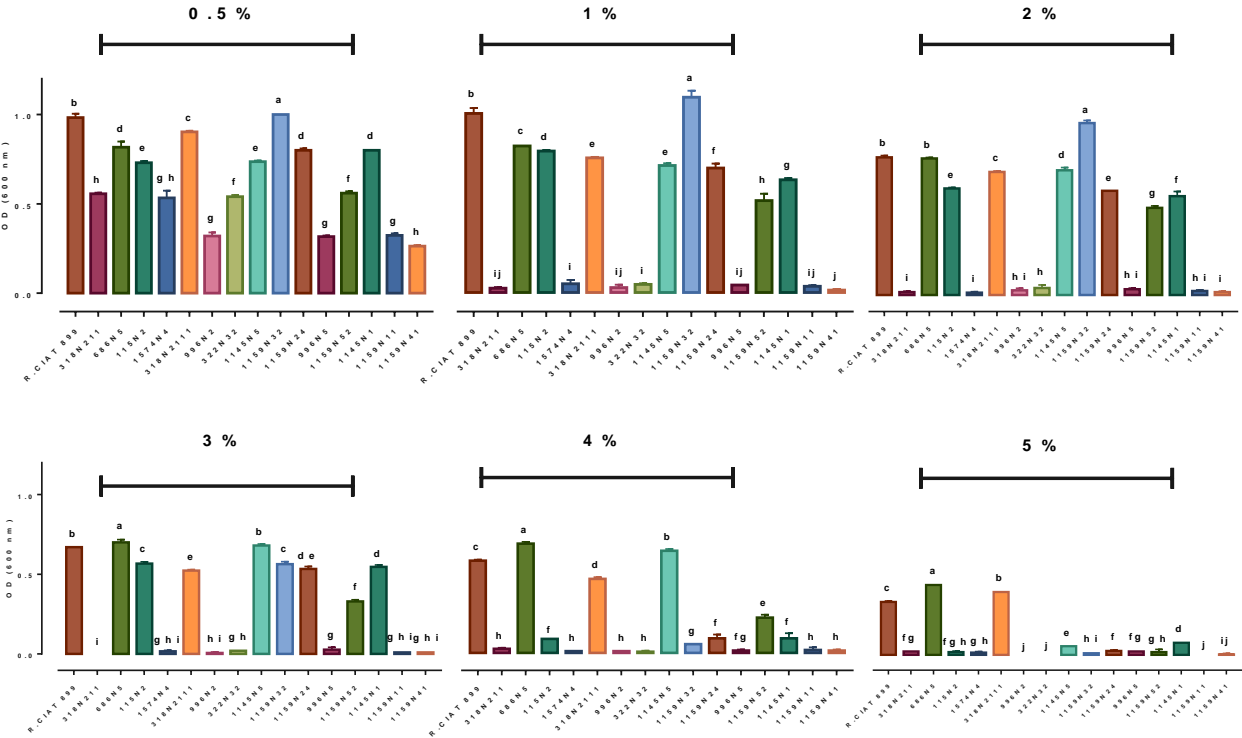


Fig. 46. Croissance bactérienne sous des conditions de stress salin utilisant différentes concentrations de NaCl (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%). Les différentes lettres représentent les différences significatives entre les souches avec (LSD) ($P < 0.05$). O.D: Densité Optique.

8. Evaluation de l'activité (PGP) des souches *Rhizobium*

➤ Test qualitatifs

Le test qualitatif des caractères de promotion de la croissance des plantes a montré une réponse diverse parmi les souches étudiées. Par exemple, les souches *R. leguminosarum* 686N5 et *R. leguminosarum* 996N5 étaient des productrices d' AIA, de sidérophores et solubilisatrices de phosphate, tandis que certaines souches, telles que *R. leguminosarum* 115N2 et *R. laguerreae* 1574N4, n'ont exprimé aucune de ces caractéristiques de promotion de la croissance des plantes (Tableau 24). De plus, le test de tolérance à la chaleur réalisé a montré que seules 5 souches de *Rhizobium* sur 16, sont capables de croître à 37 ° C, à savoir *Rhizobium* sp. CIAT899, 115N2, 1159N24, *R. leguminosarum* 996N5 et *Rhizobium* sp.1159N52 (Tableau 24). Cependant, aucune des souches de *Rhizobium* n'a pu se développer à des températures entre 40 ° C et 55 ° C. Sept souches de *Rhizobium* étaient des productrices de sidérophores avec un taux d'activité compris entre 1,18 cm et 2,07 cm (Tableau 24).

Tableau 24. Tests quantitatifs de tolérance au stress hydrique, stress salin et de l'activité de la Promotion de Croissance des Plantes.

Souches	16S rDNA A.N	S. S						H. T			PGPA		
		1%	1.50%	2%	3 %	4 %	5%	35 °C	37 °C	40°C-55°C	AIA	PS	S
<i>R. sp.</i> CIAT 899	NR10251 1	+++	+++	+++	++	++	++	+++	++	-	+	0.97±0.0 57 ^b	1.45±0.2 01 ^{bc}
318N211	MK48312 0	+++	+++	++	-	-	-	++	-	-	+++	-	1.18±0.6 81 ^d
686N5	MK48312 1	+	-	-	-	-	++	++	-	-	+	0.83±0.0 46 ^c	1.41±0.2 43 ^{cd}
115N2	MK48312 2	+++	+++	+++	++	++	-	+++	++	-	-	-	-
1574N4	MK48312 3	+++	+++	+++	++	++	+	+++	-	-	-	-	-
318N2111	MK48312 4	+++	+++	++	++	+	++	+++	-	-	+	-	-
996N2	MK48312 5	+++	+++	+++	++	++	+	+++	-	-	++	-	-
322N32	MK48312 6	+	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
1145N5	MK48312 7	+++	+++	+++	++	++	-	+++	-	-	-	0.97±0.5 60 ^{bc}	1.38±0.1 42 ^{bc}
1159N32	MK48312 8	+++	+++	+++	++ +	++	+	+++	-	-	+	0.82±0.7 51 ^{bc}	2.07±0.5 33 ^b
1159N24	MK48312 9	+++	+++	+++	++	++	-	+++	+	-	++	-	-
996N5	MK48313 0	+++	+++	+++	++	++	-	+++	++	-	+	0.72±0.2 84 ^c	1.83±0.3 93 ^d
1159N52	MK48313 1	+++	+++	+++	++	+	-	+++	+	-	+	-	1.58±0.1 48 ^b
1145N1	MK48313 2	+++	+++	+++	++	++	+	++	-	-	+++	-	-
1159N11	MK48313 3	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	2.1±0.61 7 ^c	-
1159N41	MK48313 4	+++	+	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-
<i>Azo.</i> <i>brasile</i> <i>DSM-1690</i>	NR11747 8	+++	+++	+++	++	++	+	+++	++	++	+++	-	2.07±0.7 16 ^a

A.N: numéro d'accension, S.S: Stress Salin, H.T: tolérance a la température, PGPA: activité de promotion de croissance des plantes, AIA: Indole Acetic Acid, PS : solubilisation de phosphate, S: Production de sidérophore. Les valeurs sont la moyenne de trois répliques ± écart type. (+++): production élevée/taux de croissance, (++) : production moyenne/Taux de croissance, (+): faible production/Taux de croissance, (-) : pas de production.

8.1 Solubilisation de phosphate

L'activité de la solubilisation du phosphate des souches de *Rhizobium* a montré une différence significative pour toutes les souches de *Rhizobium* à l'exception de la souche 115N2 (Fig. 47). Les souches *R. leguminosarum* 1145N5, *R. leguminosarum* 1159N11, *R. leguminosarum* 1159N32 et *R. leguminosarum* 996N5 ont montré la plus haute capacité de solubilisation de phosphate allant de 144.6 et 205.6 P2O5 ($\mu\text{g/ml}$). Les souches *Rhizobium* sp. CIAT899, 318N211 et 686N5 avec une capacité moyenne de solubilisation de phosphate allant de 54.16 and 124.3 P2O5 ($\mu\text{g/ml}$) (Fig. 47). La déviation du pH liée à l'activité de la solubilisation du phosphate a partagé les souches en deux catégories. La première avec un $\text{pH} \leq 4.5$ montrant une grande activité de solubilisation de phosphate et la seconde avec un $\text{pH} \geq 4.5$ montrant une activité moyenne de solubilisation de phosphate (Fig. 48).

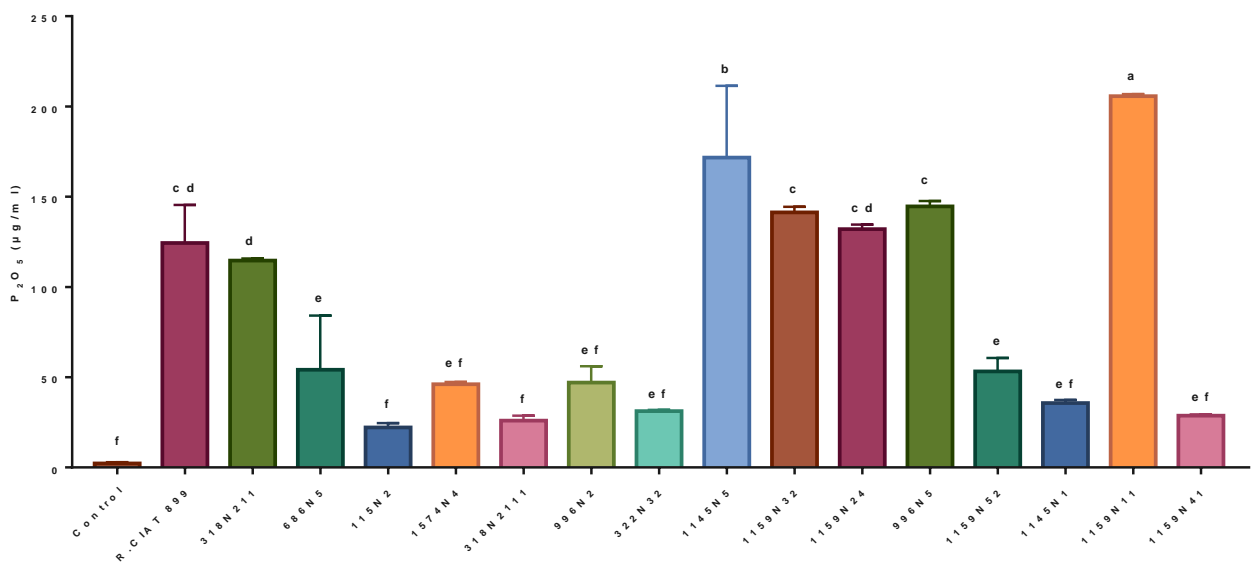


Fig 47. Activité de solubilisation du phosphate inorganique par les souches de *Rhizobium* et *Rhizobium* sp. CIAT988 (Gil-Serrano and *al.*, 1990) exprimée en ($\mu\text{g/ml}$). Les différentes lettres représentent les différences significatives entre les souches avec (LSD) ($P < 0.05$).

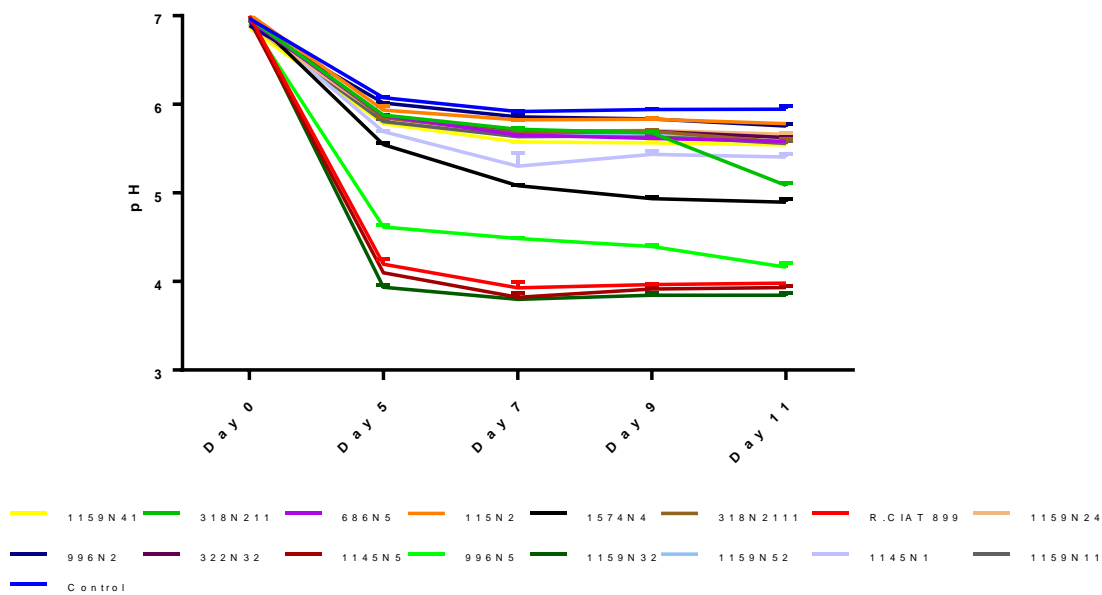


Fig 48. Variation du pH liée à l'activité de la solubilisation du Phosphate des souches de *Rhizobium* et *Rhizobium sp.* CIAT988 (Gil-Serrano and *al.*, 1990) durant 11 jours d'incubation.

8.2 Solubilisation de Phosphate sous stress hydrique

L'activité de solubilisation du phosphate a diminué de manière significative en fonction de la diminution du potentiel osmotique pour toutes les souches sélectionnées. Les souches *Rhizobium sp.* CIAT899 et *R. leguminosarum* 1159N11 ont maintenu leur activité de solubilisation du phosphate au-dessus de 100 P205 ($\mu\text{g} / \text{ml}$) aussi bien à $\psi = -0.21 \text{ MPa}$ qu'à $\psi = -0.53 \text{ MPa}$ (Fig. 49). Cependant, l'activité de solubilisation du phosphate de *Rhizobium sp.* CIAT899 a diminué de manière significative à $30 \pm 1.0 \text{ P205}$ ($\mu\text{g} / \text{ml}$) à $\psi = -0.75 \text{ MPa}$. Toutefois, la souche *R. leguminosarum* 1159N11 a maintenu une activité de solubilisation de phosphate modérée de $95.83 \pm 2.56 \text{ P205}$ ($\mu\text{g} / \text{ml}$) sous $\psi = -1.20 \text{ MPa}$. A $\psi = -3.7 \text{ MPa}$, toutes les souches étudiées ont perdu leur activité de solubilisation du phosphate, à l'exception des souches *R. leguminosarum* 1159N11, *R. leguminosarum* 996N5 et *Rhizobium sp.* CIAT899 où la solubilisation du phosphate a diminué à $23 \pm 4.0 \text{ P205}$ ($\mu\text{g} / \text{ml}$), $10.5 \pm 1.0 \text{ P205}$ ($\mu\text{g} / \text{ml}$) et $7,66 \pm 0,5 \text{ P205}$ ($\mu\text{g} / \text{ml}$), respectivement (Fig. 49). Globalement, les souches présentaient la même courbe évolutive de pH dans les différents niveaux de potentiel osmotique. Le pH a diminué de manière notable jusqu'à pH de $4,0 \pm 0,2$ à partir du 3ème jour d'activité de solubilisation du phosphate pour atteindre le pH $\sim 3,88 \pm 0,2$ au 11ème jour de l'expérimentation (Fig. 50).

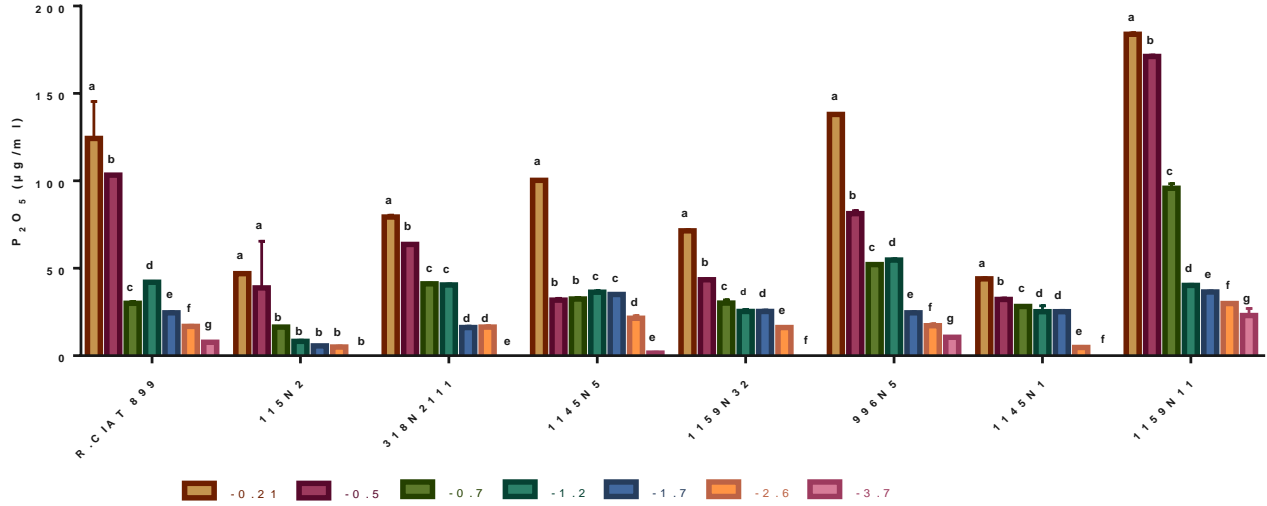


Fig 49. Activité de solubilisation de phosphate ($\mu\text{g/ml}$) sous stress hydrique des souches de *Rhizobium* sous différents potentiels osmotiques ($\psi = -0.53$, $\psi = -0.75$, $\psi = -1.23$, $\psi = -1.77$, $\psi = -2.6$, $\psi = -3.7$). Les différentes lettres représentent les différences significatives entre les souches avec (LSD) ($P < 0.05$).

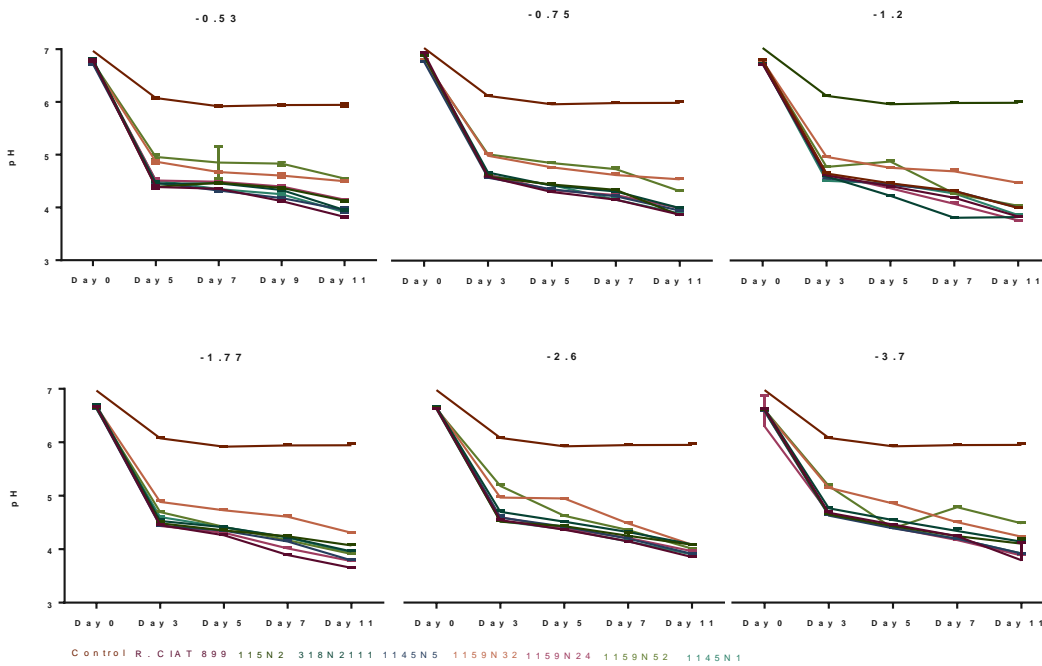


Fig 50. Variation du pH liée à l'activité de solubilisation de phosphate sous stress abiotique des souches de *Rhizobium* sous différents potentiels osmotiques ($\psi = -0.53$, $\psi = -0.75$, $\psi = -1.23$, $\psi = -1.77$, $\psi = -2.6$, $\psi = -3.7$) durant 11 jours d'incubation.

8.3 Solubilisation de phosphate sous stress salin

L'activité de solubilisation du phosphate des souches étudiées a été maintenue à un niveau élevé, sous 0,5%, 1%, 2% et 3% de NaCl, avec des valeurs comprises entre 136.5 ± 0.001 - 141.83 ± 1.15 P205 ($\mu\text{g} / \text{ml}$) pour *Rhizobium* sp. CIAT899, 161.50 ± 0.5 - 132.83 ± 0.28 P205 ($\mu\text{g} / \text{ml}$) pour *R. leguminosarum* 1145N5 et 159.0 ± 5.63 - 145.50 ± 0.86 P205 ($\mu\text{g} / \text{ml}$) pour *R. leguminosarum* 1159N11 mais les différences ne sont pas significatives entre ces souches (Fig. 51). L'activité de solubilisation du phosphate a commencé à diminuer à 4% et 5% de NaCl avec 82.66 ± 0.28 P205 ($\mu\text{g} / \text{ml}$) pour *R. leguminosarum* 1159N11 comme taux le plus élevé de P205 et 28.50 ± 0.86 P205 ($\mu\text{g} / \text{ml}$) pour *R. leguminosarum* 1145N5 comme taux le plus bas de P205 parmi les souches (Fig. 51). , Aucune diminution notable du pH dans les cultures de souches étudiées n'a été observée à 0.5% de NaCl à l'exception de *Rhizobium* sp. CIAT899 avec pH 3.8 ± 0.2 atteint le onzième jour d'incubation (Fig. 50). À 1% de NaCl, le pH a commencé à baisser pour atteindre une valeur d'environ 4.3 ± 0.2 le cinquième jour, puis a commencé à augmenter pour atteindre un pH de 5.03 ± 0.2 au onzième jour. Pour les autres concentrations 2%, 3%, 4% et 5% NaCl, le pH a diminué notablement jusqu'à 3.0 ± 0.6 au troisième jour, puis a commencé à augmenter pour atteindre le pH de 4.1 ± 0.2 au onzième jour (Fig. 52).

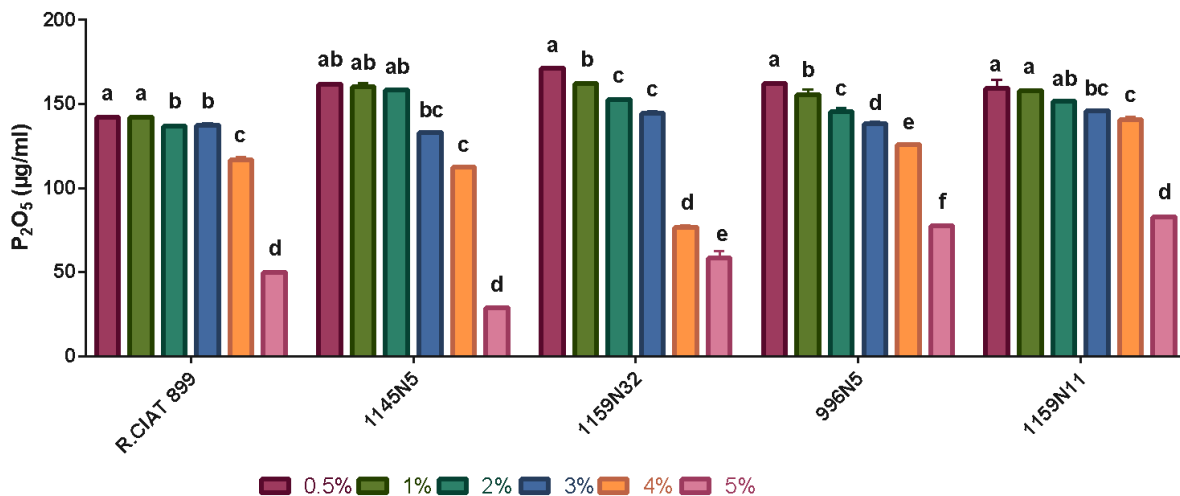


Fig 51. Activité de solubilisation de Phosphate ($\mu\text{g}/\text{ml}$) sous stress salin des souches de *Rhizobium* solubilisatrices de Phosphate utilisant différentes concentrations de NaCl (0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 3%, 4%, 5%). Les différentes lettres représentent les différences significatives entre les souches avec (LSD) ($P < 0.05$).

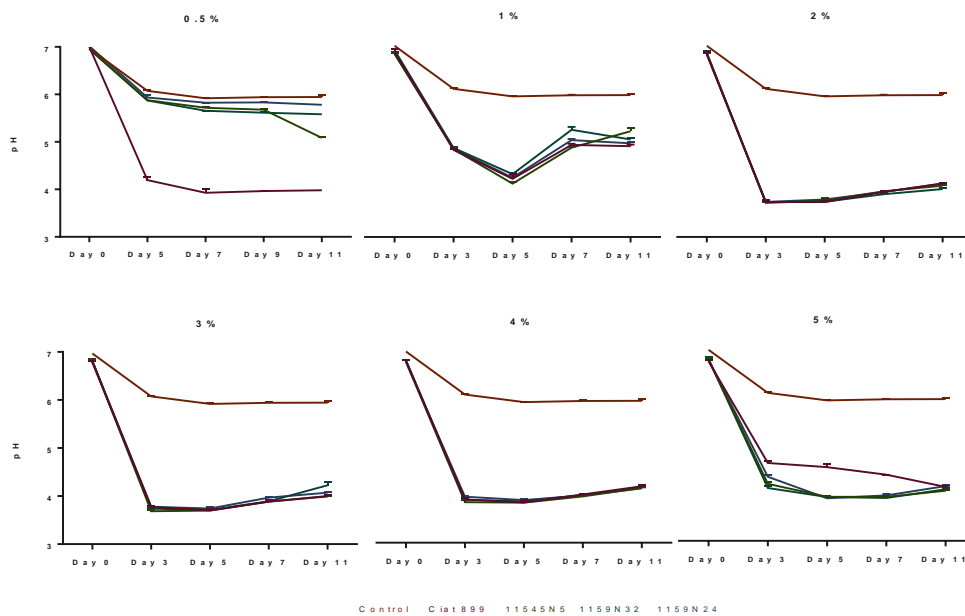


Fig 52. Déviation du pH liée à l'activité de solubilisation de Phosphate sous stress salin des souches de *Rhizobium* solubilisatrices de phosphate utilisant différentes concentrations de NaCl (0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 3%, 4%, 5%) durant 11 jours d'incubation.

Production de l' AIA (Acide indole-3-acétique) AIA (Indole Acetic Acid) a été significativement produite par toutes les souches de *Rhizobium* comparé au témoin à l'exception de la souche *R. leguminosarum* 115N2. La souche *R. leguminosarum* 686N5 a montré la valeur la plus élevée en termes de production d'AIA avec 57.68 ± 4.25 AIA ($\mu\text{g/ml}$) suivi par *Rhizobium* sp. CIAT899 avec 50.866 ± 1.41 AIA ($\mu\text{g/ml}$) et *Azo. brasilense* DSM-1690 avec 37.32 ± 12.592 AIA ($\mu\text{g/ml}$) (Fig. 53).

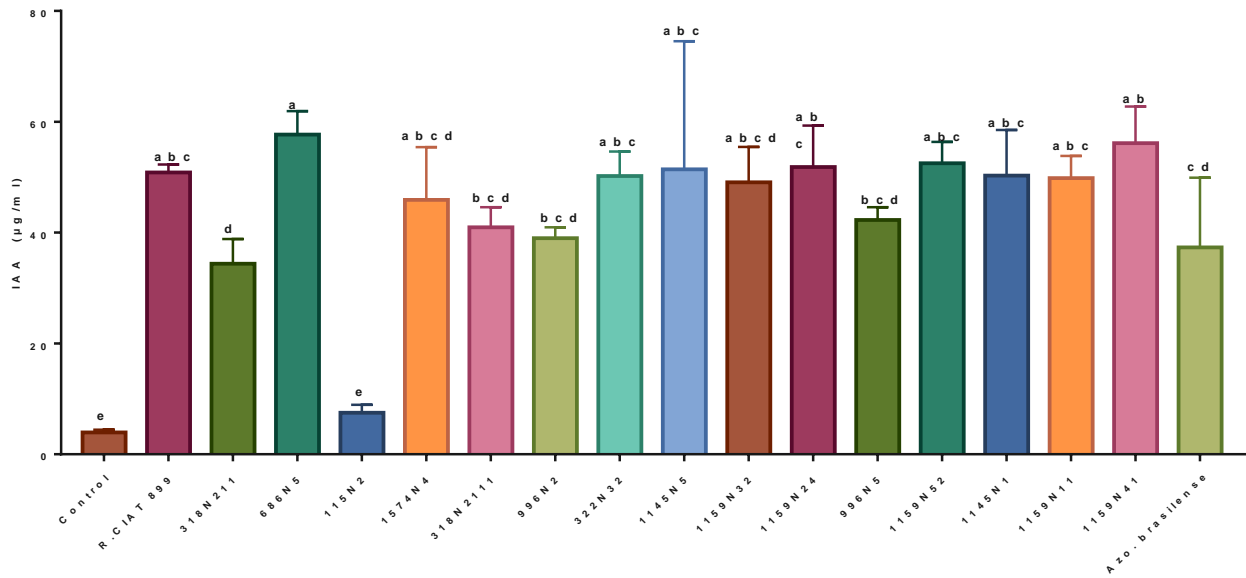


Fig 53. Production de l' AIA (Indole Acetic Acid) par les souches de *Rhizobium*, *Rhizobium sp.* CIAT988 (Gil-Serrano and *al.*, 1990) et *Azospirillum brasilense* DSM-1690 (Tarrand et *al.*, 1979) exprimée en (µg/ml). Les différentes lettres représentent les différences significatives entre les souches avec (LSD) ($P < 0.05$).

8.4 Production de l'Indole Acetic Acid (AIA) sous stress hydrique

La production d'AIA a diminué de manière significative en fonction de la diminution du potentiel osmotique. La production d'AIA a diminué de 74.77 ± 0.09 à $47.16 \pm 0,29$ d'AIA ($\mu\text{g} / \text{ml}$) pour *Rhizobium sp. CIAT899*, de 48.77 ± 0.09 à 4.92 ± 0.78 AIA ($\mu\text{g} / \text{ml}$) pour **318N2111** et de 84.13 ± 0.16 à 46.86 ± 0.9 AIA ($\mu\text{g} / \text{ml}$) pour **1145N5** sous $\psi = -0.21$, $\psi = -0.53$ et $\psi = -0.75$ MPa. Cependant, la production d'AIA par les souches a presque cessée sous $\psi = -1.20$, $\psi = -1.77$, $\psi = -2.6$ et $\psi = -3.7$ MPa (Fig. 54).

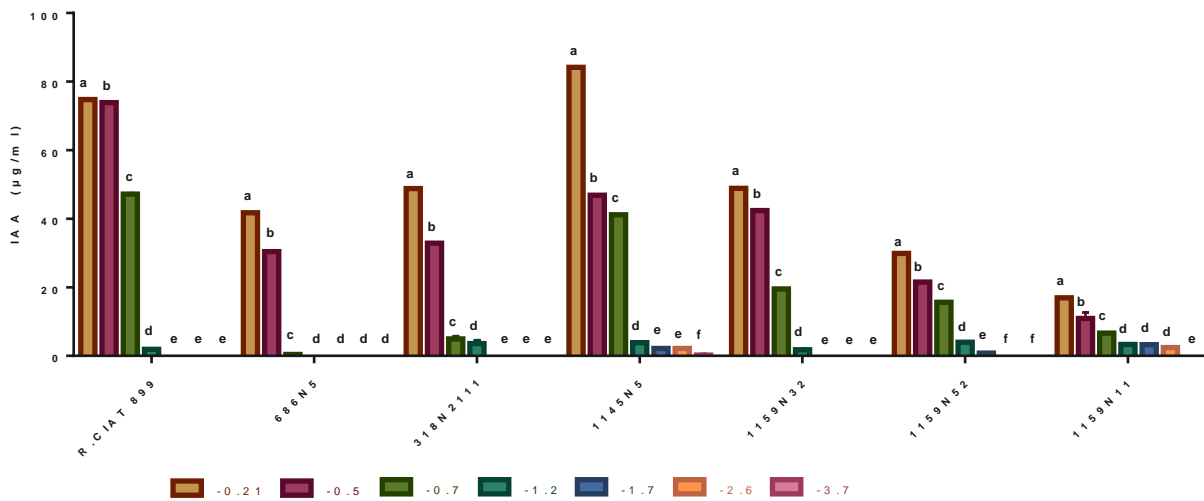


Fig. 54. Production de AIA (Indole Acetic Acid) ($\mu\text{g}/\text{ml}$) des souches de *Rhizobium* productrices de AIA sous des conditions de stress hydrique utilisant différents potentiels osmotiques ($\psi = -0.53$, $\psi = -0.75$, $\psi = -1.203$, $\psi = -1.77$, $\psi = -2.6$, $\psi = -3.7$). Les différentes lettres représentent les différences significatives entre les souches avec (LSD) ($P < 0.05$).

8.5 Production de l'AIA sous stress salin

La production d'IAA a considérablement diminué suite à l'augmentation de la concentration en NaCl. Par exemple, la production d'AIA a diminué de 42% pour atteindre 50.86 ± 1.41 AIA ($\mu\text{g} / \text{ml}$) pour *Rhizobium sp. CIAT899*, 89% atteignant 6.28 ± 0.77 AIA ($\mu\text{g} / \text{ml}$) pour *R. leguminosarum 686N5* et seulement 7% atteignant 77.32 ± 0.15 AIA ($\mu\text{g} / \text{ml}$) pour *R. leguminosarum 1159N11* à 0.5% par rapport au témoin. La diminution de la production d'AIA était plus prononcée à 1% de NaCl, 68% ($27,92 \pm 0,051$ AIA ($\mu\text{g} / \text{ml}$)) pour *Rhizobium sp. CIAT899*, 99% (0.32 ± 0.18 AIA ($\mu\text{g} / \text{ml}$)) pour *R. leguminosarum 686N5* et 40% (24.62 ± 0.051 AIA ($\mu\text{g} / \text{ml}$)) pour *R. leguminosarum 1159N11* par rapport au témoin. La production d'AIA s'est arrêtée pour

toutes les souches sauf pour *R. leguminosarum* **1159N11**, où la production d'AIA a diminué de 70% pour atteindre 24.62 ± 0.051 AIA ($\mu\text{g} / \text{ml}$) sous 2% de NaCl. Toutefois, aucune production d'AIA n'a eu lieu sous 3%, 4% et 5% de NaCl (Fig. 55).

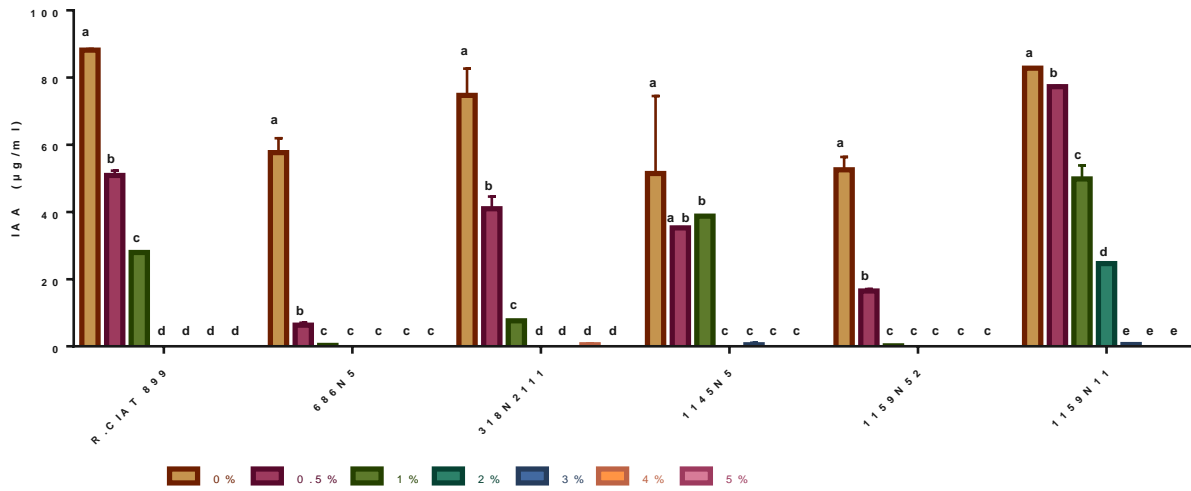


Fig. 55. Production de l' AIA (Indole Acetic Acid) ($\mu\text{g}/\text{ml}$) des souches productrices d' AIA sous des conditions de stress salin utilisant différentes concentrations de NaCl (0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 3%, 4%, 5%).

8.6 Production des Gibbérellines

Treize de dix-sept souches ont été productrices de GA3 avec une différence significative de taux de production (Fig 56). La souche *R. leguminosarum* **318N2111** a montré la production la plus élevée de GA3 avec 329.24 ± 7.84 GA3 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) suivi par *Azo. brasilense* **DSM-1690**, *R. laguerreae* **1145N1** et *R. leguminosarum* **996N2** avec 259.84 ± 25.55 GA3 ($\mu\text{g}/\text{ml}$), 230.1500 ± 8.25181 GA3 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) et 212.27 ± 9.83 GA3 ($\mu\text{g}/\text{ml}$), respectivement (Fig 56).

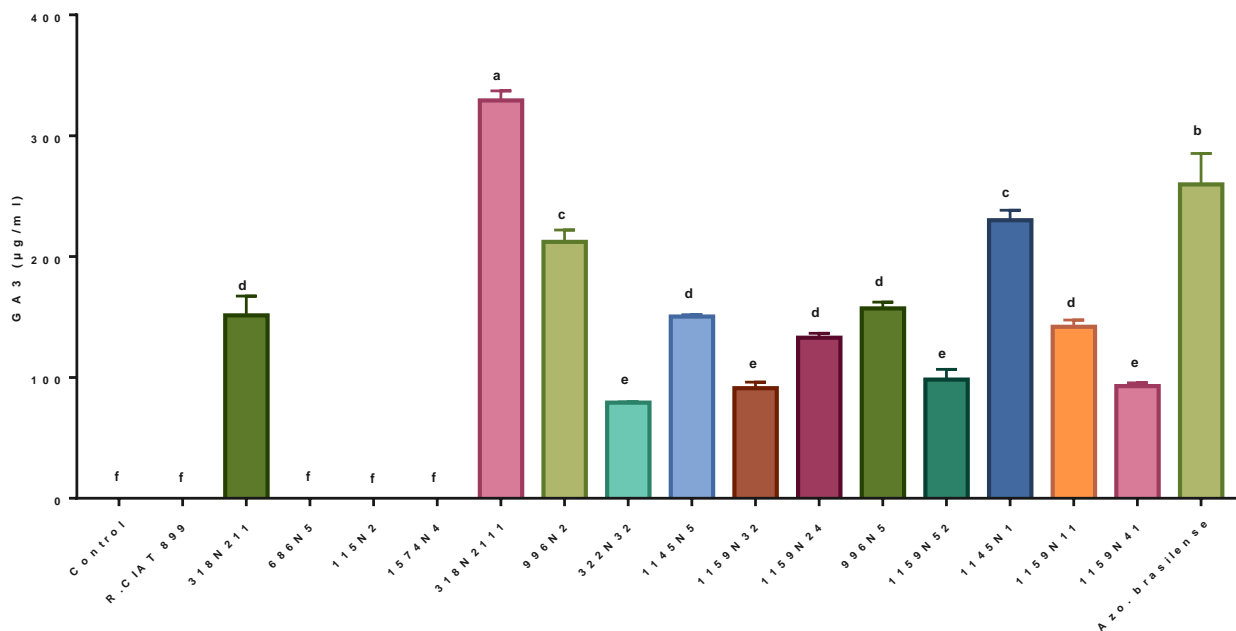


Fig 56. Production de GA3 (Gibberellic Acid) par les souches de *Rhizobium*, *Rhizobium sp.* CIAT988 (Gil-Serrano and *al.*, 1990) et *Azospirillum brasilense* DSM-1690 (Tarrand et *al.*, 1979) exprimée en (µg/ml). Les différentes lettres représentent les différences significatives entre les souches avec (LSD) ($P < 0.05$).

8.7 Production des sidérophores

Sept souches de *Rhizobium* étaient des productrices de sidérophores avec un taux d'activité compris entre 1,18 cm et 2,07 cm. La meilleure production en sidérophore a été observé chez *Azo. Brasilense* avec une activité de production 2.07 ± 0.716 (Cm) suivi par la souche *R. leguminosarum* 1159N32 avec une activité de production de 2.07 ± 0.533 . Le plus faible taux de production en sidérophore été observé chez la souche *R. laguerreae* 318N211 avec une activité de production de 1.18 ± 0.68 (Cm).

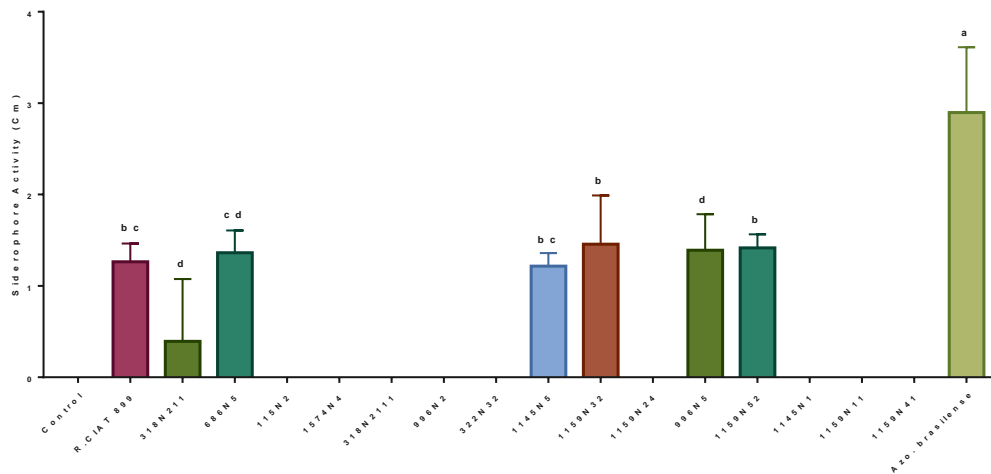


Fig 57. Production de Sidérophore par les souches de *Rhizobium*, *Rhizobium sp.* CIAT988 (Gil-Serrano and *al.*, 1990) et *Azospirillum brasilense* DSM-1690 (Tarrand et *al.*, 1979) exprimée en (Cm). Les différentes lettres représentent les différences significatives entre les souches avec (LSD) ($P < 0.05$).

8.8 Résultats généraux

Le tableau 25 résume la performance des souches *Rhizobium* étudiées en termes de d'efficacité symbiotique et de promotion de croissance des plantes à utiliser comme inoculum aux cultures de légumineuses et non-légumineuses dans les zones arides.

Tableau 25. Performance des souches de *Rhizobium* en termes d'efficacité symbiotique et de promotion de croissance des plantes sous stress abiotiques. S.P : solubilisation de phosphate, AIA : acide indole acétique.

Souches	Efficience Symbiotique			Activité S.P	Productions AIA	Production GA3	Production Sidérophores	Stress salin	Stress Hydrique
	Bakria	Chakkouf	Zaria						
318N211	-	-	-	-	-	-	-	-	-
686N5	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
115N2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1574N4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
318N2111	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-
996N2	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	-	+++
322N32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1145N5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1159N32	-	-	-	+++	-	+++	-	+++	+++
1159N24	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	+++
996N5	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
1159N52	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-
1145N1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1159N11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1159N41	-	-	-	-	-	-	-	-	-

V. Discussion

Plusieurs travaux ont rapporté que *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium elti* et *Rhizobium laguerreae* sont les symbiotes les plus répandus de la lentille en prenant uniquement en compte le lieu où la région dans laquelle la légumineuse a été cultivée (Rashid *et al.*, 2012; Rashid *et al.*, 2014; Tena *et al.*, 2017; Taha, 2018). Cependant, ces études se sont concentrées uniquement sur les souches isolées d'un emplacement ou d'une région donnée sans tenir compte de la diversité du génotype de l'hôte. Dans cette étude, la caractérisation moléculaire des isolats collectés à partir de 10 différentes accessions de lentilles a montré que les espèces *R. laguerreae*, *R. leguminosarum* et *M. huakuii* étaient les symbiotes nodulant les lentilles, ce qui suggère que l'échantillonnage de rhizobia de différents génotypes de lentilles est nécessaire pour capturer efficacement les différentes espèces de *Rhizobium* nodulante les lentilles. Un résultat similaire a été obtenu pour les associations *Bradyrhizobium*-soja par Lindström *et al.*, (2010).

Pour avoir un aperçu complet de la diversité de la population isolée de Rhizobia, une analyse phylogénétique a été réalisée à l'aide de différents marqueurs. Le gène de l'ADNr 16S est le principal marqueur utilisé pour la caractérisation bactérienne grâce à ses régions conservées, variables et hypervariables universelles parmi les bactéries, permettant une bonne classification au niveau de l'espèce (Clarridge, 2004; Das *et al.*, 2014). Cependant, de nombreuses études ont montré son incapacité à séparer des espèces étroitement apparentées telles que *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium multihospitium*, *Rhizobium minosarum* et *Rhizobium freirei* (Stackebrandt *et al.*, 1994; Saïdi, 2014; Tena *et al.*, 2017). Par conséquent, l'analyse phylogénétique des gènes de ménage et des gènes symbiotiques doit être utilisée pour une résolution plus grande (Tindall *et al.*, 2010). Certaines souches ont été positionnées différemment selon le gène considéré. Par exemple, la souche **1574N4** était proche de *R. laguerreae* pour *rpoB* et *recA*, de *R. leguminosarum* pour *gyrB* et *nodD* et de *Rhizobium elti* pour *nodA*. Cela pourrait s'expliquer par la différence d'évolution des gènes (Ludwig et Klenk, 2015) en raison de la pression sélective environnementale (Llorente *et al.*, 2016). Les gènes symbiotiques étaient plus conservés que les gènes de ménages au sein de la population isolée. Cela pourrait être dû au phénomène de HGT (transfert horizontal génétique) au sein de la population qui coexistent au même endroit, sachant que *nodD* et *nodA* sont des gènes localisés dans un grand plasmide transmissible (*sym*) (Žafran-Novak *et al.*, 2010). De plus, le gène *rpoB* présentait le taux de variabilité le plus élevé, exprimé par les indices Transition / Transversion, Distance Range et Pairwise Distance Average, comparé aux gènes *recA* et *gyrB* de

la population. Cette découverte est en accord avec la nature de chaque gène. En effet, le gène *rpoB* contient des zones hyper-variables permettant une identification rapide des bactéries au niveau des sous-espèces (Gundi *et al.*, 2009), tandis que les gènes *recA* et *gyrB*, largement utilisés pour la classification interspécifique des Rhizobia (Martens *et al.*, 2008; Ribeiro, 2009; Zou *et al.*, 2016) sont considérés comme des gènes très conservés et utiles pour différencier les espèces (Das *et al.*, 2014). Par conséquent, le gène *rpoB* reste le meilleur marqueur pour déchiffrer les relations entre des souches étroitement apparentées (Rong et Huang, 2014).

L'analyse des arbres phylogénétiques du *16S rDNA*, *recA* et *gyrB* ont permis de regrouper la souche **938N3** dans le genre *Mesorhizobium* avec une similarité de 100% avec *Mes. Huakui* et *Mes. Jarvisii* pour le gène *16S rDNA* et *Mes. Huakuii* pour les gènes *recA* et *gyrB*. Un résultat similaire a été rapporté par Dhaoui, *et al.* (2016) où la souche LB4 a été isolée de nodules de racine de lentille poussant dans diverses régions géographiques de la Tunisie. Cependant, l'analyse phylogénétique des séquences du gène *nodD* a permis de regrouper la souche **938N3** dans un groupe *Rhizobium* apparenté à *R. leguminosarum*. Cette extensive incongruence entre l'analyse phylogénétique des gènes de ménages et des gènes symbiotiques avait déjà été observée entre *Burkholderia* et *Mezorhizobium* suggérant que le transfert horizontal génétique peut se produire parmi les Rhizobia des alphaproteobacteria (Lemaire *et al.*, 2015).

Bien que le regroupement des souches isolées fût similaire pour certains gènes, par exemple, les gènes *rpoB* et *recA*, les résultats du test d'indice de congruence *I_{cong}* n'ont montré aucune congruence topologique entre les arbres individuels des gènes *rpoB*, *recA* et *gyrB* (Annexe 1). Les mêmes résultats ont été rapportés dans des études similaires montrant une discordance topologique entre les gènes (Nzoué *et al.*, 2009 ; Rafael *et al.*, 2012). En fait, Ludwig et Klenk (2015) rapportent qu'il ne faut pas s'attendre à une congruence topologique d'arbres phylogénétiques de gènes différents, car une information phylogénétique manquante ou des modifications au niveau de l'alignement pourraient avoir un impact significatif sur les résultats. Cependant, la seule congruence significative trouvée était entre l'arbre concaténé (*16SrRNA-rpoB-recA-gyrB*) et l'arbre *gyrB* avec un indice de congruence *I_{cong}* = 1.53 et une valeur de p = 0.001. Cette constatation correspond à nos résultats précédents concernant la conservation élevée du gène *gyrB* et l'effet de l'atténuation du HGT de l'analyse multi-gènes (MLSA).

Pour obtenir une résolution plus élevée et pour atténuer la distorsion du Transfert Horizontal des Gènes (HGT) (Rong et Huang, 2014), une MLSA a été réalisée sur la base de *16S rDNA* et des trois gènes de ménage (*rpoB*, *recA* et *gyrB*). L'analyse phylogénétique des gènes concaténés (***16SrDNA-rpoB-recA-gyrB***) a regroupé les souches en trois groupes apparentés à *Rhizobium*, avec deux groupes étroitement apparentés à *R. laguerreae* et *R. leguminosarum* et à un troisième groupe représenté avec un isolat unique (souche **1159N52**). La souche 1159N52 présentait la similarité la plus faible parmi les souches avec 96% de *R. leguminosarum*. De nombreuses études considèrent que 97% constitue le seuil permettant de définir une nouvelle espèce génétique (Ribeiro *et al.*, 2013 ; Cao *et al.*, 2014). Cependant, la différence entre les gènes concaténés utilisés dans l'approche MLSA peut avoir un impact sur la fiabilité du seuil compte tenu de l'évolution indépendante des gènes. Pour cela, nous avons proposé d'évaluer le seuil définissant les nouvelles espèces génétiques en considérant le pourcentage de similarité de la référence *Rhizobium* utilisée sur la base des gènes concaténés utilisés qui sont (***ADNr 16S-rpoB-recA-gyrB***) (Annexe 4). Sur la base de ce résultat, nous pouvons supposer que les souches **1159N52** et **1159N41** peuvent être considérées comme une nouvelle géno-espèce appliquant le seuil de 96% des espèces les plus proches (*R. laguerreae* et *R. leguminosarum*). Ainsi, une analyse moléculaire plus approfondie s'impose, et cela par le biais du séquençage totale du génome bactérien grâce au séquençage à haut débit NGS (Next Generation Sequencing).

Trois variétés améliorées ont été évaluées quant à leur efficacité symbiotique (Bakria, Chakkouf et Zaria). Bakria, enregistrée en 1984 au Maroc, est la variété prédominante utilisée par les agriculteurs marocains dans plusieurs régions du royaume. Ce choix vient du fait que la variété détient de nombreux critères tels que son rendement élevé, la taille de ses graines, sa précocité et sa tolérance à la rouille et à la sécheresse (Sarker, 2018). Les variétés Zaria et Chakkouf, enregistrées respectivement en 2003 et 2009 au Maroc, ont été proposées comme solution alternative pour surmonter les problèmes de récolte manuelle (Kumar *et al.*, 2013) et de la maladie causée par *Ascochyta* (causée par *Ascochyta fabae* Speg. *F. lens*) (Idrissi *et al.*, 2012).

Dans cette étude, la variété Bakria a montré la meilleure association avec la population isolée de *Rhizobia* en termes de nombre de nodules, de hauteur de la plante, de poids sec de la plante et de la teneur totale en azote dans les feuilles, suivie par les variétés Chakkouf et Zaria. Ce résultat pourrait s'expliquer par l'adaptabilité et la coévolution des associations génotype-*Rhizobia* (Heath et Tiffin, 2007) où la variété Bakria semble plus adaptée à la population *Rhizobia* autochtone que la variété Chakkouf et la variété Zaria. Cela pourrait être dû au fait que la variété Bakria est la variété

la plus répandue et a permis une sélection de la population des *Rhizobium*. En fait, l'efficacité symbiotique du symbiote repose principalement sur le génotype lui-même (Heath et Tiffin, 2007). Ferguson *et al.* (2019) ont signalé que l'hôte de légumineuses contrôle tout le processus symbiotique, à partir de l'invasion des *Rhizobia*, de la nodulation et même de la régulation de l'azote dans les nodules. Sachant que la variété Chakkouf est le résultat du croisement entre Bakria et ILL4349 (variété exogène), il se peut que la capacité d'adaptation à la population autochtone de *Rhizobia* ait moins d'adaptabilité, car la sélection a été centrée sur d'autres caractères, tels que la tolérance à la maladie *Ascochyta* (Idrissi *et al.*, 2012) que sur l'efficacité symbiotique. Ainsi, l'efficacité symbiotique devrait être considérée comme l'un des traits importants dans les programmes de sélection des légumineuses.

En outre, les corrélations ont été positivement significatives entre les paramètres de croissance pour l'association isolats-Bakria ($P \leq 0,05$). Cependant, aucune corrélation significative entre la teneur totale en azote dans les feuilles et les autres paramètres de croissance (nombre de nodules, poids sec de la plante et hauteur de la plante) n'a été observée pour les associations isolat-Chakkouf et isolat-Zaria. La fixation symbiotique de l'azote et la nodulation sont deux activités indépendantes régulées par des gènes différents. La fixation de l'azote symbiotique est principalement exprimée par le gène *nifH* codant pour l'enzyme nitrogénase (Raymond *et al.*, 2004), tandis que la nodulation résulte de l'expression des gènes *nod* régulée par le gène *nodD* (Schlaman *et al.*, 1992). Par conséquent, un nombre élevé de nodules ne signifie pas nécessairement une activité de fixation d'azote atmosphérique plus forte et donc une teneur en azote total plus élevée au niveau de la plante. De ce fait, la sélection des symbiontes doit se baser sur le pouvoir d'infectivité aussi bien que leur activités de fixation d'azote atmosphérique.

Le phosphore est le deuxième élément le plus important après l'azote (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Dans cette même étude, 15 des 16 souches de *Rhizobium* étaient des bactéries solubilisatrices de phosphate. Le taux d'activité de solubilisation de phosphate le plus élevé a été attribué aux souches de *Rhizobium* (*R. leguminosarum* 1145N5, *R. leguminosarum* 1159N11 et *R. leguminosarum* 1159N32) ayant une capacité de solubilisation du phosphate comprise entre 144.6 et 205.6 P_2O_5 ($\mu g / ml$). Bien que les sols agricoles puissent contenir une source élevée de phosphate, une grande partie de cet élément est disponible sous des formes insolubles que les plantes ne peuvent pas exploiter (Egamberdieva *et al.*, 2018). En fait, seulement 0.1% (Zou *et al.*, 1992), qui représente

0.01-3.0 P₂O₅ mg / L de P est disponible, ce qui ne couvre pas tous les besoins de la plante (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Ainsi, le phosphate soluble restant est acquis principalement par l'activité de solubilisation de phosphate par des microbes, y compris les Rhizobia (Afzal *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2013). De nombreuses études ont montré le potentiel des Rhizobia en termes d'activité de solubilisation de phosphate (Alikhani *et al.*, 2007; Afzal *et al.*, 2008; Sridevi *et al.*, 2009). Nos souches de *Rhizobium* présentaient un taux élevé d'activité de solubilisation du phosphate par rapport à ce qui avait été rapporté dans les études précédentes (Alikhani *et al.*, 2007; Saghafi *et al.*, 2018). En fait, Saghafi *et al.* (2018) ont signalé une activité de solubilisation du phosphate de deux souches (**Rlp281** et **Sm29**) avec un taux de 128 et 155 de P₂O₅ (µg / ml), respectivement, comme le taux le plus élevé des souches de *Rhizobium* isolées. De plus, Alikhani *et al.* (2007) ont rapporté que les Rhizobia iranien solubilisant le phosphate libéraient un taux de P₂O₅ compris entre 88.66 et 191.1 P₂O₅ (µg / ml), tandis que *Bacillus sp.* et *Pseudomonas fluorescens*, pris comme témoins positifs, ont libéré en moyenne 268.6 et 205.6 P₂O₅ (µg / ml), respectivement. En outre, le travail effectué par Alikhani *et al.*, (2007) a révélé la même forme de courbe du pH que celle trouvée dans notre étude, où la valeur du pH était égale à la moyenne du pH ≥ 4.

L'acide indole acétique (AIA) et l'acide gibbérellique (GA3) ont été produits de manière significative par la plupart des souches de *Rhizobium* par rapport au témoin. Nos résultats ont montré une performance élevée de nos souches de *Rhizobium* en termes de production de phytohormones. En fait, Saghafi *et al.*, (2019) ont rapporté deux Rhizobia producteurs d' AIA, (*R281* et *R307*), dont la production moyenne d' AIA ne dépassait pas 10.2 AIA (µg / ml). Presque le même taux de production d' AIA (10.3 ± 1.5) a été signalé avec *Pseudomonas fluorescens Ms-01* (Kadmiri *et al.*, 2018). De plus, *Bacillus cereus*, considéré comme l'une des meilleures bactéries favorisant la croissance des plantes, a montré une production maximale d'acide gibbérellique (GA3) de 205.58 GA3 (µg / ml) dans les mêmes conditions (Pandya et Desai, 2013). Les phytohormones jouent un rôle important dans la régulation du développement de la croissance des plantes ainsi que dans la tolérance aux stress abiotiques (Egamberdieva, 2013; Vurukonda, 2016). En fait, l' AIA augmente le système racinaire de la plante en déclenchant le développement d'un nombre élevé de bouts de racines, ce qui permet une meilleure absorption de l'eau et des nutriments (Shrivastava et Kumar, 2015; Vurukonda *et al.*, 2016; Mohammadipanah et Zamanzadeh, 2019) alors que l'acide gibbérellique est responsable de plusieurs mécanismes

physiologiques tels que l'élongation de la tige, la germination des graines et l'expression sexuelle (Kang *et al.*, 2014; Gopalakrishnan *et al.*, 2015;). Selon les résultats acquis, les souches de *Rhizobium* isolées pourraient constituer une source efficace de phytohormones pour une application exogène sur les plantes. La plupart des bactéries colonisant la rhizosphère sont productrices de phytohormones (Patten et Glick, 1996). En outre, de nombreuses études ont démontré l'efficacité de l'application exogène de phytohormones par l'inoculation avec des producteurs de phytohormones de rhizobactéries (Gruodien et Zvirnaite, 1971; Srinivasan et Gopalakrishnan, 1977; Barazani et Friedman, 1999; Spaepen et Vanderleyden, 2011).

Nos résultats ont montré que cinq souches de *Rhizobium* (*Rhizobium sp.* CIAT899, *R. leguminosarum* **115N2**, *R. leguminosarum* **1159N24**, *R. leguminosarum* **996N5** et *Rhizobium sp.***1159N52**) ont pu croître à une température de 37 °C. Cependant, aucune des souches de *Rhizobium* ne s'est développée à une température supérieure à 40 °C. On sait que la température optimale de croissance du genre *Rhizobium* se situe entre 28 et 31 °C. Néanmoins, certaines études ont montré que des souches du genre *Rhizobium* avait pu être isolé à 38 °C et parfois à 44 °C (Benidire *et al.*, 2018). De nombreux chercheurs ont remarqué que les rhizobia isolés dans des environnements chauds et secs peuvent même croître à 45 °C, mais ils perdent leur capacité à former des nodules efficaces (Hartel et Alexander, 1984; Karanja et Wood, 1988; Hungria et Franco, 1993).

Dans cette étude, six souches de *Rhizobium* (*R. leguminosarum* **318N211**, *R. laguerreae* **1574N4**, *R. leguminosarum* **996N2**, *R. leguminosarum* **322N32**, *R. leguminosarum* **996N5**, *R. leguminosarum* **1159N11** et *R. leguminosarum* **1159N41**) étaient sensibles au sel avec un taux de croissance extrêmement faible sous 1% NaCl, trois souches de *Rhizobium* (*R. leguminosarum* **115N2**, *Rhizobium sp.***1159N52** et *R. laguerreae* **1145N1**) poussaient à 3% de NaCl. La souche **1145N5** était capable de croître à 4% de NaCl et trois souches de *Rhizobium* (*Rhizobium sp.* CIAT899, **686N5** et **318N2111**) à 5% de NaCl. Les rhizobia sont considérés comme très diversifiés en ce qui concerne leur réponse à la salinité (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Par exemple, la plupart des souches de *Rhizobium leguminosarum* sont sensibles au sel et ne croissent pas à 2% de NaCl (Murray et Holt, 2005), tandis que les souches de *Rhizobium meliloti* sont classées comme tolérantes au sel (Zahran, 1999). Cependant, Benidire *et al.* (2018) ont signalé l'isolement d'une *Rhizobium sp.* hautement tolérant au sel (428 mM \pm 2.5% de NaCl). Il est intéressant de noter que

certaines souches de *Rhizobium leguminosarum* isolées du sol égyptien peuvent croître à 7% de NaCl (Shamseldin *et al.*, 2009).

Les souches de *Rhizobium* ont également été sélectionnées pour leur tolérance au stress dû à la sécheresse. Si l'on considère que 0.4 de turbidité (D.O) est la croissance bactérienne minimale dans des conditions abiotiques (Alikhani et Mohamadi; 2010), neuf souches sur 16 ont montré une tolérance à la sécheresse avec un potentiel osmotique $\psi = -0.75$ MPa alors que seules deux souches (*R. leguminosarum* **1159N32** et *Rhizobium sp.* CIAT899) ont présenté une tolérance élevée à la sécheresse à une pression osmotique supérieure à $\psi = -2,6$ MPa. Sandhya *et al.* (2009) ont estimé que $\psi = -0.75$ MPa était le seuil de sélection des bactéries tolérantes à la sécheresse. Afin d'éviter les conditions difficiles, les bactéries du sol utilisent divers mécanismes physiologiques tels que l'accumulation de solutés compatibles (proline, glycine bêtaïne, tréhalose, polyamines) (Serraj et Sinclair; 2002) et la production d'exopolysaccharides (Mohammadipanah et Zamanzadeh; 2019). La tolérance à la sécheresse bactérienne est si étroitement liée à la production d'exopolysaccharides que sa production est déclenchée par l'augmentation du potentiel hydrique du milieu de croissance bactérien (Sandhya *et al.*, 2009). De plus, les exopolysaccharides bactériens jouent un rôle important dans l'augmentation de la tolérance au sel des bactéries et des plantes. En fait, les exopolysaccharides rendent l'eau disponible et protègent l'environnement bactérien de la dessiccation et des cations Na⁺ (Upadhyay *et al.*, 2011; Shrivastava et Kumar, 2015; Vurukonda *et al.*, 2016). Cette étude a montré que la tolérance au sel ne coïncidait pas nécessairement avec la tolérance au stress hydrique des mêmes souches. C'est le cas de la souche *R. leguminosarum* **686N5** qui a montré une tolérance au sel extrêmement élevée en se développant à 5% de NaCl contre une tolérance modérée au stress de sécheresse sous $\psi = -0.75$ MPa. Mohammad *et al.* (1991) ont déjà rapporté cette indépendance en découvrant que les accessions de *Rhizobium meliloti* pouvaient mieux se développer à 616 mM de NaCl que sous $\psi = -1$ MPa, expliquant que le stress dû au sel et la tolérance à la sécheresse pouvaient être dus à différents mécanismes. En effet, de nombreuses études ont rapporté l'expression et la répression de différents gènes lorsque les bactéries sont exposées à un stress dû à la sécheresse ou au sel (Pandey et Mann, 2000, Rüberg *et al.*, 2003, Wei *et al.*, 2004, Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006). En fait, Rüberg *et al.*, 2003 ont rapporté que de nombreux gènes étaient induits en exposant *Sinorhizobium meliloti* uniquement à une pression osmotique plus élevée. Jiang *et al.*, (2004) ont identifié 5 gènes de tolérance au sel dans le génome de *Sinorhizobium fredii* RT19, notamment *phaD2*, *phaF2*, *phaG2*, principalement impliqués dans l'efflux de Na⁺. De plus, nous avons étudié les activités de solubilisation du phosphate et de

production d'AIA sous stress salin et hydrique. Les souches ont été capables de produire de l' AIA et de solubiliser le phosphate de manière significative sous les deux stresses. Egamberdieva *et al.*, (2018) ont signalé le même comportement en ce qui concerne la production d' AIA en présence de stress salin, deux souches (*Pseudomonas putida IT1* et *Strenoytophomonas rhizophila ep10*) produisant de l' AIA avec une teneur en NaCl de 1,5%. De plus, Kadmiri *et al.* (2018) ont signalé le maintien de l'activité de solubilisation du phosphate dans les deux souches étudiées (*Azospirillum brasilense* DSM-1690 et *Pseudomonas fluorescens* Ms-01) et une augmentation surprenante dans des conditions hypersalines.

Les microbes jouent un rôle majeur dans l'atténuation des stresses abiotiques des plantes et la carence en éléments nutritifs du sol (Piccoli et Bottini, 2013; Vurukonda *et al.*, 2016; Naveed *et al.*, 2017; Zahran, 2017; Mohammadipanah et Zamanzadeh, 2019). La production d'auxine apporte un équilibre aux hormones indigènes des plantes causées par les conditions défavorables d'environnement (Yang *et al.*, 2009). La solubilisation du phosphate bactérien aurait un impact positif sur la croissance des plantes, sachant que le phosphore est la clé de nombreuses interactions plante-microbe, y compris la fixation de l'azote (Vance, 2001).

Cette étude a montré une différence significative entre le taux de croissance des bactéries et leurs activités de solubilisation du phosphate et de production d' AIA sous les deux stresses. En fait, les traits de PGP des souches ont diminué et/ou arrêtés avant la limite de tolérance de la croissance bactérienne. Par exemple, *Rhizobium* sp. CIAT899 était capable de croître sous 5% de NaCl et $\psi = -3,7$ MPa. Cependant, son activité de solubilisation du phosphate a diminué de manière significative et l'activité de production d'AIA s'est même arrêtée de manière drastique à 2% de NaCl et à $\psi = -1.77$ MPa. Egamberdieva *et al.* (2018) ont signalé la même chose, dans laquelle *Pseudomonas putida IT1* maintenait son activité de production d'AIA sous 1.5% de NaCl, tandis que la souche pouvait se développer sous 3% de NaCl. Cette différence entre la viabilité bactérienne et l'activité bactérienne pourrait s'expliquer par la perturbation du mécanisme de régulation génétique communautaire appelé Quorum Sensing (QS) qui contrôle de nombreuses fonctions bactériennes, y compris les caractères favorisant la croissance des plantes (Bhattacharyya *et al.*, 2012). L'activité bactérienne est principalement liée à la densité de la population bactérienne par la synthèse des molécules de signal QS (Williams, 2007). Une fois que le seuil des molécules de signal est atteint, la communication entre la même population est déclenchée et l'expression ou la répression de gènes régulant l'activité PGP se produit. Ainsi, le déclin ou l'interruption de

l'activité de promotion de la croissance des plantes des souches de *Rhizobium* pourrait être due à la diminution de la densité de la population bactérienne due au stress salin et hydrique.

VI. Conclusion

Dans la présente étude, nous avons constaté que la lentille avait une sélection préférentielle de la population de rhizobia du sol, et cela en fonction du génotype hôte : certains génotypes de lentille préféreraient être nodulés par des souches appartenant aux espèces *R. laguerreae* alors que d'autres par *R. léguminosarum*. De manière surprenante, certains génotypes de lentille présentaient des spectres de symbiotes plus larges, ce qui leur permettait non seulement d'être associés à différents rhizobia à l'échelle de l'espèce mais également à l'échelle du genre. Ce fut le cas du germoplasme de lentille nodulé par une souche regroupée dans le genre *Mesorhizobium*. De plus, les résultats de l'évaluation de la performance symbiotique des trois variétés marocaines ont montré que la sélection de l'association génotype symbiote-hôte devrait commencer par la sélection du meilleur génotype en termes de traits agronomiques, y compris sa capacité à noduler avec de larges spectres de rhizobia. En effet, la sélection du symbiote, sans prendre en compte le génotype de l'hôte, aboutira à un échec puisque le succès de l'association symbiote-hôte repose principalement sur le génotype de la légumineuse hôte.

Bien que l'effet de l'hôte ait été confirmé en révélant la diversité génétique cachée des rhizobia dans le même lieu géographique et dans les mêmes conditions environnementales, nous ne savons pas si les autres facteurs, tels que la texture du sol et les conditions environnementales, pourraient influencer significativement sur la préférence symbiotique du génotype hôte. Ainsi, planter le même matériel génétique de lentille dans différents lieux géographiques et dans différentes conditions environnementales peut permettre de mieux comprendre la relation génotype rhizobia-hôte. Cette étude apporterait des informations utiles pour une sélection efficace du génotype rhizobia-hôte en vue d'une fertilisation azotée naturelle et durable.

De plus, l'étude de la diversité génétique a montré qu'une des souches de *Rhizobium isolees* pourrait être une nouvelle espèce de *Rhizobium* nodulant la lentille. Ainsi pour confirmer ce résultat, une identification moléculaire plus approfondie basée sur le séquençage du génome bactérien est nécessaire.

Par ailleurs, nous confirmons la capacité du *Rhizobium* à être utilisé non seulement pour les légumineuses en tant que fixateur d'azote, mais également pourrait être utilisé en tant que promoteur de croissance des plantes (PGPRs). Les défis à relever pour utiliser les rhizobactéries en tant que biofertilisants pour différentes cultures consistent à ce qu'elles expriment leurs activités

de Promotion de la croissance des plantes dans des conditions environnementales difficiles. Cette étude a montré que le criblage d'inoculant basé uniquement sur leurs performances de promotion de la croissance des plantes et de tolérance au stress ne suffit pas. Ainsi, nous proposons un nouveau concept de dépistage basé sur la tolérance de l'activité PGP sous stress.

Afin de confirmer les performances du *Rhizobium* en tant que promotrices de croissance des plantes (PGPRs), des tests dans les pots sous et des tests au niveau du champs doivent être effectués sur les cultures céréalières en utilisant des marqueurs morphologiques (telles que la perte en eau relative, la conductance stomatique, etc.) physiologiques (telles que la teneur en proline, la peroxydase lipidique, etc.) et moléculaires (tels que les gènes induits par le stress, les gènes liés au stress, etc.) du stress abiotique de la plante comme effet indirect de l'inoculation bactérienne.

D'après les résultats de notre étude, les meilleures associations en termes de performance symbiotique ont été l'association **Bakria-*R. leguminosarum* Souche996N2**, l'association **Chakkouf-Souche318N2111** et l'association **Zaria- *R. leguminosarum* Souche996N2**, respectivement. En ce qui concerne l'utilisation des souches en tant que promotrice de croissance des plantes, l'étude a montré que la Souche *R. leguminosarum* 159N32 suivie par la souche *R. leguminosarum* 1159N24 sont les meilleures candidates à être utilisées comme inoculum aux cultures céréalières dans les zones arides.

VII. Reference

- Afzal, A., & Bano, A. S. G. H. A. R. I. (2008).** Rhizobium and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). *Int J Agric Biol*, 10(1), 85-88.
- Alikhani, H. A., Saleh-Rastin, N., & Antoun, H. (2007).** Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. In *First international Meeting on microbial phosphate solubilization* (pp. 35-41). Springer, Dordrecht.
- Alikhani, H. A., & Mohamadi, L. (2010).** Assessing tolerance of rhizobial lentil symbiosis isolates to salinity and drought in dry land farming condition. In *19th world congress of soil science, soil solutions for a changing world* (pp. 1-6).
- Atlas R.M., 1983.** *Handbook of Microbiological Media*, Ed. By Parks L., CRC Press, Inc.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1987).** "Unit 2.4 Preparation of genomic DNA from bacteria." In *Current Protocols in Molecular Biology*, pages 2.4.1–2.4.2. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Sunderland, Massachusetts.
- Alexandre A., Laranjo M., Young J.P. and Oliveira S. 2008.** dnaJ is a useful phylogenetic marker for alphaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Biology* 58, 2839–2849.
- Adachi, J., & Hasegawa, M. (1996).** MOLPHY version 2.3: programs for molecular phylogenetics based on maximum likelihood (No. 28). Tokyo: Institute of Statistical Mathematics.
- Alexander M. (1985).** Ecological constraints on nitrogen fixation in agricultural ecosystems. *Adv. Microbial Ecology*, 8 : 163-183.
- Ampomah, O. Y., & Huss-Danell, K. (2016).** Genetic diversity of rhizobia nodulating native *Vicia* spp. in Sweden. *Systematic and applied microbiology*, 39(3), 203-210.
- Alexandre, A., Laranjo, M., Young, J. P. W., & Oliveira, S. (2008).** dnaJ is a useful phylogenetic marker for alphaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(12), 2839-2849.
- Allahyari, M. S. (2009).** Agricultural sustainability: Implications for extension systems. *African Journal of Agricultural Research*, 4(9), 781-786.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Abdullahi, A. A., Howieson, J., O'Hara, G., Terpolilli, J., Tiwari, R., & Yusuf, A. A. (2020).** History of Rhizobia inoculants use for improving performance of grain legumes based on experience from Nigeria. In *Just Enough Nitrogen* (pp. 101-113). Springer, Cham.

Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173–181

Akhtar N, Qureshi MA, Iqbal A, Ahmad MJ, Khan KH (2012) Influence of *Azotobacter* and IAA on symbiotic performance of *Rhizobium* and yield parameters of lentil. *J Agric Res* 50:361–372

Bashan, Y., Holguin, G., & Lifshitz, R. (1993). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, 331-345.

Begum, A. A., Leibovitch, S., Migner, P., & Zhang, F. (2001). Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *Journal of Experimental Botany*, 52(360), 1537-1543.

Bernhard, A. (2010). The nitrogen cycle: Processes. Players, and Human.

Berrada H, Fikri-Benbrahim K. 2014. Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. *Br. Microbiol. Res. J.* 4:616–639. <http://dx.doi.org/10.9734/BMRJ/2014/5635>.

Bessam, F., & Mrabet, R. (2003). Long-term changes in soil organic matter under conventional tillage and no-tillage systems in semiarid Morocco. *Soil Use and Management*, 19(2), 139-143.

Broughton, W. J., & Dilworth, M. J. (1970). Methods in legume-rhizobium technology: plant nutrient solutions. *Handbook for rhizobia*, 245-249.

Bradstreet, R. B. (1954). Kjeldahl method for organic nitrogen. *Analytical Chemistry*, 26(1), 185-187.

Bejiga, G. (2006). *Lens culinaris* Medik. Brink, M., Belay, G.(Editeurs). PROTA, 1.

Barulina, O. H. (1930). Lentil of USSR and of other countries. *Bull. Appl. Bot. Genet. Pl. Breed.*, 40, 1-319.

Benmati, M., & Djekoun, A. (2014). PGPR, paranodules, stimulation de la croissance et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.): Aspects moléculaires et génétiques. *Université Constantine*, 1, 87-150.

Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.

Baldani, VLD., Baldani, JI., Döbereiner, J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbapirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol Fert Soils* 30:485–491.

Bohlool, B. (1990). Introduction to nitrogen fixation in agriculture and industry: contribution of BNF to sustainability of agriculture. In: Gresshoff P, Roth L, Stacey G, Newton W (eds) *Nitrogen fixation: achievements and objectives*. Chapman & Hall, New York, pp 613–616.

Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Cassán, F., Luna, V. (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74:874–880.

Bensalim, S. Asiedu, S., Nowak, J. (1998). A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. *American Journal of Potato Research* 75(3):145-152.

Bano, A., & Fatima, M. (2009). Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*, 45(4), 405-413.

Barazani, O. Z., & Friedman, J. (1999). Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology*, 25(10), 2397-2406.

Barber, S. A. (1995). Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. John Wiley & Sons.

Benidire, L., Lahrouni, M., Daoui, K., el Abidine Fatemi, Z., Carmona, R. G., Göttfert, M., & Oufdou, K. (2018). Phenotypic and genetic diversity of Moroccan rhizobia isolated from *Vicia faba* and study of genes that are likely to be involved in their osmotolerance. *Systematic and applied microbiology*, 41(1), 51-61.

Bala, A. (2011). Emerging challenges in cross-border movement of inoculants in sub-Saharan Africa. N2Africa Podcaster, 8, 3–4. Available online at: <http://www.n2africa.org/sites/n2africa.org/files/N2Africa%20Podcaster%208.pdf>. Accessed 7 August 2018.

Boncompagni E, Osteras M, Poggi MC, Ie Rudulier D (1999) Occurrence of choline and glycine betain uptake and metabolism in the family Rhizobiaceae and their roles in osmoprotection. *Appl Environ Microbiol* 65:2072–2077

Barassi CA, Ayrault G, Creus CM, Sueldo RJ, Sobrero MT (2009) Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *Sci Hortic* 109:8–14.

Caba, JM., Centeno, ML., Fernandez, B., Gresshoff, PM., Liger, F. (2000). Inoculation and nitrate alter phytohormone levels in soybean roots: differences between a super nodulating mutant and the wild type. *Planta*, 211:98–104.

Chabot R., Antoun H., Cescas M. (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant Soil*, 184:311–321.

Creus C.M., Sueldo R.J., Barassi C.A. (2004). Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Can. J. Bot.* 82 273–281.

Cao, Y., Wang, E. T., Zhao, L., Chen, W. M., & Wei, G. H. (2014). Diversity and distribution of rhizobia nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 78, 128-137.

Clarridge III, J.E., (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 840–862.

Cubero, J. I. (1981). Origin, taxonomy and domestication [lentils].

Ceccarelli, S., Erskine, W., Hamblin, J., & Grando, S. (1994). Genotype by environment interaction and international breeding programmes. *Experimental agriculture*, 30(2), 177-187.

Chahota, R. K., Kishore, N., Dhiman, K. C., Sharma, T. R., & Sharma, S. K. (2007). Predicting transgressive segregants in early generation using single seed descent method-derived micro-macrosperma genepool of lentil (*Lens culinaris* Medikus). *Euphytica*, 156(3), 305-310.

Chun, J., & Hong, S. G. (2010). Methods and programs for calculation of phylogenetic relationships from molecular sequences. *Molecular phylogeny of microorganisms*. Caister Academic Press, Norfolk, 23-39.

Capellini, I., Venditti, C., & Barton, R. A. (2010). Phylogeny and metabolic scaling in mammals. *Ecology*, 91(9), 2783-2793.

Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G., & Thompson, J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic acids research*, 31(13), 3497-3500.

Chaiharn M Lumyong S (2009). Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. *W J Microbiol Biotechnol* 25: 305-314.

Chandra R, Pareek RP (2002) Effect of rhizobacteria in urd bean and lentil. *Ind J Pulse Res* 15:152–155

Deanand BJ, Patil AB, Kulkaarni JH, Algawadi AR (2002) Effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth and yield of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 159:371–394

Dashadi M, Khosravi H, Moezzi A, Nadian H, Heidari M, Radjabi R (2011) Co-inoculation of *Rhizobium* and *Azotobacter* on growth indices of faba bean under water stress in the green house condition. *Adv Stud Biol* 3:373–385

Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Arnedo, R., Becker, A., Olivares, J., Soto, M. J., & Sanjuán, J. (2006). Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*, 188(21), 7617-7625.

Dazzo, F. B. (1984). Leguminous root nodules. In: *Experimental Microbial Ecology*. Editors by R. Burns and J. Staler, Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Dazzo, F. B. (1997). Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil*, 194:99–114.

De Vienne D.M., Giraud, T. and Martin, O.C. 2007. A Congruence Index for Testing Topological Similarity between Trees. *Bioinformatics* 23 (23): 3119-312.

DeLong EF (1992). Archaea in coastal marine environments. *PNAS*, 89(12): 5685-5689.

Dhaoui, S., Rejili, M., Mergaert, P., & Mars, 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), fiw118.

Davet, P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. Editions Quae.

Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., & Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 103, 80-100.

Dupuy, Y., & Nougier, P. (2005). Les microorganismes. Du gène à la biosphère. Edition Ellipses.

Ecocrop, (2012). Ecocrop database. FAO

Egamberdieva, D. (2013). The role of phytohormone producing bacteria in alleviating salt stress in crop plants. *Biotechnological techniques of stress tolerance in plants*. Studium, Houston, TX, 21-39.

Egamberdieva, D., Wirth, S., & Abd_Allah, E. F. (2018). Plant hormones as key regulators in plant-microbe interactions under salt stress. In *Plant Microbiome: Stress Response* (pp. 165-182). Springer, Singapore.

Eddy, S. R. (2004). Where did the BLOSUM62 alignment score matrix come from?. *Nature biotechnology*, 22(8), 1035.

Eaton, A.D., L.S. Clesceri, and A.E. Greenberg (ed.). 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Erskine, W. (2009). The lentil: botany, production and uses. CABI.

El-Tayeb TS, Khodair TA (2006). Enhanced production of some microbial exo-polysaccharides by various stimulating agents in batch culture. *Res J Agric Biol Sci* 2(6):483–492.

Egamberdieva D, Berg G, Lindström K, Räsänen LA (2013) Alleviation of salt stress of symbiotic *Galega officinalis* L. (Goat's Rue) by co-inoculation of *Rhizobium* with root colonizing *Pseudomonas*. *Plant Soil* doi: 10.1007/s11104-013-1586-3

Egamberdieva D (2009) Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiol Plant* 31:861–864.

Egamberdiyeva D, Islam KR (2008) Salt tolerant rhizobacteria: Plant growth promoting traits and physiological characterization within ecologically stressed environment. In: Ahmad I, Pichtel J, Hayat S (eds) *Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, pp 257–281.

Elkoca E, Kantar F, Sahin F (2008) Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth and yield of chickpea. *J Plant Nutr* 31:157–171

FAO. (1984). Legume inoculants and their use. A pocket manual jointly prepared by Nitrogen Fixation for Tropical Agricultural Legumes (NifTAL) Project, USA and FAO Fertilizer and Plant Nutrition Service Land and Water Development Division in association with FAO Crop and Grassland Production Service. Rome: Food and Agriculture Organization of the United

Nations. Available online at <http://www.ctahr.hawaii.edu/bnf/Downloads/Training/Legume%20use/Title.PDF>. Accessed 7 August 2018.

Fox SL, O'Hara GW, Brau L (2011) Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *medicae* WSM419. *Plant Soil* 348:245–254

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*, 17(6), 368-376.

Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H. & Gresshoff, P. M. (2019). Legume nodulation: The host controls the party. *Plant, cell & environment*, 42(1), 41-51.

Ford, R., Rubeena, R. R., Materne, M. M., & Taylor, P. W. J. (2007). Genome mapping and molecular breeding in lentil: Lentil In: *Genome mapping and molecular breeding*. Volume III, Pulse, Sugar and Starch Crops, Ed. C. Kole.

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.

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(6), 2037-2048.

Gundi, V. A., Dijkshoorn, L., Burignat, S., Raoult, D., & La Scola, B. (2009). Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology*, 155(7), 2333-2341.

Gholami A., Shahsavani S., and Nezarat S. (2012). The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination, Seedling Growth and Yield of Maize. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 25 2009.

Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192-195.

Göhl, B., (1982). *Les aliments du bétail sous les tropiques*. FAO, Division de Production et Santé Animale, Roma, Italy

Gordon, A. J., Lea, P. J., Rosenberg, C., & Trinchant, J. C. (2001). Nodule formation and function. In *Plant nitrogen* (pp. 101-146). Springer, Berlin, Heidelberg.

Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131(3), 872-877.

Graur, D., & Li, W. H. (2000). *Fundamentals of molecular evolution*. Dynamics, 20(2), 38.

- Gil-Serrano, A., del Junco, A. S., Tejero-Mateo, P., Megias, M., & Caviedes, M. A. (1990).** Structure of the extracellular polysaccharide secreted by *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CIAT 899. *Carbohydrate research*, 204, 103-107.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L., & Krishnamurthy, L. (2015).** Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 5(4), 355-377.
- Gruodien, J., & Zvirnaite, V. (1971).** Effect of IAA on growth and synthesis of N compounds in Lucerne. *Luk TSR Aukstuja Mosklo Darbai Biologia*, 17, 77-87.
- Gaur, Y., Sen, A., Subba Rao, N. (1980).** Improved legume–Rhizobium symbiosis by inoculating preceding cereal crop with *Rhizobium*. *Plant Soil*, 54:313–316.
- Graham, P. H. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 475-484.
- Goyal, M., Demchuk, A. M., Menon, B. K., Eesa, M., Rempel, J. L., Thornton, J., & Dowlatshahi, D. (2015).** Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *New England Journal of Medicine*, 372(11), 1019-1030.
- Govind, S., Kumawat, R., Pal, A., Kumar, S., & Saha, S. (2015).** Improvement of growth, yield and quality of garlic (*Allium sativum* L.) Cv. G-282 through a novel approach. *Bio Science*, 10(1), 23-27.
- Glick, B. R. (2012).** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica, 2012.
- Gupta, R., Chakrabarty, SK. (2013).** Gibberellic acid in plant: Still a mystery unresolved. *Plant Signal Behav.* 8:9, 25504.
- Glick, B. R. (2012).** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica, 2012.
- Gupta A, Saxena AK, Gopal M, Tilak KVBR (1998)** Effect of plant growth promoting rhizobacteria on competitive ability of introduced Bradyrhizobium sp. (*Vigna*) for nodulation. *Microbiol Res* 153:113–117
- Giller, K. E. (2008).** The successful intensification of smallholder farming in Zimbabwe. *LEISA Magazine*, 24(2), 30–31. Available online at: <http://edepot.wur.nl/58722>. Accessed 7 August 2018.
- GRDC. (2013).** Rhizobial inoculants fact sheet. Australia: Grains Research and Development Corporation (GRDC). Available online at: https://grdc.com.au/_data/assets/pdf_file/0014/117221/rhizobial-inoculants-fact-sheet.pdf.pdf. Accessed 7 August 2018.
- Gouffi K, Pica N, Pichereau V, Blanco C (1999).** Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 65:1491–1500.

Hussain MB, Zahir ZA, Asghar HN, Asgher M (2014a) Can catalase and EPS producing rhizobia ameliorate drought in wheat. *Int J Agric Biol* 16:3–13

Hussain MB, Zahir ZA, Asghar HN, Mahmood S (2014b) Scrutinizing rhizobia to rescue maize growth under reduced water conditions. *Soil Sci Soc Am J* 78:538–545

Han H, Lee S (2005) Physiological responses of soybean - inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with PGPR in saline soil conditions. *Res J Agric Biol Sci* 1(3):216–221.

Haukka, K., Lindström, K. and Young, P. (1998). Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 419–426.

Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. (2016). Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research.

Herridge, D., & Rose, I. (2000). Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. *Field Crops Research*, 65(2-3), 229-248.

Hardarson, G., & Atkins, C. (2003). Optimising biological N₂ fixation by legumes in farming systems. *Plant and soil*, 252(1), 41-54.

Hafeez, K., & Essmail, E. A. (2007). Evaluating organisation core competences and associated personal competencies using analytical hierarchy process. *Management Research News*, 30(8), 530-547.

Hamida, M.A., et Elkomy, H.M., (1998). Effect of salinity, gibberellic acid and *Azospirillum* inoculation on the growth and nitrogen uptake of *Zea mays*. *Biological Plant*, 40: 109-120.

Hablieb, CM., Luden, PW. (2000). Regulation of biological nitrogen fixation. *J Nutr*, 130:1081–1084.

Höflich, G., Wiehe, W., Kühn, G. (1994). Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia*, 50:897–905.

Henzell E. R. (1988). The role of biological nitrogen fixation research in solving problems in tropical agriculture. *Plant and Soil*, 108 : 15-21.

Hirsch P. R., (1996). Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytol.*, 133 : 159-171.

Howieson, J. G., & Brockwell, J. (2005). Nomenclature of legume root nodule bacteria in 2005 and implications for collection of strains from the field.

Huelsenbeck, J. P. (1995). Performance of phylogenetic methods in simulation. *Systematic biology*, 44(1), 17-48.

Hall, T., Biosciences, I., & Carlsbad, C. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*, 2(1), 60-61.

- Heath, K. D., & Tiffin, P. (2007).** Context dependence in the coevolution of plant and rhizobial mutualists. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1620), 1905-1912.
- Horneck, D. A., & Miller, R. O. (1998).** Determination of total nitrogen in plant tissue. *Handbook of reference methods for plant analysis*, 2, 75-83.
- Hilali, L., Youssef, N., Loppinet, V., & Finance, C. (1996).** Screening, selection and taxonomic identification of a nocardioform actinomycete strain producing an antifungal macrolide. *Medical Microbiology Letters*, 5(5), 253-264.
- Hopkins, W. G. (2003).** *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.
- Hall, J. D., Karol, K. G., McCourt, R. M., & Delwiche, C. F. (2008).** phylogeny of the conjugating green algae based on chloroplast and mitochondrial nucleotide sequence data 1. *Journal of Phycology*, 44(2), 467-477.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001).** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.
- Hartel, P. G., & Alexander, M. (1984).** Temperature and desiccation tolerance of cowpea rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(6), 820-823.
- Hungria, M., & Franco, A. A. (1993).** Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, 149(1), 95-102.
- Idrissi, O., Sakr, B., Dahan, R., Houasli, C., Nsarellah, N., Udupa, S., & Sarker, A. (2012).** Registration of ‘Chakkouf’ lentil in Morocco. *Journal of Plant Registrations*, 6(3), 268-272.
- IBM Corp. Released 2011.** *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0*. Armonk, NY: IBM Corp.
- Islam MS, Kawasaki H, Muramatsu Y, Nakagawa Y, Seki T (2008).** *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(6): 1416-1429.
- Islam MZ, Sattar MA, Ashrafuzzaman M, Berahim Z, Shamsuddoha ATM (2013) Evaluating some salinity tolerant rhizobacterial strains to lentil production under salinity stress. *Int J Agric Biol* 15:499–504.
- Jabbouri, S., Fellay, R., Talmont, F., Kamalaprija, P., Burger, U., Relic, B., ... & Broughton, W. J. (1995).** Involvement of nodS in N-methylation and nodU in 6-O-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors. *Journal of Biological Chemistry*, 270(39), 22968-22973.
- Jansen, R., Rood, S., Dormar, J., et Mc-Gill, W., (1992).** *Azospirillum brasilense* produces gibberellins in pure culture and chemically medium and in co-culture on straw. *Soil Biological Biochemistry*, 24: 1061-1064.
- Jiang, J. Q., Wei, W., Du, B. H., Li, X. H., Wang, L., & Yang, S. S. (2004).** Salt-tolerance genes involved in cation efflux and osmoregulation of *Sinorhizobium fredii* RT19 detected by isolation and characterization of Tn5 mutants. *FEMS microbiology letters*, 239(1), 139-146.

Jouyban, Z. (2012). The effects of salt stress on plant growth. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 2(1), 7-10.

Kaewnum, S., Prathuangwong, S., & Burr, T. J. (2005). The aggressiveness of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* isolate to soybean and hypersensitivity responses by other plants. *Plant Pathology*, 54(3), 409-415.

Kowalchuk, G. A., de Bruijn, F., Akkermans, A. D., Head, I. M., & Van Elsas, J. D. (Eds.). (2004). *Molecular microbial ecology manual* (Vol. 1). Springer Science & Business Media

Kumar, S., Barpete, S., Kumar, J., Gupta, P., & Sarker, A. (2013). Global lentil production: constraints and strategies. *SATSA Mukhapatra–Annu. Tech. Issue*, 17, 1-13.

Kumar, S., & Filipski, A. (2007). Multiple sequence alignment: in pursuit of homologous DNA positions. *Genome research*, 17(2), 127-135.

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(6), 1547-1549.

Kothamasi, D., Kothamasi, S., Bhattacharyya, A., Kuhad, R. C., & Babu, C. R. (2006). Arbuscular mycorrhizae and phosphate solubilising bacteria of the rhizosphere of the mangrove ecosystem of Great Nicobar island, India. *Biology and fertility of soils*, 42(4), 358-361.

King, E. O., M. K. Ward, and D. E. Raney. 1954. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.

Kloepper J., Lifshitz R., Zablotowicz R. (1989). Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*, 7:39–44.

Katznelson H., Cole S. (1965). Production of gibberellin-like substances by bacteria and actinomycetes. *Can J Microbiol*, 11:733–741.

Kadmiri, I. M., Chaouqui, L., Azaroual, S. E., Sijilmassi, B., Yaakoubi, K., & Wahby, I. (2018). Phosphate-solubilizing and auxin-producing rhizobacteria promote plant growth under saline conditions. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(7), 3403-3415.

Kang, S. M., Khan, A. L., Waqas, M., You, Y. H., Kim, J. H., Kim, J. G., ... & Lee, I. J. (2014). Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 673-682.

Kavamura, V. N., Santos, S. N., da Silva, J. L., Parma, M. M., Ávila, L. A., Visconti, A., ... & de Melo, I. S. (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological research*, 168(4), 183-191.

Karanja, N. K., & Wood, M. (1988). Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: Tolerance of high temperature and antibiotic resistance. *Plant and Soil*, 112(1), 15-22.

Kim, D. J., Chung, S. G., Lee, S. H., & Choi, J. W. (2012). Relation of microbial biomass to counting units for *Pseudomonas aeruginosa*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(21), 4620-4622.

Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259-1266.

Kang SM, Joo GJ, Hamayun M, Na CI, Shin DH, Kim YK, Hong JK, Lee IJ (2009) Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnol Lett* 31:277–281.

Lindstrom K, Lipsanen P, Kaijalainen S (1990) Stability of markers used for identification of two *Rhizobium galegae* inoculant strains after five years in the field. *Appl Environ Microbiol* 56:444–450.

Lugtenberg BJJ, Dekkers L, Bloemberg GV (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu Rev Phytopathol* 39:461–490.

Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P. and Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147, 981–993.

Lemaire, B., Van Cauwenberghe, J., Chimphango, S., Stirton, C., Honnay, O., Smets, E., & Muasya, A. M. (2015). Recombination and horizontal transfer of nodulation and ACC deaminase (*acdS*) genes within Alpha- and Betaproteobacteria nodulating legumes of the Cape Fynbos biome. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(11).

Leghari, S. J., Wahocho, N. A., Laghari, G. M., HafeezLaghari, A., MustafaBhabhan, G., HussainTalpur, & Lashari, A. A. (2016). Role of nitrogen for plant growth and development: A review. *Advances in Environmental Biology*, 10(9), 209-219.

Llorente, B., De Souza, F. S., Soto, G., Meyer, C., Alonso, G. D., Flawiá, & Rodríguez-Concepción, M. (2016). Selective pressure against horizontally acquired prokaryotic genes as a driving force of plastid evolution. *Scientific reports*, 6, 19036.

Lev-Yadun, S., Gopher, A., & Abbo, S. (2000). The cradle of agriculture. *Science*, 288(5471), 1602-1603.

Lin, J. W., Hsu, Y. M., Chomel, B. B., Lin, L. K., Pei, J. C., Wu, S. H., & Chang, C. C. (2012). Identification of novel *Bartonella* spp. in bats and evidence of Asian gray shrew as a new potential reservoir of *Bartonella*. *Veterinary microbiology*, 156(1-2), 119-126.

Lindström, K., Murwira, M., Willems, A., & Altier, N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in microbiology*, 161(6), 453-463.

Long, S. R. (1996). Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *The Plant Cell*, 8(10), 1885.

Lu, J., Kang, L., He, X., & Xu, D. (2011). Multilocus sequence analysis of the Rhizobia from five woody legumes in southern China. *African Journal of Microbiology Research*, 5(30), 5343-5353.

Ludwig, W., & Klenk, H. P. (2015). Overview: A Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Prokaryotic Systematics. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-27.

Ludwig, W. (2010). Molecular Phylogeny of Microorganisms: Is rRNA Still a Useful. *Molecular phylogeny of microorganisms*, 65.

Lupwayi, N. Z., Olsen, P. E., Sande, E. S., Keyser, H. H., Collins, M. M., Singleton, P. W., & Rice, W. A. (2000). Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research*, 65(2-3), 259-270.

Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P., & Willems, A. (2008). Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(1), 200-214.

May, S. N., & Bohlool, B. B. (1983). Competition among *Rhizobium leguminosarum* strains for nodulation of lentils (*Lens esculenta*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(3), 960-965.

Mayr, E. (1963). Animal species and evolution. *Animal species and evolution*.

Murray, P.R., Baron, E. J., Jorgensen, J.J., Pfaller, M.A., and Tenover, R.H (2003). Manual of clinical microbiology, 8th ed. Asm press: Washington, DC,.

Moore, E. D. W. A. R. D., Arnscheidt, A. N. G. E. L. I. K. A., Krüger, A., Strömpl, C., & Mau, M. A. R. G. I. T. (1999). Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Molecular microbial ecology manual*, 1(1), 1-15.

Michel, Burlyn E and Merrill R Kaufmann (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.* 51, 914-916.

McKenzie, R. H., & Roberts, T. L. (1990, February). Soil and fertilizers phosphorus update. In *Proceedings of Alberta Soil Science Workshop Proceedings*, Feb (pp. 20-22).

Mezaache-Aichour, S., Haichour, N., Guechi, A., & Zerroug, M. M. (2014). Telluric Pseudomonads metabolites involved in the antagonism to phytopathogenic fungi. *GJBAHS*, 3(1), 71-7.

Marulanda A., Barea J. -M., Azcón R. (2009). Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *J. Plant Growth Regul.* 28:115–124.

Miller-Williams M., Loewen PC., Oresnik IJ. (2006). Isolation of salt sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021. *Microbiol* 152:2049–2059.

Meena, K. K., Sorty, A. M., Bitla, U. M., Choudhary, K., Gupta, P., Pareek, A., & Singh, H. B. (2017). Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies. *Frontiers in plant science*, 8, 172.

Mohammad, R. M., Akhavan-Kharazian, M., Campbell, W. F., & Rumbaugh, M. D. (1991). Identification of salt-and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant and soil*, 134(2), 271-276.

Mohammadipanah, F., & Zamanzadeh, M. (2019). Bacterial Mechanisms Promoting the Tolerance to Drought Stress in Plants. In *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms* (pp. 185-224). Springer, Singapore.

Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4).

Murray, R. G., & Holt, J. G. (2005). The history of Bergey's Manual. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 1-14). Springer, Boston, MA.

Machido, D. A., Olufajo, O. O., Yakubu, S. E., & Yusufu, S. S. (2011). Enhancing the contribution of the legumes to the N fertility of soils of the semi-arid zone of Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 10(10), 1848–1853.

Mhadhbi H, Jebara M, Zitoun A, Limam F, Aouani ME (2008) Symbiotic effectiveness and response to mannitol-mediated osmotic stress of various chickpea-rhizobia association. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1027–1035

Mishra PK, Mishra S, Selvakumar G, Bisht JK, Kundu S, Gupta HS (2009) Co-inoculation of *Bacillus thuringiensis* -KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World J Microbiol Biotechnol* 25:753–761

Mehboob I, Naveed M, Zahir ZA, Ashraf M (2012) Potential of rhizobia for sustainable production of non-legumes. In: Ashraf M, Oztuork M, Ahmad M, Aksoy A (eds) *Crop production for agricultural improvement*. Springer, Netherlands, pp 659–704

N'cho, C. O., Yusuf, A. A., Ama-Abina, J. T., Jemo, M., Abaidoo, R. C., Savane, I. (2013). Effects of commercial microbial inoculants and foliar fertilizers on Soybean nodulation and yield in the northern Guinea Savannah of Nigeria. *International Journal of Advance Agricultural Science*, 1, 66–73.

Nelson, L. M. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. *Crop Management*, 3(1). <https://doi.org/10.1094/cm-2004-0301-05-rv>

Naveed, M., Hussain, M. B., Mehboob, I., & Zahir, Z. A. (2017). Rhizobial Amelioration of Drought Stress in Legumes. In *Microbes for Legume Improvement* (pp. 341-365). Springer, Cham.

Ngumbi, E., & Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, 105, 109-125.

Nautiyal, CS., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R., Verma, D. (2000). Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol Lett* 182:291-296.

Nieto, KF., Frankenberger, WT. (1990). Influence of adenine, isopentyl alcohol and *Azotobacter chroococcum* on the growth of *Raphanus sativus*. Plant Soil, 127:147–156.

Neilands, J.B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. J. Bio. Chem, 270: 26723–26726.

Neubauer, U., Furrer, G., Kayser, A., Schulin, R. (2000). Siderophores, NTA, and citrate: potential soil amendments to enhance heavy metal mobility in phytoremediation. Int J Phytoremed, 2:353–368.

Noel T., Sheng C., Yost C., Pharis P., Hynes M. (1996). *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. Can J Microbiol, 42:279–283.

Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphorus solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170, 2017-2021.

Nzoué, A., Miché, L., Klonowska, A., Laguerre, G., De Lajudie, P., & Moulin, L. (2009). Multilocus sequence analysis of bradyrhizobia isolated from *Aeschynomene* species in Senegal. Systematic and applied microbiology, 32(6), 400-412.

O'Gara, F., & Shanmugam, K. T. (1976). Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia export of fixed N₂ as NH₄⁺. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 437(2), 313-321.

Lodwig, E. M., Hosie, A. H., Bourdès, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran & Poole, P. S. (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–Rhizobium symbiosis. Nature, 422(6933), 722.

Patel, K., Goswami, D., Dhandhukia, P., & Thakker, J. (2015). Techniques to study microbial phytohormones. In Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem (pp. 1-27). Springer, Cham.

Pandya ND, Desai PV (2014). Screening and characterization of GA3 producing *Pseudomonas monteilii* and its impact on plant growth promotion. Int J Curr Microbiol App Sci 3(5):110–115.

Peoples MB, Herridge DF, Ladha JK (1995). Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. Plant Soil, 174: 3-28.

Postgate, J. (1998). Nitrogen Fixation, third edition, Cambridge University, p. 112.

Prévost, D., & Antoun, H. (2007). Root nodule bacteria and symbiotic nitrogen fixation. Soil sampling and methods of analysis, 379-398.

Paul, N. B., & Rao, W. S. (1971). Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. Plant and soil, 35(1-3), 127-132.

Parmar N, Dadarwall KR (1999) Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid like compounds by rhizobacteria. J Appl Microbiol 86:36–44

Pichereau V, Pocard JA, Hamelin J, Blanco C, Bemard T (1998) Different effects of dimethylsulfoniopropionate, dimethylsulfonioacetate and other S-methylated compounds on the growth of *Sinorhizobium meliloti* at low and high osmolarities. Appl Environ Microbiol 64:1420–1429

Qureshi MA, Ahmad MJ, Naveed M, Iqbal A, Akhtar N, Niazi KH (2009) Co-inoculation with *Mesorhizobium ciceri* and *Azotobacter chroococcum* for improving growth, nodulation and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Soil Environ* 28:124–129

Rafael, R., Márquez, M. C., Papke, R. T., & Ventosa, A. (2012). Multilocus sequence analysis of the family Halomonadaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(3), 520-538.

Pravin, V., Rosazlin, A., Tumirah, K., Salmah, I., Amru, N. B. (2016). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules*. 21, 573.

Patten, C.L., Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3- acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42:207–220.

Piccoli, P., Masciarelli, O., et Bottini, R., (1996). Metaboism of 17, 17-[²H₂]- gibberellins A4, A9 and A20 by *Azospillum lipoferum* in chemically defined culture medium. *Symbiosis*, 21: 263-274.

Pandey, A., & Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405(6788), 837.

Pandya, N. D., & Desai, P. V. (2013). Gibberellic Acid Production by *Bacillus cereus* Isolated from the Rhizosphere of Sugarcane. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7(4), 3239-3242.

Piccoli, P., & Bottini, R. (2013). Abiotic stress tolerance induced by endophytic PGPR. In *Symbiotic Endophytes* (pp. 151-163). Springer, Berlin, Heidelberg.

Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology*, 42(3), 207-220.

Rashid, M. H. O., 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.

Rashid, M. H. O., 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.

Rashid, M.H.O., Young, J.P.W., Everall, I., Clercx, P., Willems, A., Braun, M.S., Wink, M. (2015). Average nucleotide identity of genome sequences supportsthe description of *Rhizobium lentis* sp. nov., *Rhizobium bangladeshense* sp. nov. and *Rhizobium binae* sp.

Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., & Blankenship, R. E. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Molecular biology and evolution*, 21(3), 541-554.

Ribeiro, R. A., Barcellos, F. G., Thompson, F. L., & 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.

Ribeiro, R. A., Ormeno-Orrillo, E., Dall'Agnol, R. F., Graham, P. H., Martinez-Romero, E., & Hungria, M. (2013). Novel Rhizobium lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Research in microbiology*, 164(7), 740-748.

Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, MNV., Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol*, 28:142–149.

Rong, X., & Huang, Y. (2014). Multi-locus sequence analysis: taking prokaryotic systematics to the next level. In *Methods in microbiology* (Vol. 41, pp. 221-251). Academic Press.

Rashid, M. (2013). Genetic diversity of rhizobia nodulating lentils (*Lens culinaris* Medik.) (Doctoral dissertation).

Robert, L., Tsoi, J., Wang, X., Emerson, R., Homet, B., Chodon, T., & Koya, R. C. (2014). CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. *Clinical Cancer Research*, 20(9), 2424-2432.

Rannala, B., & Yang, Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of molecular evolution*, 43(3), 304-311.

Rong, X., & Huang, Y. (2014). Multi-locus sequence analysis: taking prokaryotic systematics to the next level. In *Methods in microbiology* (Vol. 41, pp. 221-251). Academic Press.

Rodriguez, R. L. and Tait, R. C. (1983). Spectrophotometric assay of DNA concentration and purity. In "Recombinant DNA techniques: An introduction," pages 42–44. Addison-Wesley publishing company, Reading, Massachusetts.

Rüberg, S., Tian, Z. X., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y. & Becker, A. (2003). Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *Journal of biotechnology*, 106(2-3), 255-268.

Romdhane SB, Trabelsi M, Aouani ME, de Lajudie P, Mhamdi R (2009) The diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) under water deficiency as a source of more efficient inoculants. *Soil Biol Biochem* 41:2568–2572

Räsänen LA, Lindström K (2003) Effect of biotic and abiotic constraints on the symbiosis between rhizobia and the tropical leguminous trees *Acacia* and *Prosopis*. *Indian J Exp Biol* 41:1142–1159.

Remans R, Croonenborghs A, Gutierrez RT, Michiels J, Vanderleyden J (2007) Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *Eur J Plant Pathol* 119:341–351

Remans R, Ramaekers L, Schelkens S, Hernandez G, Garcia A, Reyes JL, Mendez N, Toscano V, Mulling M, Galvez L, Vanderleyden J (2008) Effect of Rhizobium-Azospirillum

coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil* 312:25–37.

Roseline R, Lara R, Sarah S, German H, Aurelio G, Jorge R, Nancy M, Vidalina T, Miguel M, Lazaro G, Jos V (2008) Effect of Rhizobium-Azospirillum co-inoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil* 312:25–37.

Rajendran G, Sing F, Desai AJ, Archana G (2008) Enhanced growth and nodulation of pigeonpea by co-inoculation of Bacillus strains with Rhizobium sp. *Bioresour Technol* 99:544–550

Sanginga N, Danso SKA, Mulongoy K, Ojeifo AA (1994) Persistence and recovery of introduced Rhizobium 10 years after inoculation on *Leucaena leucocephala* grown on an Alfisol in Southwestern Nigeria. *Plant Soil* 159:199–204.

Staudinger C, Mehmeti-Tershani V, Gil-Quintana E, Gonzalez EM, Hofhansl F, Bachmann G, Wienkoop S (2016) Evidence for a rhizobia-induced drought stress response strategy in *Medicago truncatula*. *J Proteome* 136:202–213

Sessitsch A, Howieson JG, Perret X, Antoun H, Martinez-Romero R (2002) Advances in Rhizobium research. *Crit Rev Plant Sci* 21:323–378.

Streeter JG (2003) Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *J Appl Microbiol* 95:484–49.

Suarez R, Wong A, Ramírez M, Barraza A, Orozco MC, Cevallos MA, Lara M, Hernández G, Iturriaga G (2008) Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact* 21:958–966

Stajkovic O, Delic D, Josic D, Kuzmanovic D, Rasulic N, Knezevic- Vukcevic J (2011) Improvement of common bean growth by coinoculation with Rhizobium and plant growth promoting bacteria. *Rom Biotechnol Lett* 16:5919–5926

Singh G, Sekhon HS, Sharma P (2011) Effect of irrigation and biofertilizer on water use, nodulation, growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Arch Agron Soil Sci* 57:715–726

Saghafi, D., Ghorbanpour, M., & Lajayer, B. A. (2018). Efficiency of Rhizobium strains as plant growth promoting rhizobacteria on morpho-physiological properties of *Brassica napus* L. under salinity stress. *Journal of soil science and plant nutrition*, 18(1), 253-268.

Saghafi, D., Ghorbanpour, M., Ajirloo, H. S., & Lajayer, B. A (2019). Enhancement of growth and salt tolerance in *Brassica napus* L. seedlings by halotolerant Rhizobium strains containing ACC-deaminase activity. *Plant Physiology Reports*, 1-11.

Sandhya, V. Z. A. S., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. (2009). Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and fertility of soils*, 46(1), 17-26.

Serraj, R., & Sinclair, T. R. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, cell & environment*, 25(2), 333-341.

Sharma, P., Padh, H., & Shrivastava, N. (2013). Hairy root cultures: a suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants. *Engineering in Life Sciences*, 13(1), 62-75.

Shamseldin, A., El-Saadani, M., Sadowsky, M. J., & An, C. S. (2009). Rapid identification and discrimination among Egyptian genotypes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) by analysis of nodC, ARDRA, and rDNA sequence analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(1), 45-53.

Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi journal of biological sciences*, 22(2), 123-131.

Sridevi, M., & Malliah, K. V. (2009). Phosphate solubilization by *Rhizobium* strains. *Indian journal of microbiology*, 49(1), 98-102.

Srinivasan, P. S., & Gopalakrishnan, S. (1977). Effect of Planofix an NAA formulation on groundnut var. tMV 7. *Current science*.

Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(4), a001438.

Subba Rao NS (1988). *Biofertilizers in agriculture*. Oxford and IBH Publishing, New Delhi

Swaine, E. K., Swaine, M. D., & Killham, K. (2007). Effects of drought on isolates of *Bradyrhizobium elkanii* cultured from *Albizia adianthifolia* seedlings of different provenances. *Agroforestry systems*, 69(2), 135-145.

Santillana, N., Ramirez-Bahena, M.H., Garcia-Fraile, P., Velazquez, E., Zuniga, 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. *Arch. Microbiol.* 189, 239–247.

Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C., Connell C.R., Heiner C., Kent S.B. and Hood L.E. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321, 674–679.

Sarker, A., & Kumar, S. (2011). Lentils in production and food systems in West Asia and Africa. *Grain Legumes*, 57, 46-48.

Saïdi, S., Ramírez-Bahena, M.H., Santillana, N., Zúñiga, D., Álvarez-Martínez, E., Peix, A., Mhamdi, R., Velázquez, E. (2014). *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on

several continents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64 (Part 1),242–247, <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.052191-0>.

Saikia, S. P., & Jain, V. (2007). Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma. *Current science*, 317-322.

Saito, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.

Sarker, A. (2018). Lentils in production and food systems in West Asia and Africa.

Schlaman, H. R., Okker, R. J., & Lugtenberg, B. J. (1992). Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. *Journal of Bacteriology*, 174(16), 5177.

Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (2012). Handbook for Rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. Springer Science & Business Media.

Sharma, K., G. Dak, A. Agrawal, M. Bhatnagar et R. Sharma (2007). Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of *Cicer arietinum* seed sand seedling growth. *J. Herb. Med. Toxicol.*, 1: 61-63.

Senthilkumar, M., Madhaiyan, M., Sundaram SP, Kannaiyan S (2009). Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. CvCO-43). *Microbiol Res*, 164:92–104.

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 and evolutionary microbiology*, 44(4), 846-849.

Simione, F. P. (1995). Methods in molecular biology, Vol. 38, cryopreservation and freeze-drying protocols: Edited by J. Day and M. McLellan, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1995, ix+ 254 pp. ISBN 0-89603-296-5.

Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). Counting rhizobia by a plant infection method. In Handbook for Rhizobia (pp. 58-64). Springer New York.

Sayed, R. Z., Jamadar, D. D., & Patel, P. R. (2011). Production of Exo-polysaccharide by *Rhizobium* sp. *Indian journal of microbiology*, 51(3), 294-300.

Stepkowski T., Czaplinska M., Miedzinska K. and Moulin L. 2003. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Systematic and Applied Biology* 26, 483–494.

Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.

Stoddard, F. L., Balko, C., Erskine, W., Khan, H. R., Link, W., & Sarker, A. (2006). Screening techniques and sources of resistance to abiotic stresses in cool-season food legumes. *Euphytica*, 147(1-2), 167-186.

Sonnante, G., Montemurro, C., Morgese, A., Sabetta, W., Blanco, A., & Pasqualone, A. (2009). DNA microsatellite region for a reliable quantification of soft wheat adulteration in durum

wheat-based foodstuffs by real-time PCR. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(21), 10199-10204.

Shah, Z., Shah, S. H., Peoples, M. B., Schwenke, G. D., & Herridge, D. F. (2003). Crop residue and fertiliser N effects on nitrogen fixation and yields of legume–cereal rotations and soil organic fertility. *Field Crops Research*, 83(1), 1-11.

Široký, P., Fritz, U., Türkozan, O., Wink, M., Lehmann, J., Mazanaeva, L., & Hundsdörfer, A. (2007). Phenotypic plasticity leads to incongruence between morphology-based taxonomy and genetic differentiation in western Palaearctic tortoises (*Testudo graeca* complex, Testudines, Testudinidae). *Amphibia-Reptilia*, 28(1), 97-121.

Swofford, C. D., Kasckow, J. W., Scheller-Gilkey, G., & Inderbitzin, L. B. (1996). Substance use: a powerful predictor of relapse in schizophrenia. *Schizophrenia research*, 20(1-2), 145-151.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Rev.* 31(4):425-48.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*

Silini, A., Parolini, O., Huppertz, B., & Lang, I. (2013). Soluble factors of amnion-derived cells in treatment of inflammatory and fibrotic pathologies. *Current stem cell research & therapy*, 8(1), 6-14.

Santner, A., Calderon-Villalobos, LI., Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol.* 5:301-7.

Tchebotar VK, Kang UG, Asis CA Jr, Akao S (1998) The use of GUS-reporter gene to study the effect of Azospirillum-Rhizobium co-inoculation on nodulation of white clover. *Biol Fertil Soils* 27:349–352

Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DF, Salove MH, Deobald LA, Bailey JF, Morra MJ (2002) Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* Wyc 108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol* 68:2161–2171

Upadyyay SK, Singh DP, Saikia R (2009) Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria from rhizospheric soil of wheat under saline conditions. *Curr Microbiol* 59:489–496

Taha, K., El Attar, I., Dekkiche, S., Aurag, J., & Béna, G. (2018). *Rhizobium laguerreae* is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris*) in Morocco. *Systematic and applied microbiology*, 41(2), 113-121.

Tena, W., Wolde-Meskel, E., Degefu, T., & Walley, F. (2017). Lentil (*Lens culinaris* Medik.) nodulates with genotypically and phenotypically diverse rhizobia in Ethiopian soils. *Systematic and applied microbiology*, 40(1), 22-33.

Tian, G., & Kang, B. T. (1998). Effects of soil fertility and fertilizer application on biomass and chemical compositions of leguminous cover crops. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51(3), 231-238.

Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(1), 249-266.

Tipping, E. M., Onofriechuk, E. E., Zablutowicz, J. W., Kloepper, J. W., and Lifshitz, R., (1989). Screening of bacteria isolated from peat for biocontrol of *Pythium ultimum*, in Proceedings Symposium Peat and Peatlands, Vol. II, Overend, R. P. and Juglum, J. K., Eds., Canadian Society of Peat and Peatlands, St. Foy, Quebec.

Toklu, F., Biçer, B., & Karaköy, T. (2009). Agro-morphological characterization of the Turkish lentil landraces. *African Journal of Biotechnology*, 8(17).

Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327-338.

Turner S.L. and Young J.P. 2000. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Molecular Biology and Evolution* 17, 309–319.

Thompson-Brenner, H., & Westen, D. (2005). Personality subtypes in eating disorders: Validation of a classification in a naturalistic sample. *The British Journal of Psychiatry*, 186(6), 516-524.

Thompson-Brenner, H., Eddy, K. T., Satir, D. A., Boisseau, C. L., & Westen, D. (2008). Personality subtypes in adolescents with eating disorders: validation of a classification approach. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 49(2), 170-180.

Timmusk S., Wagner E.G.H. (1999). The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:951–959.

Ullah, A., Sun, H., Yang, X., & Zhang, X. (2017). Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. *Plant biotechnology journal*, 15(3), 271-284.

Upadhyay, S. K., Singh, J. S., & Singh, D. P. (2011). Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere*, 21(2), 214-222.

Uthandi S, Karthikeyan S, Sabarinathan KG (2010). Gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi* SG2. *JSIR* 69(3):211–214

Vance, C. P. (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources.* *Plant physiology*, 127(2), 390-397.

Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, 184, 13-24.

Williams, P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, 153(12), 3923-3938.

Wei, W., Jiang, J., Li, X., Wang, L., & Yang, S. S. (2004). Isolation of salt-sensitive mutants from *Sinorhizobium meliloti* and characterization of genes involved in salt tolerance. *Letters in applied microbiology*, 39(3), 278-283.

Vikram, A., Hamzehzarghani, H., Alagawadi, A. R., Krishnaraj, P. U., & Chandrashekar, B. S. (2007). Production of plant growth promoting substances by phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols. *J Plant Sci*, 2(3), 326-333.

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

World Bank, (2008). Sustainable Land Management Source Book, Washington DC.

Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, V. J., & Fox, G. E. (1984). The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Systematic and applied microbiology*, 5(3), 315-326.

Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Experimen. Bot.*, 52: 487-511.

Yan, J., Han, X. Z., Ji, Z. J., Li, Y., Wang, E. T., Xie, Z. H., & Chen, W. F. (2014). Abundance and diversity of soybean-nodulating rhizobia in black soil are impacted by land use and crop management. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(17), 5394-5402.

Yadav, S. S., McNeil, D., & Stevenson, P. C. (Eds.). (2007). Lentil: An ancient crop for modern times. Springer Science & Business Media.

Yanni, Y. G., Rizk, R. Y., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., Philip-Hollingsworth & Schmidt, T. M. (1997). Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. In *Opportunities for biological nitrogen fixation in rice and other non-legumes* (pp. 99-114). Springer, Dordrecht.

Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science*, 14(1), 1-4.

Yang DG, Yang FP, Chen XQ, Zhang LQ, Zhang XD (2009) Obtainment of tranxformed maize with dehydration-responsive transcription factor CBF4 gene. *Acta Agron Sin* 35:1759–1763

Zacarias JJJ, Altamirano-Hernandez J, Cabriaes JJP (2004) Nitrogenase activity and trehalose content of nodules of drought-stressed common bean infected with effective (Fix+) and ineffective (Fix-) rhizobia. *Soil Biol Biochem* 36:1975–1981.

Žafran-Novak, J., Redžepović, S., & Četković, H. (2010). Genetic analysis of a nodA-nodD region of autochthonous strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* that showed effective nodulation of host plants. *Periodicum biologorum*, 112(4), 459-467.

Zahran, H. H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.*, 63: 968-989.

Zahran, H. H. (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of biotechnology*, 91(2-3), 143-153.

Zhu, J.G., Han, Y., Liu, G., Zhang, Y.L., Shao, X.H. (2000). Nitrogen in percolation water in paddy fields with a rice/wheat rotation. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 57,75–82.

Zou, L., Chen, Y. X., Penttinen, P., Lan, Q., Wang, K., Liu, M., ... & Zeng, X. (2016). Genetic Diversity and Symbiotic Efficiency of Nodulating Rhizobia Isolated from Root Nodules of Faba Bean in One Field. *PloS one*, 11(12), e0167804.

Zahran, H. H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(4), 968-989.

Zahran, H. H. (2017). Legume-microbe interactions under stressed environments. In *Microbes for legume improvement* (pp. 301-339). Springer, Cham.

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J. C., Gillis, M., & De Lajudie, P. (2004). Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Systematic and applied microbiology*, 27(3), 380-395.

Zhan HJ., Lee CC., Leigh JA. (1991). Induction of the second exopolysaccharide (EPS) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J Bacteriol*, 173:7391–7394.

Zhang XP., Karsisto M., Harper R., LindstroE`m K. (1991). Diversity of Rhizobium bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *Int J Syst Evol Bacteriol* 41:104–113.

Zou, X., Binkley, D., & Doxtader, K. G. (1992). A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. *Plant and Soil*, 147(2), 243-250.

VIII. Annexes

Annexe 1. L'analyse de la congruence topologique entre les arbres phylogénétiques des séquences des gènes 16S rRNA, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *nodD* et *nodA* calculée à l'aide de l'indice de congruence *Icong*.

Gènes	<i>nodD</i>		<i>16SrRNA-rpoB-recA-gyrB</i>		<i>16S rRNA</i>		<i>gyrB</i>		<i>rpoB</i>	
	Icong	P-value	Icong	P-value	Icong	P-value	Icong	P-value	Icong	P-value
<i>nodA</i>	1.11	0.38			-	-	-	-	-	-
<i>16S rRNA</i>	-	-	0.88	7.45	-	-	-	-	-	-
<i>gyrB</i>	-	-	1.53	0.001	1.04	0.91	-	-	-	-
<i>rpoB</i>	-	-	1.09	0.48	1.15	0.22	0.88	7.45	-	-
<i>recA</i>	-	-	1.09	0.48	0.92	4.48	1.25	0.06	0.77	34.41

Annexe 2. Diversité génétique et variabilité entre les locus alignés (ARNr 16S, *rpoB*, *recA*, *gyrB*, *nodA*, *nodD*) grâce à l'analyse statistique des séquences.

Locus	AL (bp)	NVS	VS (%)	G+C (%)	DR	PDM	R
<i>16S rRNA</i>	807	89	11.03	52.30	0-0.096	0.04	0.50
<i>rpoB</i>	477	332	69.60	59.11	0-2.040	0.32	2.75
<i>recA</i>	413	75	18.16	62.62	0-0.184	0.04	1.75
<i>gyrB</i>	571	152	26.62	59.77	0-0.310	0.07	0.99
<i>nodA</i>	600	24	4.00	57.99	0-0.034	0.01	0.91
<i>nodD</i>	754	20	2.65	55.12	0-0.035	0.01	1.34
<i>16S rRNA-rpoB-recA-gyrB</i>	2194	648	16.55	58.53	0-0.168	0.06	1.13

AL : longueur d'allèle (pb) après alignement ; NVS : nombre de sites variables ; VS (%) : sites variables (%) ; G + C (%) : Teneur moyenne en G + C (% en moles) ; R : Indice de Transition / Transversion ; DR : Plage de distance et PDM : Moyenne de distance par paire calculée avec le modèle de distance Kimura à 2 paramètres (K2).

Annexe 3. Pourcentage (%) de similarité des séquences des gènes concaténés (16SrRNA-rpoB-recA-gyrB) entre les espèces de *Rhizobium* réalisé par l'outil SIAS (Sequence Identity And Similarity) en utilisant la méthode Blosum62.

<i>R. acidisoli</i> FH23T	-									
<i>R. laguerreae</i> FB206T	79%	-								
<i>R. elti</i> CNPSO679	78%	88%	-							
<i>R. anhuiense</i> CCBAU23252T	80%	93%	89%	-						
<i>R. leucaenae</i> USDA 9039	79%	89%	88%	88%	-					
<i>R. leguminosarum</i> CCBAU 15396	80%	96%	90%	94%	88%	-				
<i>R. gallicum</i> R602	79%	88%	88%	89%	92%	88%	-			
<i>R. multihospitium</i> CCBAU83401T	80%	89%	89%	89%	93%	89%	90%	-		
<i>R. pisi</i> DSM30132T	79%	96%	90%	94%	90%	98%	90%	89%	-	
	<i>R. acidisoli</i> FH23T	<i>R. laguerreae</i> FB206T	<i>R. elti</i> CNPSO679	<i>R. anhuiense</i> CCBAU23252T	<i>R. leucaenae</i> USDA9039	<i>R. leguminosarum</i> CCBAU15396	<i>R. gallicum</i> R602	<i>R. multihospitium</i> CCBAU83401T	<i>R. pisi</i> DSM 30132T	

Genes	Genus/Species	938N3	318N211	686N5	115N2	1574N4	318N2111	996N2	322N32	1159N24	1159N52	996N5	1145N1	1159N11	1159N41	
<i>16S rRNA</i>	<i>R. anhuiense</i> CCBAU 23252T	-	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	97%	98%	97%	
	<i>R. laguerreae</i> FB206T	-	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	97%	98%	97%	
	<i>R. leguminosarum</i> CCBAU 15396	-	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	97%	98%	97%	
	<i>R. acidisoli</i> FH13T	-	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	97%	98%	97%	
	<i>R. leucaena</i> CCGE523	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97%	-
	<i>M. huakuii</i> NBRC15243	100%	-	94%	94%	94%	-	94%	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>gyrB</i>	<i>M. huakuii</i> NBRC15243	100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>R.leguminosarum</i> CCBAU15396	-	96%	97%	97%	97%	NA	96%	96%	NA	96%	97%	NA	95%	94%	
<i>recA</i>	<i>R. laguerreae</i> FB206T	-	97%	96%	95%	100%	97%	95%	97%	-	97%	96%	96%	97%	97%	
	<i>R.leguminosarum</i> CCBAU15396	-	100%	100%	100%	96%	100%	100%	100%	-	100%	100%	100%	100%	100%	
	<i>M. Huakuii</i> USDA4779 T	100%	99%	97%	97%	97%	99%	97%	99%	-	99%	97%	97%	99%	99%	
<i>rpoB</i>	<i>R. laguerreae</i> FB206T	NA	97%	100%	97%	100%	97%	98%	97%	97%	97%	98%	98%	96%	97%	
	<i>R. pisi</i> DSM30132T	NA	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	-	-	94%	95%	
	<i>R. elti</i> Mim1	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>R. leguminosarum</i> CCBAU15396	NA	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	95%	96%	96%	97%	
<i>nodD</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>vicia</i> Strain SS21	100%	99%	98%	97%	100%	98%	98%	98%	98%	98%	97%	98%	NA	NA	
	<i>R. laguerreae</i> FB206T	-	100%	100%	99%	97%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	99%	NA	NA	
<i>nodA</i>	<i>R. leguminosarum</i> CTG-22Ps	-	100%	100%	100%	97%	100%	100%	100%	-	100%	100%	100%	100%	100%	
	<i>R. laguerreae</i> R106	-	98%	100%	100%	96%	98%	100%	98%	-	98%	100%	98%	98%	100%	
<i>16S rRNA-rpoB-recA-gyrB</i>	<i>R. laguerreae</i> FB206T	NA	96%	95%	94%	96%	NA	94%	94%	NA	93%	NA	94%	94%	93%	
	<i>R.leguminosarum</i> CCBAU15396	NA	97%	98%	97%	97%	NA	97%	97%	NA	95%	NA	97%	97%	96%	
	<i>R. pisi</i> DSM30132T	NA	96%	96%	96%	96%	NA	96%	96%	NA	94%	NA	95%	96%	94%	
	<i>R. elti</i> CNPSO670	NA	94%	94%	94%	94%	NA	94%	94%	NA	93%	NA	94%	94%	92%	

Annexe 4. Similitudes intergéniques / intragéniques (%) des isolats d'espèces de *Rhizobium* sur la base des gènes 16S rRNA, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *nodD* et *nodA* réalisés par l'outil SIAS (Sequence Identity And Similarity) en utilisant la méthode Blosum62. Les nombres en gras représentent le pourcentage le plus élevé de similitude au sein du même gène ; - représente le pourcentage de similitude <94%. NA représente les données manquantes (séquences non obtenues).

Résumé

La lentille (*Lens culinaris*) est une légumineuse importante pour le Maroc, sa culture, surtout dans les conditions de sécheresse et d'aridité, peut-être améliorée par inoculation par des rhizobia, doués d'activités PGPR exprimées et fonctionnelles même sous stress abiotiques. Ainsi, seize souches de *Rhizobium* ont été sélectionnées à partir de 68 isolats provenant de 10 accessions de lentille cultivées à la station expérimentale de Marchouch au Maroc et caractérisées par des outils moléculaires et évaluées en termes d'efficacité symbiotique avec trois variétés différentes marocaines de lentille (Bakria, Chakkouf et Zaria) et leur utilisation en tant que Bactéries Promotrices de la Croissance de Plantes (PGPB), notamment pour la solubilisation du phosphate et la production des phytohormones sous stress abiotiques. L'analyse phylogénétique et MLSA des gènes 16S rDNA, rpoB, recA, gyrB et des gènes symbiotiques nodD et nodA a permis de regrouper toutes les souches avec *R. laguerreae* et *R. leguminosarum* (similarité de séquences de 94% à 100%). Une souche constituerait une nouvelle espèce. La variété Bakria a montré la meilleure association avec les souches ($P \leq 0.05$). Ce qui expliquerait l'appréciation de Bakria par la plupart des agriculteurs marocains. Plusieurs souches de *Rhizobium* ont montré une activité significative de solubilisation de phosphate et de production de phytohormones ($P \leq 0.05$). Concernant les stress abiotiques, la souche 686N5 a montré une tolérance élevée au stress salin (5% de NaCl) et une tolérance modérée au stress hydrique ($\psi = -0.75$ MPa). Ainsi, le criblage des rhizobia pour réussir l'inoculation doit être basé sur les activités PGP sous stress abiotiques.

Mots- clés : Rhizobium, Efficience symbiotique, Stress abiotiques, PGPR, 16S rADN, Diversité génétique, phylogénie.

Abstract

The lentil (*Lens culinaris*) is an important crop for Morocco, especially in drought and arid conditions, can be improved by inoculation with rhizobia, endowed with expressed and functional PGPR activities even under abiotic stresses. Thus, sixteen *Rhizobium* strains were selected from 68 isolates from 10 lentil accessions cultivated at the Marchouch experimental station in Morocco and characterized by molecular tools and evaluated in terms of symbiotic efficiency with three different Moroccan varieties of lentil. (Bakria, Chakkouf and Zaria) and their use as Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), specifically for the solubilization of phosphate and the production of phytohormones under abiotic stress. Phylogenetic and MLSA analysis of the 16S rDNA, rpoB, recA, gyrB and symbiotic genes nodD and nodA allowed all strains to be grouped together with *R. laguerreae* and *R. leguminosarum* (sequence similarity 94% to 100%). A strain would constitute a new species. The Bakria variety showed the best association with the strains ($P \leq 0.05$). Which would explain the appreciation of Bakria by most Moroccan farmers. Several strains of *Rhizobium* showed significant activity in phosphate solubilization and phytohormone production ($P \leq 0.05$). Regarding abiotic stresses, strain 686N5 showed high tolerance to salt stress (5% NaCl) and moderate tolerance to water stress ($\psi = -0.75$ MPa). Thus, screening for rhizobia for successful inoculation should be based on PGP activities under abiotic stresses.

Key Words : Rhizobium, Symbiotic efficiency, Abiotic stress, PGPR, 16S rDNA, Genetic diversity, phylogeny.