

THÈSE

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

Centre de Recherche : Biotechnologie végétale et microbienne, biodiversité et environnement

Structure de Recherche : Laboratoire de physiologie et biotechnologie végétales

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie végétale et biotechnologie microbienne

Présentée et Soutenue le : 16 / 07 / 2024

par :

Jalila BENJELLOUN

Amélioration de la croissance et valorisation de la microflore de *Cycas revoluta*

Devant le JURY :

Souad CHERKAOUI	PES	FSR , Université Mohammed V	Président
Najiba BRHADDA	PES	FSK , Université Ibn Tofaïl	Examineur/Rapporteur
Rachida HASSIKOU	PES	FSR , Université Mohammed V	Examineur/Rapporteur
Ahmed EL ABOUDI	PES	FSR , Université Mohammed V	Examineur/Rapporteur
Sarah BOUZROUD	PA	FSR , Université Mohammed V	Invité
Abdelaziz SMOUNI	PES	FSR , Université Mohammed V	Co-Directeur de thèse
Abdelkarim GUEDIRA	PES	FSR , Université Mohammed V	Directeur de thèse

Année Universitaire : 2023 - 2024

Avant-propos

Je souhaite avant tout remercier Dieu le tout puissant de m'avoir soutenu et permis l'achèvement de cette thèse.

Les travaux présentés au niveau de cette thèse ont vu le jour grâce à une collaboration fructueuse entre l'équipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire et le Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétales.

Je remercie vivement le Professeur Abdelkarim Guedira qui a accepté sans réserve, de diriger cette thèse et d'y consacrer son temps. Professeur Guedira a contribué de manière vitale à la réalisation de ce travail scientifique à travers son expertise précieuse et ses conseils éclairés mais aussi par son soutien continu et sa confiance permanente quant à l'aboutissement de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers le Professeur Abdelaziz Smouni, Chef du Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétales et co-directeur de cette thèse. Tout au long de la préparation de ce doctorat, Professeur Smouni a apporté une touche unique à ce travail de par un esprit d'observation et d'analyse pointu et de recommandations avisées.

Mes remerciements les plus chaleureux et respectueux au président du jury, Madame Souad Cherkaoui, Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat pour le grand honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse.

Je tiens également à présenter mes vifs remerciements au Professeur Najiba Brhadda, Professeur à la Faculté des Sciences de Kénitra, d'avoir eu l'amabilité d'accepter d'examiner et de juger ce travail.

Je remercie également Mme Rachida Hassikou, Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, d'avoir eu l'amabilité d'accepter d'examiner et de juger ce travail.

Je remercie également M Ahmed El Aboudi, Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, d'avoir eu l'amabilité d'accepter d'examiner et de juger ce travail.

Un grand merci à Mme Sarah Bouzroud, Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, d'avoir fait l'honneur d'accepter de siéger dans ce jury comme membre invité. Sa disponibilité, sa générosité, sa collaboration et son soutien m'ont été précieux dans la réalisation du présent travail.

J'adresse aussi mes remerciements les plus sincères et les plus distingués aux Professeurs Kawtar Taha et Chouhra Talbi de l'équipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire, qui ont

participé à la réalisation d'une partie de ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers Monsieur Hamza El Ouardi, Docteur à l'hôpital Cheikh Khalifa et Monsieur Youness Zaid, Professeur à la faculté des Sciences de Rabat d'avoir contribué à ce travail de recherche.

Dédicaces

A mon défunt père

Je dédie cet évènement marquant de ma vie à la mémoire de mon père. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de la persévérance et de la confiance en soi. J'aurais tant aimé te faire lire cette thèse. Repose en paix.

A ma très chère mère

Autant d'expressions éloquentes pour exprimer ma gratitude et ma reconnaissance envers toi. Tu es une source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifices. Que dieu te préserve.

A mon cher époux

Pour tout l'encouragement et le soutien quotidiens et indéfectibles, je te dédie ce travail.

A mes chères enfants

Je vous dédie ce travail, preuve de courage, de volonté, d'assiduité autant de mots qui devraient vous accompagner toute votre vie.

Productions scientifiques

◆ Articles scientifiques publiés ou acceptés

Benjelloun J., Bouzroud S., Triqui Z.E., Lahlimi-Alami Q., Layachi R., Smouni S., Guedira A. **2021**. Warm stratification improves embryos development and seed germination of *Cycasrevoluta*. *Advances in Horticultural Sciences*.

Lahlimi-Alami Q., Layachi R., Hassikou R., Aghouyane B., Rais C., **Benjelloun J.**, Khamar H., Zaid Y. **2022**. Evaluation of the ethanolic extract of some medicinal plants on platelet function in COVID-19 patients. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*.

Lahlimi-Alami Q., Layachi R., Hassikou R., **Benjelloun J.**, Amallah L., Zaid Y., Bouzroud S. **2022**. Anticandidotic activity and acute toxicity of *Quercus suber* L. bark extracts. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*.

Benjelloun J., Bouzroud S., Zaid Y., Guedira A., Smouni A. **2024**. Warm stratification combined with organic manure application enhances seed germination and improves *Cycas revoluta* growth and development. *Advances in Horticultural Sciences*.

◆ Articles scientifiques soumis ou en cours de préparation

Benjelloun J., Hnini M., Bouzroud S., El Attar I., ElMghazli N., Hami A., Zinedine A., Rocha J.M., Talbi C., Aurag J., Smouni A., Guedira A., Taha K. Effect of plant growth promoting rhizobacteria isolated from *Cycas revoluta* on tomato (*Solanum lycopersicum*) growth under salt stress. (Soumis au journal *Microbiological Research*).

Bouzroud S., Talbi C., Taimourya H., Zinedine A., Rocha J.M., Badaoui B., **Benjelloun J.** Next-generation bio-formations based on synthetic PGPMs as a promising strategy to improve plant health and resilience to abiotic stresses (en preparation).

Résumé

Le présent travail vise à améliorer la germination *in vivo* et la croissance de *Cycas revoluta*, et à caractériser les bactéries endophytes et cyanobactéries qui lui sont associées en vue de leur valorisation pour promouvoir la résilience des plantes. Les traitements thermiques pré-germinatifs améliorent la germination en favorisant le développement des embryons. Le pré-traitement à 30°C pendant 2 mois augmente le taux de germination à 49,33% après un temps de latence de 4 mois et accélère le développement embryonnaire, favorisant la différenciation des tissus et l'accumulation de l' α -amylase et des sucres solubles et la réduction de la teneur en ABA. De plus, tous les paramètres morphologiques de croissance ont été améliorés par le traitement des graines à 30°C pendant deux mois. L'effet des engrais organiques sur la croissance des jeunes pousses a également été étudié. Les résultats ont montré que le fumier de mouton impacte positivement la disponibilité des nutriments dans les parties aériennes de la plante, la hauteur de la plante, le nombre de feuilles, la formation du stipe et le développement du système racinaire. Sur le plan physiologique, les teneurs en chlorophylles a, b et en chlorophylle totale, et la photochimie du PSII ont été étudiées. Pris ensemble, les résultats ont souligné l'effet bénéfique du fumier de mouton sur la croissance et le développement de *Cycas revoluta* ainsi qu'une augmentation de la concentration en azote dans les feuilles. En outre, l'analyse des racines coralloïdes a révélé la présence de cyanobactéries et autres bactéries endophytes. La caractérisation moléculaire des souches cyanobactériennes par le séquençage de l'ARNr 16S a montré une forte similarité avec deux genres *Nostoc* et *Desmonostoc*. Toutes les souches isolées ont été capables de produire des polysaccharides avec des valeurs variant de 4,06g/L à 2,06g/L. Le séquençage a également permis d'identifier vingt souches de bactéries endophytes cohabitant avec les cyanobactéries. Elles appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Peribacillus*, *Ochrobactrum*, *Staphylococcus* et *Stenotrophomonas*. Le criblage de ces souches pour l'activité de solubilisation du phosphate, la production d'auxine et de sidérophores en conditions normales et de stress salin a montré que six d'entre elles présentent des capacités prometteuses de solubilisation de phosphate et de production d'auxine et de sidérophores, notamment sous stress salin. Parmi elles, *Pantoea sp.* (M42Y) a montré la production d'auxine la plus élevée, tandis que *Bacillus sp.* (FC11P1) a présenté les meilleurs résultats en production de sidérophores et de solubilisation de phosphate. Ces deux souches dotées d'activité PGP, ont été inoculées *in vitro* à des graines de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Campbell 33). L'inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* a amélioré le taux de germination tout en diminuant le temps moyen de germination par rapport au témoin. La croissance, le développement ainsi que les paramètres physiologiques ont été évalués sur des plants de tomate cultivées à 150 mM de NaCl. Les résultats ont montré que la double inoculation par *Pantoea sp.* et par *Bacillus sp.* a un effet positif sur la croissance et permet de minimiser les effets néfastes du stress salin.

Mots clés : *Cycas revoluta*, Prétraitements thermiques, Germination, Croissance, PGP, Stress salin.

Abstract

The present work aims to improve the *in vivo* germination and growth of *Cycas revoluta* as well as to explore and characterize the associated cyanobacteria and endophytic bacteria, to use them to promote plant resilience. Warm stratification improves germination by promoting embryo development. Pre-treatment at 30°C for 2 months increases germination to 49.33% after 4 months of latency. Warm stratification accelerates embryo development and promotes tissue differentiation and the accumulation of alpha-amylase and soluble sugars while reducing ABA levels. Moreover, seed storage at 30°C for 2 months enhances all morphological growth parameters compared to untreated plots. To further improve plant growth, the effect of organic fertilizers (horse or sheep manure) application was also investigated. These had a positive effect on nutrient availability in the aerial parts of the plant, plant height, number of leaves, stem formation, and root system development. Physiologically, chlorophyll a, b, and total chlorophyll contents, chlorophyll fluorescence, and PSII photochemistry were investigated. Taken together, the results highlighted the beneficial effect of sheep manure on the growth and development of *Cycas revoluta*, and the significant increase in nitrogen amount in the leaves compared to control plants. The root system was marked by the presence of coralloid roots, harboring cyanobacterial and other endophytic bacterial strains. Molecular characterization of the cyanobacterial strains through 16S rRNA sequencing showed strong similarity to the two genera *Nostoc* and *Desmonostoc*. All strains isolated were capable of producing polysaccharides with values ranging from 4.06 g/L to 2.06g/L. 16S rRNA sequencing also enables us to identify the twenty strains of endophytic bacteria cohabiting with cyanobacteria as belonging to the following genera: *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Peribacillus*, *Ochrobactrum*, *Staphylococcus* and *Stenotrophomonas*. Screening of these strains for phosphate solubilization activity, auxin, and siderophore production under normal and salt stress conditions showed that six of them show promising capacities for phosphate solubilization and auxin and siderophore production, particularly under salt stress. Among them, *Pantoea sp.* (M42Y) showed the highest auxin production, while *Bacillus sp.* (FC11P1) showed the best results in siderophore production and phosphate solubilization. Both strains were inoculated *in vitro* to tomato seeds (*Solanum lycopersicum* var. Campbell 33). Inoculation with *Pantoea sp.* or *Bacillus sp.* improved germination rates and reduced mean germination time compared with control seeds. The growth, development, and physiology of tomato plants were studied at 150mM. The depressive effect of salinity on morphological, physiological, and biochemical parameters was attenuated by single and double inoculation. Our data demonstrated that the double inoculation has a positive effect on tomato growth and development, underlining the value of the double inoculation with *Pantoea sp.* and *Bacillus sp.* to minimize the adverse effects of salt stress.

Keywords: *Cycas revoluta*, Warm pretreatments, Germination, Growth, PGP, Salt stress.

Liste des figures

Figure 1. Répartition géographique des cycadales.	7
Figure 2. Développement des feuilles chez un pied femelle de <i>Cycas revoluta</i> . (A) Début de développement, (B) Stade avancé du développement.	10
Figure 3. Plante de <i>Zamia amblyphyllidia</i>	11
Figure 4. Exemples de cônes représentatifs des graines et du pollen de cycadales. (A) Cône de graines de <i>Bowenia serrulata</i> , (B) Cône de graines de <i>Macrozamia lucida</i> , (C) Cône de pollen de <i>Cycas revoluta</i> (D) Cône pollinique de <i>Lepidozamia peroffskyana</i> , E : Cône de graines de <i>Cycas revoluta</i>	12
Figure 5. Développement de bourgeons adventifs (rejets) de <i>Cycas micronesica</i>	13
Figure 6. Charançons <i>Rhopalotria mollis</i> sur cône mâle de <i>Zamia furfuracea</i>	14
Figure 7. Pollinisation des cycadales. (A) Enlèvement de l'apex du cône de <i>Dioon mejiae</i> , (B) Pollinisation humide de <i>Dioon mejiae</i> , (C) Pollinisation sèche de <i>Cycas maconochie</i>	14
Figure 8. Mégasporophylles et ovules de <i>Cycas revoluta</i> . (A) Mégasporophylles pendant la pollinisation montrant la sécrétion des ovules, qui sont de couleur vert clair, (B) Ovules fécondés de couleur rouge orangé.	15
Figure 9. Impact des facteurs environnementaux sur la dormance et la germination de la graine.	19
Figure 10. Rôle de l'acide abscissique et des gibbérellines dans la régulation de la dormance et la germination.	20
Figure 11. Schéma simplifié de la régulation de la germination (contrôle positif en vert, contrôle négatif en rouge).	22
Figure 12. Schéma d'une coupe longitudinale d'une graine mûre de <i>Cycas</i>	23
Figure 13. Différents stades de développement de l'embryon chez <i>Encephalartos natalencis</i> . (a) apparence externe de l'embryon (E) attaché à un long suspenseur (S) au moment de la dissémination de la graine, (b) apparence de l'embryon après 2 mois, (c) embryon au stade torpille toujours attaché au suspenseur, (d) embryon mature bien développé attaché à un suspenseur en phase de dégénérescence (suspenseur desséché et rabougri).	24
Figure 14. Histologie et ultrastructure de l'embryon de l' <i>Encephalartos natalencis</i> au cours des différents stades de développement. (a) et (b) observations microscopiques de l'embryon et du suspenseur juste après la dissémination des graines après coloration au bleu de toluidine. (c), (d) et (e) coupes longitudinales de l'embryon après 2 mois, 4 mois et 6 mois de développement, respectivement, (f) coupe transversale montrant le méristème caulinaire bien développé observé chez l'embryon âgé de 6 mois.	25
Figure 15. Croissance de <i>Cycas revoluta</i> . A : pieds à deux tiges. B : pieds de grande taille avec plusieurs rejets sur la tige principale.	26
Figure 16. Feuille de <i>Microcycas calocoma</i> attaquée par l' <i>Aulacaspis yasumatsui</i>	28
Figure 17. Cônes mâles du <i>Cycas</i> vendus sur les marchés en Inde.	29
Figure 18. Principaux phylums des PGPR identifiés dans la nature et leurs principales caractéristiques.	31
Figure 19. Ensemble des mécanismes impliqués dans l'interaction plante-PGPR dans la rhizosphère.	32
Figure 20. Mode d'action des bactéries productrices de l'AIA.	35

Figure 21. Structure des racines de <i>Cycas</i> . (a) : Racines coralloïdes de <i>Cycas fairylakea</i> à ramification dichotomique ; (b) : Coupe transversale d'une racine coralloïde avec une zone verte distincte : anneau cyanobactérien, (c) : Image microscopique de cyanobactéries filamenteuses.....	39
Figure 22. Diversité taxonomique des endophytes dans les racines de <i>Cycas bifida</i>	39
Figure 23. Diversité taxonomique de communautés endophytes : les cyanobactéries (marquées en vert), les espèces de <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mesorhizobium</i> et <i>Rhizobium</i> (marquées en bleu).	40
Figure 24. Courbe étalon du maltose employé pour la quantification de l'activité de l'alpha-amylase selon le protocole décrit par Liu et al., (2018).	44
Figure 25. Courbe étalon du glucose employé pour la quantification des sucres solubles selon le protocole décrit par Dubois et al., (1956).....	45
Figure 26. Racines coralloïdes de <i>Cycas revoluta</i> hébergeant des cyanobactéries et autres bactéries endophytes.	49
Figure 27. Effet des prétraitements à la chaleur sur la longueur des embryons de <i>Cycas revoluta</i> . (A) Embryons zygotiques isolés à partir de graines soumises à T ₀ , T ₁ , T ₂ , T ₃ et T ₄ . Barres d'échelle = 1 cm. (B) Longueur des embryons zygotiques dans les différents traitements. Les astérisques indiquent une différence statistique selon le test de Tukey (p<0,05).	64
Figure 28. Effet de la chaleur sur le temps de germination des embryons du <i>Cycas revoluta</i> . Les barres représentent les moyennes ± SD d'au moins trente répliques biologiques. Les astérisques indiquent une différence statistique selon le test de Tukey (p<0.05).....	65
Figure 29. Effet des différents traitements thermiques sur le pourcentage de germination des embryons de <i>Cycas revoluta</i>	66
Figure 30. Effet de différents traitements thermiques sur la cinétique de germination des embryons de <i>Cycas revoluta</i>	67
Figure 31. Coupes histologiques d'embryons isolés et colorés au bleu de toluidine. Barre, 200 µm. (A) Embryons témoins (T ₀). (B) Embryons conservés à température ambiante pendant 2 mois. (C) embryons conservés à 30°C pendant 2 mois (T ₂).	69
Figure 32. Estimation qualitative (A) et quantitative (B) de l'activité de l'α-amylase dans les embryons non traités (T ₀) et ceux conservés à 30°C pendant 2 mois (T ₂). Les valeurs correspondent aux moyennes (± écart-type) de trois répétitions biologiques. L'astérisque (*) est statistiquement significatif selon le test T-Student (p <0,05).....	71
Figure 33. Détermination de la teneur en sucres solubles en mg/g de matière fraîche d'embryons en T ₀ et T ₂ . Les valeurs correspondent aux moyennes (± écart-type) de trois répétitions biologiques indépendantes. L'astérisque (*) est statistiquement significatif selon le test T-Student (p <0,05).	72
Figure 34. Plantes de <i>Cycas revoluta</i> obtenues à partir de graines prétraitées (T ₁ , T ₂ , T ₃ et T ₄) et de graines non prétraitées (T ₀).....	76
Figure 35. Effet des amendements organiques sur la croissance de <i>Cycas revoluta</i> . Témoin : plante cultivée dans le sol uniquement. FCH : plante cultivée dans un mélange de terre et de fumier de cheval. FM : plante cultivée en présence de mélange de terre et de fumier de mouton. Barre d'échelle = 13 cm.....	78

Figure 36. Plante de <i>Cycas revoluta</i> présentant des structures de type globulaire ou des nodules dans la partie souterraine de la plante. (A) Système racinaire de <i>Cycas revoluta</i> avec plusieurs structures nodulaires. (B) Touffe de nodules. (C) Nodule isolé présentant un halo bleu-vert qui indique la présence de cyanobactéries. Barre d'échelle = 1 cm.	80
Figure 37. Effet des amendements organiques sur la fluorescence chlorophyllienne des plantes de <i>Cycas</i> cultivées en présence des différents amendements organiques (C : contrôle, FCH: fumier de cheval et FM: fumier de mouton). (A) Activité potentielle du PSII, (B) Rendement quantique photochimique maximal du PSII et (C) Rendement quantique maximal. Les valeurs sont moyennes \pm SD d'au moins douze répétitions indépendantes. Pour chaque paramètre, les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).	82
Figure 38. Corrélogramme montrant les corrélations entre les différents paramètres analysés. L'échelle en bas et les valeurs à l'intérieur des colonnes indiquent la valeur de corrélation de Pearson (>0 = corrélée positivement, <0 = corrélée négativement). L'intensité de la couleur bleue/rouge dans le graphique augmente avec le niveau de corrélation positive/négative.	86
Figure 39. Analyse en composantes principales (ACP) des paramètres utilisés pour évaluer l'effet de l'application des différents amendements organiques sur la croissance du <i>Cycas revoluta</i> . Les observations sont représentées avec un symbole et une couleur propre pour chaque traitement appliqué (Témoin "Control", Fumier de cheval "Horse Manure", Fumier de mouton "Sheep Manure").	88
Figure 40. Observation microscopique des huit isolats CH3C2, CH3C3, CH3C6, CH5CH3, C4, C5, C6 et C7 isolés à partir des racines coralloïdes du <i>Cycas revoluta</i> . Les observations microscopiques ont été réalisées moyennant un microscope optique au grossissement (x400).	89
Figure 41. Dendrogramme (UPGMA) illustrant les relations génétiques résultant de l'analyse par Rep –PCR des huit souches des cyanobactéries isolées des racines coralloïdes du <i>Cycas revoluta</i>	90
Figure 42. Electrophorèse des profils de l'ARNr 16S des souches étudiées. L'électrophorèse a été réalisée sur un gel d'agarose à 2%. Le marqueur de poids moléculaire de 1Kb a été utilisé pour la détermination de la taille des fragments amplifiés.	91
Figure 43. L'arbre phylogénétique NJ (Neighbor-Joining) basé sur les séquences de l'ARNr 16S (727pb) montrant la position des isolats étudiés par rapport aux espèces du genre <i>Nostoc</i> et <i>Desmonostoc</i> , avec le test bootstrap (1000 répliqués).	92
Figure 44. Production de polysaccharides de huit souches isolées de cyanobactéries. La production de polysaccharides a été estimée pour chaque souche de cyanobactéries en g/L. .	93
Figure 45. Electrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR obtenus par amplification du gène ADNr16S pour les vingt souches étudiées. La migration a été réalisée sur un gel d'agarose à 2%. Les bandes latérales (à droite) correspondent au marqueur de taille utilisé (2Kb).	94
Figure 46. Production d'AIA par les vingt souches étudiées estimée en $\mu\text{g/ml}$. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches étudiées.	96

Figure 47. Pourcentage de production des sidérophores par les vingt souches étudiées. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches traitées.	97
Figure 48. Quantité de phosphate solubilisée par les vingt souches étudiées en $\mu\text{g/ml}$. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches traitées.	98
Figure 49. Déviation du pH liée à la quantité de phosphate solubilisé chez les vingt souches étudiées.	99
Figure 50. Production d'AIA par les six souches sélectionnées sous différentes concentrations de NaCl. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches pour la même concentration de NaCl (des couleurs différentes sont utilisées pour chacune des souches).	100
Figure 51. Production de sidérophores par les six souches sélectionnées sous différentes concentrations de NaCl. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches pour la même concentration de NaCl (des couleurs différentes sont utilisées pour chacune des souches).	101
Figure 52. Solubilisation du phosphate inorganique par les six souches sélectionnées sous différentes concentrations de NaCl. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches pour la même concentration de NaCl (des couleurs différentes sont utilisées pour chacune des souches).	102
Figure 53. Cinétique de germination in vitro de graines de <i>Solanum lycopersicum</i> var Campbell inoculées ou pas avec la souche <i>Pantoea</i> sp. ou la souche <i>Bacillus</i> sp., cultivée en présence de différentes concentrations de NaCl : 0mM, 100mM, 120mM et 150mM. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches pour la même concentration de NaCl (des couleurs différentes sont utilisées pour chacune des souches).	104
Figure 54. Hauteur moyenne des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. (A) photo montrant l'allure des plantes non stressées (- NaCl) et stressées (+ NaCl), (B) Hauteur de la plante ainsi que la longueur de la racine principale des plantes cultivées dans les conditions normales et stressantes. Barre, 2 cm. Pour chaque paramètre, l'astérisque montre une différence significative ($p < 0,05$) selon le test t de student.	109
Figure 55. Effet de la simple inoculation par <i>Pantoea</i> sp. ou <i>Bacillus</i> sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la croissance des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Barre = 2 cm.	110
Figure 56. Effet de la simple inoculation par (A) <i>Pantoea</i> sp. ou (B) <i>Bacillus</i> sp. ou (C) la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la hauteur moyenne et la longueur de la racine principale des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Pour chaque paramètre, l'astérisque montre une différence significative ($p < 0,05$) selon le test t de student.	110

Figure 57. Effet de la simple inoculation par <i>Pantoea</i> sp. ou <i>Bacillus</i> sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le nombre de feuilles par pied des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).....	114
Figure 58. Effet de la simple inoculation par <i>Pantoea</i> sp. ou <i>Bacillus</i> sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la surface foliaire des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).....	115
Figure 59. Effet de la simple inoculation par <i>Pantoea</i> sp. ou <i>Bacillus</i> sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le développement des feuilles des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Barre = 1cm.	116
Figure 60. Effet de la simple inoculation par <i>Pantoea</i> sp. ou <i>Bacillus</i> sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le poids sec de la partie aérienne des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).....	118
Figure 61. Effet de la simple inoculation par <i>Pantoea</i> sp. ou <i>Bacillus</i> sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le poids sec de la partie racinaire des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).....	119
Figure 62. Effet de la simple inoculation par <i>Pantoea</i> sp. ou <i>Bacillus</i> sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le ratio partie aérienne/partie racinaire des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).	120
Figure 63. Effet de la simple inoculation par <i>Pantoea</i> sp. ou <i>Bacillus</i> sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la teneur en sucres solubles des feuilles des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).	121
Figure 64. Effet de la simple inoculation par <i>Pantoea</i> sp. ou <i>Bacillus</i> sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la teneur en chlorophylle a des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).....	123
Figure 65. Effet de la simple inoculation par <i>Pantoea</i> sp. ou <i>Bacillus</i> sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la teneur en chlorophylle b des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).....	125

- Figure 66.** Effet de la simple inoculation par *Pantoea* sp. ou *Bacillus* sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la teneur en chlorophylle (a+b) des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$)..... 126
- Figure 67.** Effet de la simple inoculation par *Pantoea* sp. ou *Bacillus* sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la teneur en anthocyanes des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$)..... 128
- Figure 68.** Effet de la simple inoculation par *Pantoea* sp. ou *Bacillus* sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la teneur relative en eau foliaire (TRE) des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$). 130
- Figure 69.** Effet de la simple inoculation par *Pantoea* sp. ou *Bacillus* sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le nombre de fruits/plante des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$)..... 132
- Figure 70.** Effet de la simple inoculation par *Pantoea* sp. ou *Bacillus* sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le poids moyen des fruits produits par des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$). 133

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification de l'ordre des cycadales établie par Stevenson, (1992) comprenant une estimation du nombre d'espèces constituant chaque genre.	8
Tableau 2. Classification de l'espèce <i>Cycas revoluta</i> selon Walters and Osborne, (2004).	8
Tableau 3. Durée de conservation des graines de quelques cycadales.	16
Tableau 4. Traitements thermiques des graines de <i>Cycas revoluta</i>	42
Tableau 5. Caractérisation et composition en éléments nutritifs du sol agricole et des amendements organiques. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. CEC: capacité d'échange cationique.	47
Tableau 6. Combinaison d'amorces utilisées pour la réaction de polymérisation en chaîne décrite par Mehta et al. (2002).	51
Tableau 7. Couple d'amorces utilisées pour l'amplification du gène ADNr 16S.	54
Tableau 8. Programme de la réaction de polymérisation en chaîne employée pour l'amplification du gène ADNr 16S.	54
Tableau 9. Teneurs en GA ₃ et ABA dans des embryons non prétraités (T ₀) et prétraités à 30°C (T ₂) exprimées en $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche ($\mu\text{g/g}$ MF). Les valeurs sont la moyenne \pm SD de trois répétitions indépendantes. L'astérisque (*) montre une signification statistique selon le test t-Student ($p < 0,05$).	74
Tableau 10. Effets des différents prétraitements des graines de <i>Cycas revoluta</i> sur la croissance et le développement des plantules. Les valeurs sont la moyenne \pm écart-type de trente répétitions biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent la signification statistique ($p < 0,05$) selon le test de Tukey.	75
Tableau 11. Effet des amendements organiques (fumier du cheval et du mouton) sur les paramètres morphologiques des plantes de <i>Cycas revoluta</i> . Les valeurs sont moyennes \pm SD d'au moins douze répétitions indépendantes. Pour chaque paramètre, les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).	77
Tableau 12. Effet des amendements organiques sur les taux de chlorophylle a, b et totale. Les valeurs sont moyennes \pm SD d'au moins douze répétitions indépendantes. Pour chaque paramètre, les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).	81
Tableau 13. Composition en certains éléments nutritifs des feuilles et des racines de plants de <i>Cycas revoluta</i> dans le sol amendé ou pas. Les valeurs sont moyennes \pm SD d'au moins douze répétitions indépendantes. Pour chaque paramètre, les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).	84
Tableau 14. Classification des souches cyanobactériennes selon la rep-PCR.	91
Tableau 15. Identification moléculaire des vingt isolats étudiés par comparaison de la séquence de l'ADNr16S de chaque isolat avec les différentes souches répertoriées dans la base de données NCBI.	95
Tableau 16. Effet de l'inoculation bactérienne des graines de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> var Campbell 33) sur le pourcentage de germination (PG %), l'indice de germination (IG) et le temps moyen de germination (TMG) des graines soumises à 0 mM, 100 mM, 120 mM et 150	

mM de NaCl. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches pour la même concentration de NaCl (des couleurs différentes sont utilisées pour chacune des souches). 105

Tableau 17. Effet de la simple inoculation par *Pantoea* sp. ou *Bacillus* sp. ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la longueur de la racine principale des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les valeurs représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$). 112

Liste des abréviations

%	Pourcent
µl	microlitre
µm	Micromètre
A	absorbance
ABA	Acide abscissique
ABI5	ABA-insensitive 5
ACC	Acide -1- aminocyclopropane-1-carboxyl
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr 16S	ADN ribosomique 16S
AIA	Acide indole-3-acétique
ARN 16S	ARN ribosomique 16S
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BG-11	Milieu Blue Green
BN	Bouillon nutritif
CAS	Chrom azurol-S
CEC	Capacité d'échange cationique
Chl a, chl b et chl a+b	Chlorophylle a, chlorophyll b, chlorophylle (a+b)
Cl	Chlore
CNRST	Centre National pour la recherche scientifique et technique
CRRA	Centre régional de la recherche agronomique de Rabat
CTAB	Bromure de cetyltriméthylammonium
Cu	Cuivre
d	Nombre de jours depuis le début de l'expérience
DAPG	2,4-diacétylphloroglucinol
DFR	Dihydroflavonol-4-reductase
Dim1, Dim2	Dimension 1, Dimension 2
DO	Densité optique
Dt	Nombre de jours de germination
DTPA	Acide diéthylène triamine penta acétique
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EPS	Exopolysaccharides
eV	Exavolts
EZ	Embryon zygotique
F3'H	Flavonone-3-hydroxylase
Fe	Fer
FE²⁺	Ion ferreux
Fe³⁺	Ion ferrique
GA	Acide gibbérellique
GA3ox	GA3-oxydase
Gt	Nombre de graines germées en t jours
H₂SO₄	Acide sulfurique
Ha	Hectare
HCl	Acide hydrochloridrique
HCN	Cyanure d'hydrogène
HgCl₂	Chlorure de mercure

I₂	diode
IG	Indice de germination
K	Potassium
Kb	Kilobases
kg	Kilogramme
KI	Iodure de potassium
KNO₃	Nitrate de potassium
kV	Kilovolts
LC-MS/MS	Liquid chromatography- mass spectrometry/ mass spectrometry.
LPS	lipopolysaccharide
meq	Mili-équivalent
MF	Matière fraîche
min	minute
MS	Matière sèche
n	Nombre de graines germées chaque jour
N	Nombre total des graines ayant germées à la fin de l'expérience
N₂	Azote moléculaire
Na	Sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOCl	Hypochlorite de sodium
Ng	Nombre de graines germées
NGS	Next-generation sequencing
NH₃	Ammoniac
NH₄⁺	ammonium
NI	Non-inoculé
NO₃⁻	Nitrate
Nt	Nombre total des graines mises en culture
P	Phosphore
PAP1	Anthocyanin pigment 1
pb	Paire de bases
PCA	Analyse en composantes principales
PCR	Reaction de polymérisation en chaîne
PCR inter-REP	Repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction
PF	Poids frais
PG%	Pourcentage de germination
PGP	Plant Growth Promoting
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PS	Poids sec
PS	Polysaccharide
PSB	Bactéries solubilisatrices de phosphate
PT	Poids à la turgescence
PVK	Milieu Pikovskaya phosphate liquide
RWC ou TRE	Teneur relative en eau
SDS	Dodécylsulfate de sodium
T	Température
T0, T1, T2, T3, T4	Traitement 0, Traitement 1, Traitement 2, Traitement 3, Traitement 4
TMG	Temps moyen de germination
Tr/min	Tours/minute
UATRS	Unités d'appui techniques à la recherche scientifique

UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic averages
UV	Ultra-violet
YEM	Yeast Extract mannitol
Zn	Zinc
α-amylase	Alpha-amylase

Table de matières

Avant-propos

Dédicaces

Productions scientifiques

Résumé

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale.....	1
Synthèse bibliographique	6
1. Généralités sur les cycadales	6
1.1. Répartition géographique	6
1.2. Systématique	8
1.3. Biologie des cycadales	9
1.3.1. Système racinaire	9
1.3.2. Tronc	9
1.3.3. Feuillage.....	10
1.3.4. Fleurs.....	11
1.4. Multiplication classique	12
1.4.1 Multiplication asexuée	12
1.4.1. Multiplication sexuée.....	13
1.4.1.1. Pollinisation et fécondation	14
1.4.1.2. Stockage des graines	15
1.4.1.3. Germination.....	16
1.4.1.3.1. Définition.....	17
1.4.1.3.2. Conditions externes de la germination	17
1.4.1.3.3. Dormance des graines	18
1.4.1.3.4. Physiologie de la germination	19
1.5. Croissance des cycadales	26
1.6. Insectes et ravageurs.....	28
1.7. Utilisation des cycadales	28
1.8. Microflore des cycadales.....	29
1.8.1. Rhizobactéries promotrices de la croissance (PGPR).....	30

1.8.1.1.	Définition.....	30
1.8.1.2.	Diversité taxonomique	30
1.8.1.3.	Modes d'action des PGPR.....	32
1.8.1.3.1.	Stimulation de la croissance (mode direct)	32
1.8.1.3.2.	Protection contre divers phytopathogènes (mode indirect).....	36
1.8.2.	Bactéries associées aux cycadales.....	37
1.8.2.1.	Cyanobactéries	38
1.8.2.2.	Autres bactéries endophytes	39
	Matériel et Méthodes.....	42
1.	Matériel végétal	42
2.	Méthodes.....	42
2.1.	Amélioration de la germination des graines de <i>Cycas revoluta</i>	42
2.1.1.	Traitement des graines	42
2.1.2.	Mesure de la longueur et de la largeur de l'embryon	42
2.1.3.	Observation microscopique des embryons zygotiques	43
2.1.4.	Dosage de l'activité de l'alpha-amylase au niveau des embryons zygotiques	43
2.1.4.1.	Dosage qualitatif de l'activité de l'alpha-amylase.....	43
2.1.4.2.	Dosage quantitatif de l'activité de l'alpha-amylase	44
2.1.4.3.	Dosage des sucres solubles au niveau de l'embryon	44
2.1.4.4.	Quantification des phytohormones dans les embryons zygotiques	45
2.1.4.5.	Germination des graines et croissance des plantules.....	46
2.2.	Amélioration de la croissance des plantes de <i>Cycas revoluta</i> par apport des amendements organiques	46
2.2.1.	Traitements du sol.....	46
2.2.2.	Détermination de la teneur en éléments nutritifs des feuilles, des tiges et des racines.....	47
2.2.3.	Mesure de la fluorescence de la chlorophylle.....	48
2.2.4.	Détermination de la teneur en chlorophylle a, b et en chlorophylle totale .	48
3.	Isolement et caractérisation des populations bactériennes associées au <i>Cycas revoluta</i>	48
3.1.	Isolement des cyanobactéries à partir des nodosités du <i>Cycas revoluta</i>	48
3.1.1.	Stérilisation des nodosités.....	48
3.1.2.	Isolement des cyanobactéries.....	49

3.1.3.	Caractérisation morphologique des isolats	50
3.1.4.	Caractérisation moléculaire des isolats	50
3.1.4.1.	Extraction de l'ADN	50
3.1.4.2.	Dosage de l'ADN	50
3.1.4.3.	Caractérisation des souches par PCR inter-REP	51
3.1.4.4.	Amplification et séquençage de l'ADNr 16S	52
3.1.5.	Extraction des polysaccharides	52
3.2.	Isolement d'autres bactéries endophytes des nodosités du <i>Cycas revoluta</i>	53
3.2.1.	Isolement des bactéries endophytes	53
3.2.2.	Caractérisation moléculaire des bactéries endophytes.....	53
3.2.2.1.	Extraction de l'ADN	53
3.2.2.2.	Dosage de l'ADN.....	54
3.2.2.3.	Amplification et séquençage de l'ADNr 16S.....	54
3.2.3.	Evaluation du potentiel PGP des bactéries endophytes	55
3.2.3.1.	Synthèse d'AIA	55
3.2.3.2.	Production de sidérophores	56
3.2.3.3.	Solubilisation du phosphate.....	56
4.	Effet de certaines bactéries endophytes isolées des racines du <i>Cycas revoluta</i> sur la germination et la croissance des plantes de tomate.....	57
4.1.	Matériel végétal.....	57
4.2.	Matériel biologique	57
4.3.	Activation des souches bactériennes	57
4.4.	Effet de l'inoculation sur la germination des graines de tomate.....	57
4.4.1.	Préparation de la suspension bactérienne	57
4.4.2.	Désinfection des graines de tomate.....	57
4.4.3.	Inoculation et mise en culture des graines	58
4.4.4.	Détermination du pourcentage de germination	58
4.4.5.	Détermination de l'indice de germination	58
4.4.6.	Détermination du temps moyen de germination	58
4.5.	Effet de l'inoculation sur la croissance des plantes de tomate.....	58
4.5.1.	Culture des plantes	58
4.5.2.	Inoculation des plantes par les bactéries	59
4.5.3.	Application du stress.....	59
4.5.4.	Évaluation des paramètres de croissance	59

4.5.4.1.	Détermination du poids sec	59
4.5.4.2.	Détermination de la hauteur de la plante et de la longueur de la racine principale	60
4.5.4.3.	Détermination du nombre de feuilles par plante	60
4.5.4.4.	Détermination du rapport pousse/racine.....	60
4.5.4.5.	Détermination de la surface foliaire	60
4.5.5.	Évaluation des paramètres physiologiques et biochimiques.....	60
4.5.5.1.	Teneur en chlorophylle.....	60
4.5.5.2.	Teneur en anthocyanes	61
4.5.5.3.	Teneur en sucres solubles.....	61
4.5.5.4.	Teneur relative en eau	61
4.5.6.	Évaluation des paramètres liés à la productivité.....	61
5.	Analyse statistique	62
	Résultats et discussion.....	64
1.	Amélioration de la germination des graines et de la croissance des plantes de <i>Cycas revoluta</i>	64
1.1.	Allongement de l'embryon zygotique.....	64
1.2.	Germination des graines	64
1.2.1.	Temps de germination.....	65
1.2.2.	Pourcentage de germination.....	65
1.2.3.	Cinétique de la germination	66
1.2.4.	Analyse histologique.....	68
1.2.5.	Dosage de l'alpha-amylase	71
1.2.6.	Antagonisme acide abscissique / acide gibbérellique	73
2.	Croissance et développement des plantules.....	74
2.1.	Effet des prétraitements à chaud des graines sur la croissance et le développement des plantules de <i>Cycas revoluta</i>	74
2.2.	Effet des amendements organiques sur la croissance et le développement des plantes.....	77
2.2.1.	Croissance des plantes en présence des différents apports organiques.....	77
2.2.2.	Physiologie des plantes en présence des différents apports organiques	80
2.2.2.1.	Teneurs en chlorophylles.....	81
2.2.2.1.1.	Chlorophylles a, b et totale.....	81
2.2.2.1.2.	Fluorescence chlorophyllienne.....	82

2.2.2.2.	Composition en éléments nutritifs des feuilles et des racines	83
3.	Microflore de <i>Cycas revoluta</i>	89
3.1.	Isolement et identification des cyanobactéries associées au <i>Cycas revoluta</i>	89
3.1.1.	Caractérisation moléculaire des isolats de cyanobactéries	90
3.1.1.1.	Analyse de la diversité intra-spécifique par la rep-PCR	90
3.1.1.2.	Amplification du gène ARNr 16S	91
3.1.1.3.	Séquençage du gène de l'ARNr 16S	91
3.1.2.	Production des polysaccharides	93
3.2.	Isolement et identification des bactéries endophytes associées au <i>Cycas revoluta</i>	94
3.2.1.	Identification des souches bactériennes par séquençage.....	94
3.2.2.	Évaluation des activités PGP des bactéries isolées des racines de <i>Cycas revoluta</i>	96
3.2.2.1.	Activités PGP en conditions normales	96
3.2.2.1.1.	Synthèse d'auxine.....	96
3.2.2.1.2.	Production des sidérophores.....	97
3.2.2.1.3.	Solubilisation de phosphate.....	98
3.2.2.2.	Activités PGP en conditions de stress salin.....	99
3.2.2.2.1.	Synthèse d'auxine.....	100
3.2.2.2.2.	Production de sidérophores	101
3.2.2.2.3.	Solubilisation de phosphate.....	102
4.	Effet conjugué du stress salin et de l'inoculation bactérienne sur la germination et la croissance de la tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	103
4.1.	Germination in vitro des graines de tomate.....	103
4.1.1.	Cinétique et pourcentage de germination	103
4.1.2.	Indice de germination	106
4.1.3.	Temps moyen de germination.....	107
4.2.	Caractérisation des paramètres biométriques des plants de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> variété Campbell 33).....	109
4.2.1.	Croissance des plantes	109
4.2.1.1.	Hauteur de la plante.....	109
4.2.1.2.	Longueur de la racine principale	112
4.2.2.	Nombre de feuilles	113
4.2.3.	Surface foliaire.....	115

4.2.4.	Poids sec de la partie aérienne	117
4.2.5.	Poids sec des racines	118
4.2.6.	Ratio partie aérienne / racines	120
4.3.	Caractérisation des paramètres physiologiques et biochimiques de la tomate.	121
4.3.1.	Sucres solubles	121
4.3.2.	Teneur en chlorophylles	123
4.3.2.1.	Teneur en chlorophylle a	123
4.3.2.2.	Teneur en chlorophylle b	124
4.3.2.3.	Teneur en chlorophylle totale	126
4.3.3.	Teneur en anthocyanes	127
4.3.4.	Teneur relative en eau des feuilles	129
4.4.	Evaluation de certains paramètres liés à la productivité des plantes de tomate	131
4.4.1.	Nombre de fruits par plante	131
4.4.2.	Poids frais des fruits par plante	133
	Conclusion et perspectives	136
	Références bibliographiques	143
	ANNEXES	166

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'espèce *Cycas revoluta*, appartenant à la famille des Cycadacées, est une gymnosperme largement prisée en tant que plante ornementale d'intérieur et d'extérieur, depuis des décennies (Hinkle, 1994). Originaires des régions tempérées, subtropicales et tropicales du monde, elle prospère principalement dans les préfectures de Miyazaki, Kagoshima dans le district de Kyushu jusqu'aux îles Ryukyu et d'Okinawa au Japon (Dehgan et al., 1994; Zarchini et al., 2011). Parmi les cycas vivants, elle est taxonomiquement connue en tant qu'espèce primitive la plus importante, ce qui lui vaut la dénomination de « fossile vivant » (Schutzman, 1984).

Outre son usage en aménagement paysager, *Cycas revoluta* possède des propriétés médicinales, d'où son utilisation traditionnelle dans le traitement du cancer (Small, 2011; da Silva et al., 2015). Cependant, elle présente également un potentiel toxique, probablement en raison de la présence du glucoside cycasine (Barceloux, 2009; Said Ali et al., 2014), tout en étant une source naturelle de produits antimicrobiens et pesticides (Lim, 2011). Par conséquent, la présente espèce est menacée d'extinction. Les principales menaces identifiées incluent la surexploitation indisciplinée en raison du braconnage pour des fins commerciales, de la dégradation de leur zone d'existence via la destruction des habitats pour le développement agricole, domestique et commercial, mais également suite à des événements environnementaux dévastateurs (Donaldson and Union internationale pour la conservation de la nature et de ses ressources, 2003; Hayward et Kuwahara, 2013; Rao et al., 2014).

Cycas revoluta est une plante dioïque, se propageant soit par des graines, soit par des rejets végétatifs (Demiray et al., 2017). La propagation de Cycas à travers les graines est extrêmement difficile en raison de la dormance physique imposée par la présence d'un tégument dur, ce qui entraîne un problème d'infiltration d'eau (Frett, 1987; Zarchini et al., 2011; Ullah et al., 2020). De plus, les graines montrent également une perte rapide de viabilité ainsi qu'un faible potentiel morphogénique, ce qui retarde leur germination et limite donc leur utilisation pour une propagation rapide et efficace (Naderi et al., 2015; Demiray et al., 2017). La propagation par rejets végétatifs est limitée en raison du faible nombre de rejets (Dehgan, 2014). Face à ces défis, diverses tentatives sont entreprises pour surmonter ce problème de dormance des graines de *Cycas revoluta*. Les traitements de pré-germination semblent offrir une nouvelle approche pour augmenter le taux de germination des graines. La scarification

mécanique et chimique a été largement décrite comme un moyen efficace pour améliorer la germination des cycas et d'autres espèces connues par leurs graines à coque dure (Frett, 1987; Rouhi et al., 2015). Plusieurs études ont signalé une grande réactivité des graines de cycas à divers pré-traitements, notamment la scarification, le dépulpage, l'exposition à des substances chimiques telles que le nitrate de potassium, l'acide gibbérélique ou l'acide sulfurique, ou le trempage dans de l'eau chaude pendant une période spécifique (Zarchini et al., 2011; Millaku et al., 2012). La stratification chaude a également été utilisée pour améliorer la germination des graines de nombreuses espèces telles que *Sambucus* et *Symphoricarpos* (Baskin, 2009).

En dehors des défis liés à la propagation par graines, *Cycas revoluta* est une espèce à croissance lente qui nécessite jusqu'à 10 ans pour atteindre la maturité reproductive (Frett, 1987; Rinaldi, 1999). Ainsi, la population des cycas sur le terrain augmente naturellement à un rythme très lent. La perte rapide de la viabilité des graines et leur faible potentiel morphogénique entravent aussi la conservation de l'espèce. Malgré une protection législative depuis un certain nombre d'années, et en dépit des règlements de CITES qui ont réduit le commerce international des cycas, il n'y a pas eu d'augmentation substantielle de leur nombre. En fait, les cycadales sont inscrites sur la liste rouge des plantes menacées de l'Union internationale pour la conservation de la nature (Joseph, 2017).

La gestion nutritionnelle à travers les engrais organiques est utile pour améliorer la croissance, le rendement et la qualité des plantes (El-Sherbeny et al., 2012; Marak et al., 2020). Les amendements organiques sont, par définition, des dérivés d'animaux, de plantes et de microorganismes. Un large éventail de fertilisants est aujourd'hui disponible sur le marché à des prix abordables (Khairnar et Kaur, 2022). En tant qu'engrais à libération lente, ils fournissent des nutriments en quantités moindres sur une période de temps étendue (Shaji et al., 2021). Ils sont considérés comme une source naturelle d'approvisionnement en nutriments dans le sol et assurent le retour de macronutriments essentiels tels que l'azote, le phosphore, le calcium, le magnésium et le soufre, ainsi que des micronutriments comprenant le manganèse, le fer, le zinc... (Parham et al., 2002; Wang et al., 2010; Khaitov et al., 2019). Par ailleurs, les fumiers d'animaux, verts ou compostés, perfectionnent les propriétés physiques du sol en réduisant la densité apparente, en améliorant la capacité de rétention d'eau du sol et en augmentant les taux d'infiltration (Tester, 1990; Werner, 1997; Gopinath et al., 2008). Les engrais organiques ont largement été utilisés pour améliorer la croissance des plantes appartenant à de nombreuses espèces cultivées, notamment le blé (*Triticum aestivum*), la canne à sucre (*Saccharum officinarum*), le riz (*Oryza sativa*) et le maïs (*Zea mays*), ainsi que

dans des plantes ornementales telles que les soucis (*Calendula officinalis*), les glaïeuls (*Gladiolys grandiflorus*) et les roses (*Rosa*) (Shanmugam et Veeraputhran, 2000; Attieh et al., 2002; Singh et al., 2006; Aziz et al., 2010; Abbas et al., 2012; Soomro et al., 2013; Idan et al., 2014; Baruati et al., 2018).

Les cycas sont reconnus comme le taxon le plus ancien parmi les plantes à graines, conservant ainsi des caractéristiques primitives héritées de leurs ancêtres. Ceci est peut-être associé à leur capacité à former des relations symbiotiques principalement avec des cyanobactéries qui colonisent les racines coralloïdes (Lobakova et al., 2003). Ces racines spécialisées hébergent également d'autres bactéries endophytes qui sont encore mal étudiées et identifiées (Hardoim et al., 2015). Une étude antérieure a rapporté que la diversité des micro-organismes endophytes dans les racines coralloïdes est déterminée par les relations existantes entre l'hôte et l'environnement (Liu et al., 2023).

Récemment, l'exploitation des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) notamment les bactéries endophytes, s'associe à la promotion de la croissance de plusieurs espèces de culture telles que le maïs (AlKahtani et al., 2020), le blé (Khan et al., 2017), la tomate (*Solanum lycopersicum*) (Amaresan et al., 2012), le riz (*Oryza sativa*) (Khan et al., 2020) et le piment (*Capsicum annum*) (Amaresan et al., 2012). Ces bactéries PGPR ont également la capacité de contrôler les agents pathogènes des plantes grâce à la production de divers antibiotiques et entrer en compétition avec eux dans l'exploitation de l'espace et des nutriments (Kumar et Verma, 2018). Cette approche biologique alternative vise à restaurer les sols et à améliorer la tolérance des plantes aux stress biotiques et abiotiques (Dimkpa et al., 2009). Ces bactéries endophytes utilisent divers mécanismes pour accroître la productivité des cultures sur des terres affectées par le stress. Certains de ces mécanismes sont liés à une meilleure disponibilité des éléments nutritifs. Ils incluent la fixation biologique de l'azote, la solubilisation du phosphate, la production de sidérophores et la synthèse de substances de croissance telles que les auxines, les cytokinines et les gibbérellines (Todorovic et Glick, 2008). Le présent travail s'inscrit dans le cadre de développer de nouvelles stratégies pour améliorer la germination, la croissance et le développement de la plante de *Cycas revoluta*. De ce fait, nous avons pensé à améliorer et à optimiser la capacité germinative de cette espèce en exposant les graines à des prétraitements thermiques afin de développer un protocole de germination *in vivo* efficace pour cette espèce ornementale récalcitrante. Sachant que l'effet bénéfique de la température chaude sur la germination des graines n'est pas encore pleinement compris, nous nous sommes concentrés sur les changements histologiques et biochimiques

survenant dans les graines stratifiées à chaud en comparaison avec le témoin, afin d'expliquer l'effet positif de la stratification chaude sur la germination des graines.

Nous étudierons l'effet des engrais organiques, spécialement les fumiers de mouton et de cheval, sur la croissance et le développement de *Cycas revoluta* en menant des analyses biométriques, biochimiques et physiologiques. De plus, notre étude se focalisera sur la population bactérienne, cyanobactéries et autres bactéries endophytes, présente dans les nodosités au niveau des racines coralloïdes de *Cycas revoluta*. Dans ce sens, nous procéderons ainsi dans un premier temps à la caractérisation morphologique et moléculaire des cyanobactéries isolées des racines ainsi que leur potentiel à produire des exopolysaccharides (ESP). Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à : (i) l'identification d'une collection de bactéries endophytes isolées à partir des racines coralloïdes de l'espèce *Cycas revoluta* par séquençage du gène ADNr 16S; (ii) au criblage des souches isolées en fonction de trois activités liées à la promotion de croissance : la synthèse d'auxine, la production de sidérophores et la solubilisation du phosphate inorganique en absence et en présence de NaCl et (iii) l'évaluation de la capacité des souches sélectionnées à maximiser la germination des graines et la croissance de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Campbell 33) à la fois en conditions normales et sous stress salin afin de développer de nouvelles solutions durables, respectueuses de l'environnement (green eco-friendly).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les cycadales

Les cycadales sont un groupe de plantes qui existent depuis environ 300 millions d'années. Elles sont apparues sur terre pendant l'ère permienne (entre 280 et 300 millions d'années) et ont atteint une diversité maximale au cours du Jurassique (entre 150 à 200 millions d'années) (Whitelock, 2002). Les cycadales sont qualifiées de « fossiles vivants », du fait qu'elles ont conservé leur forme pratiquement inchangée pendant des millions d'années (Donaldson et Union internationale pour la conservation de la nature et de ses ressources, 2003).

1.1. Répartition géographique

Toutes les espèces de cycadales firent leur apparition dans les régions tropicales et subtropicales chaudes à travers le monde, notamment en Amérique du Nord, du Sud et Centrale, en Afrique, en Asie et en Australie, ainsi que dans un nombre important d'îles océaniques (Fig. 1). L'Australie étant le pays le plus riche avec une représentation de 78 espèces dans quatre genres, suivie du Mexique avec 45 espèces en trois genres et de l'Afrique du Sud avec 40 espèces sous deux genres (Vovides, 1990; Donaldson et Union internationale pour la conservation de la nature et de ses ressources, 2003). Par ailleurs, la majorité des espèces des cycadales vivent dans les habitats subtropicaux alors que seulement quelques taxons se trouvent dans les régions équatoriales à des altitudes élevées où les conditions d'humidité et de température sont généralement basses. Les forêts tropicales de basse altitude, où l'humidité et la température sont plus élevées, sont généralement peuplées d'espèces du genre *Zamia*. Cependant, certaines espèces d'*Encephalartos* en Afrique du Sud, tolèrent les chutes de neige et les fortes gelées qui ont lieu en hiver (Donaldson, 1995).

Actuellement, les cycadales prospèrent en dehors de leurs habitats naturels. L'espèce *Cycas revoluta* Thunb appréciée pour son caractère ornemental et esthétique, est très cultivée dans les parcs et les jardins particuliers. Elle leur donne une touche de tropicalité et une apparence exotique.

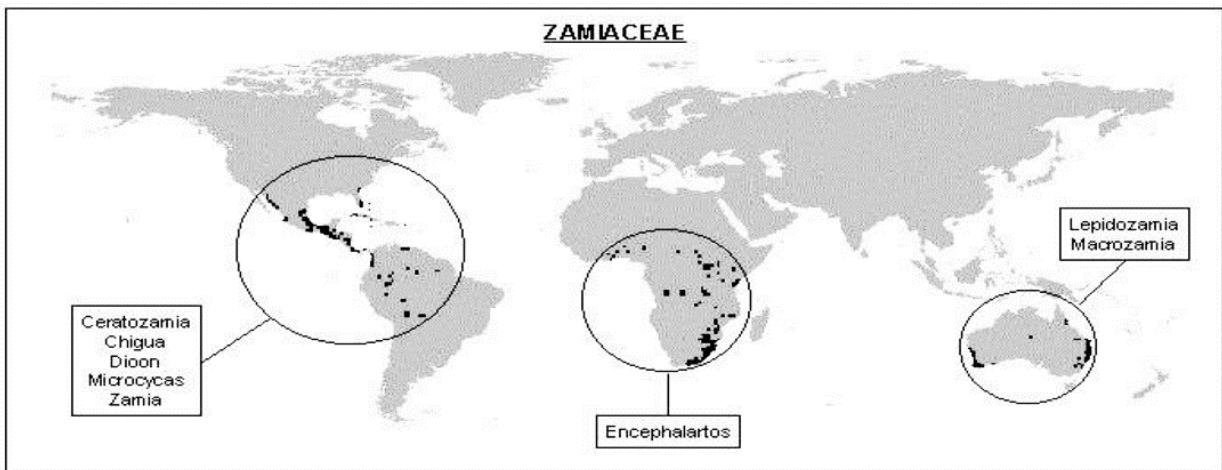
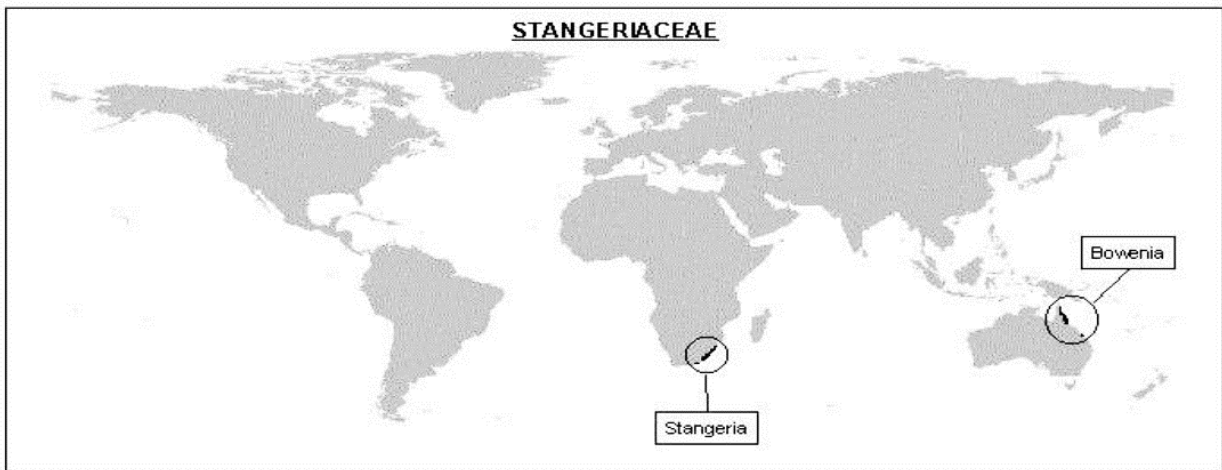
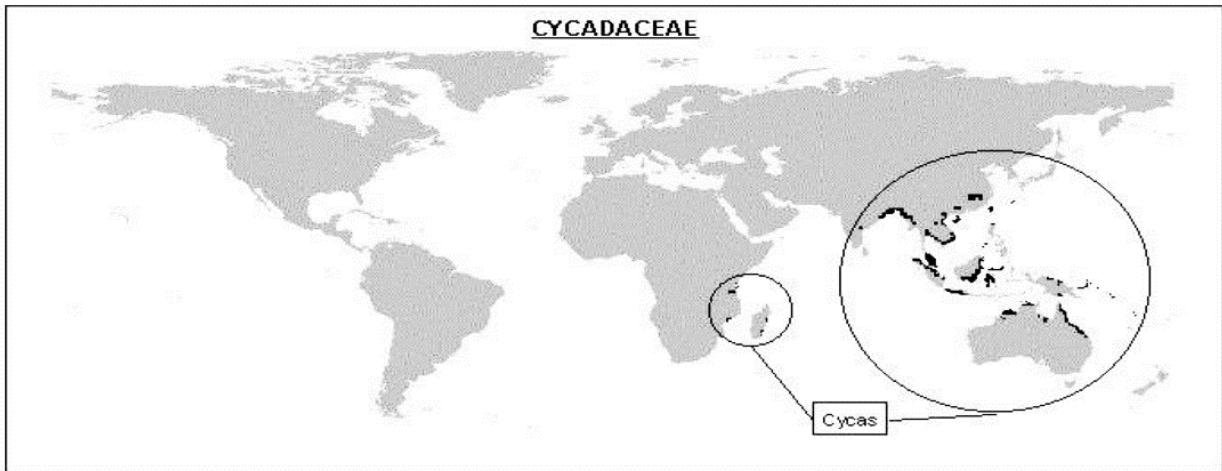


Figure 1. Répartition géographique des cycadales (Donaldson et Union internationale pour la conservation de la nature et de ses ressources, 2003).

1.2.Systématique

Les cycadales sont des gymnospermes représentées par trois familles : les *Cycadacées*, les *Stangeriacées* et les *Zamiacées*, 11 genres et environ 300 espèces sauvages et cultivées (Chavez et Litz, 1999) (Tab. 1).

Tableau 1. Classification de l'ordre des cycadales établie par Stevenson, (1992) comprenant une estimation du nombre d'espèces constituant chaque genre.

Ordre	Famille	Sous-famille	Genre	Nombre d'espèces
Cycadales	Cycadaceae		<i>Cycas</i>	98
	Stangeriaceae	Bowenioideae	<i>Bowenia</i>	2
		Stangerioideae	<i>Stangeria</i>	1
	Zamiaceae	Encephalartoideae	<i>Dioon</i>	11
			<i>Encephalartos</i>	68
			<i>Lepidozamia</i>	2
		Zamioideae	<i>Macrozamia</i>	37
			<i>Ceratozamia</i>	18
			<i>Chigua</i>	2
			<i>Microcycas</i>	1
		<i>Zamia</i>	57	

Cycas revoluta décrite comme étant l'une des espèces les plus primitives parmi les cycas vivants, est utilisée comme plante ornementale d'intérieur et d'extérieur depuis des siècles (Stevenson, 1992; Hinkle, 1994) (Tab. 2).

Tableau 2. Classification de l'espèce *Cycas revoluta* selon Walters and Osborne, (2004).

Sous règne	Trachéophytes à graines
Embranchement	Préspermaphytes
Sous embranchement	Gymnospermes
Division	Cycadophytes
Classe	Cycadopside
Ordre	Cycadales
Famille	Cycadaceae
Genre	<i>Cycas</i>
Espèce	<i>revoluta</i>

Les variétés de *Cycas revoluta* sont extrêmement rares et de petite taille. Satake (1981) a énuméré neuf cultivars :

- *Cycas revoluta* var. *cristata*
- *Cycas revoluta* var. *diplofoliolum*
- *Cycas revoluta* var. *corrugata*
- *Cycas revoluta* var. *variegata*
- *Cycas revoluta* var. *alba*
- *Cycas revoluta* var. *aurea*
- *Cycas revoluta* var. *hystrix*
- *Cycas revoluta* var. *involuta*
- *Cycas revoluta* var. *glabre*

1.3. Biologie des cycadales

Désignées de « fossiles vivants », les cycadales ont très peu évolué dans le temps. Toutes les espèces se distinguent par la forme, le nombre de cônes, la taille, la forme de croissance, la taille des graines, la biologie de la pollinisation, la longévité et les agents de dispersion. Ces facteurs influent sur leur affluence, l'aire de répartition et le biotope où elles se développent (Donaldson et Union internationale pour la conservation de la nature et de ses ressources, 2003).

1.3.1. Système racinaire

Le système racinaire est représenté par une racine pivotante équivalente au système racinaire primaire rencontré chez la plupart des plantes, des racines adventives et enfin des racines spécialisées nommées racines coralloïdes qui hébergent des bactéries endophytes, cyanobactéries et autres, garantissant ainsi leur survie et développement dans les milieux appauvris en éléments nutritifs (Norstog et Nicholls, 2020).

1.3.2. Tronc

Les cycadales ayant un aspect entre celui des palmiers et des fougères, sont caractérisées par un tronc de forme cylindrique de taille et de diamètre variables.

1.3.3. Feuillage

Les feuilles pennées prennent naissance autour d'un axe primaire portant deux rangées d'axes secondaires lesquels, à leur tour, peuvent porter des feuilles de troisième ordre. Ainsi, les feuilles s'organisent en couronne, caractéristique des gymnospermes. Certaines cycadales montrent les axes secondaires avec des folioles parallélinerves. Chez les cycas, les feuilles se présentent au sommet du tronc. Elles sont de couleur vert foncé, arquées vers le bas, raides, coriaces, tannées, insérées sur le stipe par un long pétiole bordé d'épines, pouvant atteindre une longueur de 1 à 2 mètres (Walters et Osborne, 2004; Rutherford et *al.*, 2013) (Fig. 2).



Figure 2. Développement des feuilles chez un pied femelle de *Cycas revoluta*. (A) Début de développement, (B) Stade avancé du développement (Zhang, 2019).

Par ailleurs, le genre *Zamia* montre une prolifération foliaire dès la base du tronc. La couronne rassemble 15 feuilles au maximum, toutes composées d'environ 40 folioles distribuées uniformément et peut atteindre une longueur de 150 centimètres (Fig. 3).



Figure 3. Plante de *Zamia amblyphyllidia* (Zhang, 2019).

1.3.4. Fleurs

Les fleurs, à l'origine des organes reproducteurs, sont sous forme de cônes naissant à l'apex de la plante. Les pieds mâles portent des cônes de pollen alors que les pieds femelles portent des cônes de graines. Ces derniers sont généralement étendus ayant des écailles plus grandes et moins nombreuses que les cônes de pollen qui sont plus étroits. Les écailles des cônes de graines, appelées mégasporophylles montrent des ovules nus qui deviendront des graines une fois pollinisées, tandis que les écailles des cônes de pollen, appelées microsporophylles, développent des sacs polliniques appelés microsporanges (Fig. 4). Le genre *Cycas* (unique représentant de la famille des Cycadaceae) se distingue des autres genres des Cycadales par l'organisation de ses structures reproductrices femelles. Les ovules sont formés sur le bord de grandes mégasporophylles semblables à des feuilles (Fig. 4). La production des cônes est fréquemment plus détectée chez les pieds mâles que chez les pieds femelles car leur élaboration chez ces derniers, est très énergivore (Tang, 1993c).

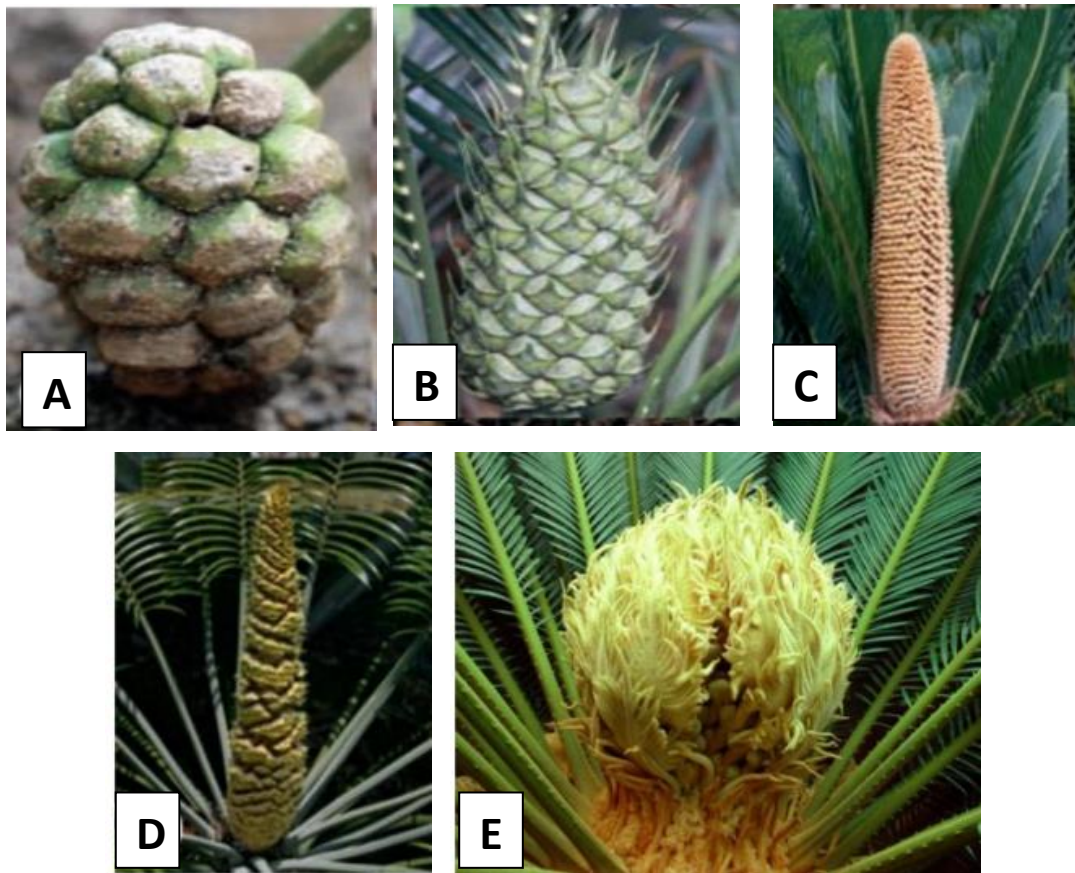


Figure 4. Exemples de cônes représentatifs des graines et du pollen de cycadales. (A) Cône de graines de *Bowenia serrulata*, (B) Cône de graines de *Macrozamia lucida*, (C) Cône de pollen de *Cycas revoluta* (D) Cône pollinique de *Lepidozamia peroffskyana*, E : Cône de graines de *Cycas revoluta*(Calonje, 2011 ; Zhang, 2019).

1.4. Multiplication classique

La propagation *in vivo* des *Cycadales* se fait par les ramifications végétatives et par graines (Demıray et *al.*, 2017).

1.4.1 Multiplication asexuée

L'utilisation de boutures de tiges (bourgeons adventifs) est une multiplication végétative qui assure la multiplication asexuée des cycadales (Fig. 5). Cette pratique est courante chez les horticulteurs qualifiés et expérimentés qui enlèvent les rejets sans endommager la tige du pied d'origine et placent un scellant pour recouvrir les blessures de la plante d'origine et de la bouture détachée (Marler et *al.*, 2020). Le scellant sert de périderme synthétique, il prévient le dessèchement et chasse les agents pathogènes et les insectes herbivores qui pourraient attaquer le tissu parenchymateux de la tige, qui devient exposé (Fisher et *al.*, 2009).



Figure 5. Développement de bourgeons adventifs (rejets) de *Cycas micronesica* (Marler, 2020).

La transplantation des rejets se fait dans des pots, ou dans des caissettes de multiplication contenant un substrat humide. L'arrosage doit être bien maîtrisé afin d'assurer un bon drainage. Les racines et les nouvelles feuilles apparaissent quelques mois après la transplantation (Calonje et *al.*, 2011). Les nouveaux plants doivent être placés en luminosité vive, à une température allant de 21°C à 24°C et bénéficier d'une fertilisation une fois par mois. Le rempotage se fait normalement au printemps suivant (Chapman et Margulis, 1998).

Bien que cette méthode de propagation végétative semble facilement exécutable, l'approvisionnement en rejets représente un facteur limitant pour ce mode de multiplication. En effet, l'approvisionnement ne peut avoir lieu qu'après de longues années de maturité des plantes mères allant jusqu'à 25 ans, avec l'inconvénient du nombre limité de bulbes prélevés par plante mère (Dehgan, 2014).

1.4.1. Multiplication sexuée

Les cycadales sont des plantes dioïques qui se multiplient par graine mais ce mode de reproduction traditionnel est souvent entravé par la rareté des graines, la germination qui demande du temps pour se réaliser et la lenteur de la croissance (Dehgan, 1983a). La germination des graines de *Cycas revoluta* est lente et irrégulière lorsqu'elles sont plantées immédiatement après la récolte, et la plupart des graines perdent leur viabilité en quelques mois (Demiray et *al.*, 2017).

1.4.1.1. Pollinisation et fécondation

La pollinisation de toutes les espèces de cycadales est assurée généralement par le vent ou par des coléoptères curculionidés, des éroytilidés ou des nitidulidaees ou par d'autres types de coléoptères tels des thrips ou des micro-mites (Calonje et *al.*, 2011) (Fig. 6).



Figure 6. Charançons *Rhopalotria mollis* sur cône mâle de *Zamia furfuracea* (Calonje, 2011).

En revanche, les cônes de graines doivent être pollinisés à la main si ces pollinisateurs sont absents. Mélangé à de l'eau ou utilisé sec, le pollen est introduit dans le cône de graines réceptif pour qu'il pollinise le plus grand nombre d'ovules possibles (Fig.7).



Figure 7. Pollinisation des cycadales. (A) Enlèvement de l'apex du cône de *Dioon mejiae*, (B) Pollinisation humide de *Dioon mejiae*, (C) Pollinisation sèche de *Cycas maconochie* (Calonje et *al.*, 2011).

La pollinisation des cycas est meilleure hormis la période des pluies car ces dernières causeraient la dispersion du pollen. Il est fortement recommandé de faire cette pratique manuellement pendant la nuit, car c'est le meilleur moment où les jeunes ovules libèrent à leurs extrémités un liquide collant sous forme de gouttelettes micropylaires jouant le rôle de surfaces stigmatiques (Tang, 1986). Répéter le processus de pollinisation serait souhaitable, étant donné que les jeunes ovules du même cône ne sont pas tous réceptifs au pollen au même moment.

Une fois les grains de pollen arrivés sur les gouttelettes micropylaires, ils sont aspirés dans la chambre pollinique où ils germeront et engendreront des tubes polliniques. Après trois à sept mois de développement, les tubes polliniques libèrent des spermatozoïdes flagellés dans la chambre archégoniale (chambre de fécondation) afin de féconder les jeunes ovules (Norstog et Nicholls, 2020) (Fig. 8).

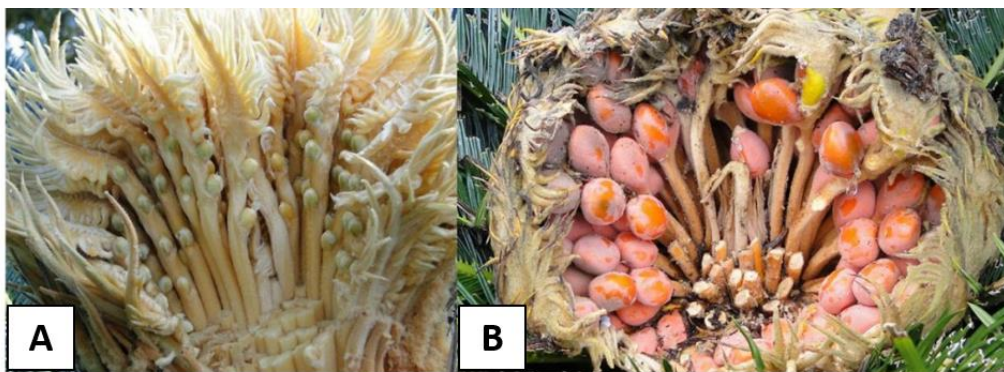


Figure 8. Mégasporophylles et ovules de *Cycas revoluta*. (A) Mégasporophylles pendant la pollinisation montrant la sécrétion des ovules, qui sont de couleur vert clair, (B) Ovules fécondés de couleur rouge orangé (von Aderkas et al., 2022).

1.4.1.2. Stockage des graines

La conservation des graines de la plupart des espèces des cycadales durant plusieurs semaines voire des mois, est nécessaire pour que les embryons continuent de se développer avant d'atteindre le stade de maturation. Mettre en culture les graines immédiatement après leur récolte causerait la mort des embryons toujours immatures, ne pouvant supporter un taux d'humidité et des températures élevés (Calonje et al., 2011). Le stockage des graines peut se faire à froid ou à température ambiante. Dehgan and Schutzman (1989) ont placé les graines de *Cycas revoluta* à différentes températures pendant 6 mois. Ils ont remarqué qu'une température égale à 5°C maintenait la viabilité des graines (seulement 5% des graines ont perdu leur viabilité) et permettait le développement de l'embryon. Alors qu'à 22°C

(température ambiante), ils ont signalé un développement embryonnaire plus rapide qu'à 5°C contre 58% de mortalité des graines. Néanmoins, Vorster (1995) n'a enregistré aucune différence significative dans la germination entre les graines de *Cycas revoluta* conservées à température ambiante et celles placées à froid. Witte (1977) a noté une amélioration de la germination de *Zamia floridana* après 12 mois de conservation à 5°C.

Il est conseillé de conserver les semences dans un sac filet tressé en nylon pour assurer un bon équilibre d'humidité. Si les graines sont conservées dans un environnement trop humide, elles risquent de prendre du volume et rompre la couche externe (sclérotesta), mettant en péril l'embryon face à une attaque fongique. Inversement, si les graines sont déjà sèches, elles se dessècheront davantage pendant leur conservation. Grobbelaar (2002) propose de tremper dans l'eau les graines durant 48 heures une fois par mois, alors que Broome (2001) propose de le faire pendant quelques heures toutes les deux semaines, afin de garder une humidité adéquate dans les graines de cycas en conservation. Un stockage approprié des semences s'avère crucial pour optimiser la germination du cycas.

Les graines ont besoin d'un certain taux d'humidité et une température convenable pour continuer à se développer correctement après leur collecte. Dans le cas échéant, les graines deviennent extrêmement sèches et l'embryon pourrait mourir (Broome, 2004; Calonje et al., 2011; Zarchini et al., 2011).

La durée de conservation des graines des cycadales varie selon l'espèce (Tab. 3) (Calonje et al., 2011).

Tableau 3. Durée de conservation des graines de quelques cycadales (Calonje et al., 2011).

Espèce	Durée de conservation des graines (mois)
<i>Bowenia</i>	1 – 3
<i>Ceratozamia</i>	3 – 6
<i>Cycas</i>	4 – 12
<i>Dioon</i>	0 – 2
<i>Encephalartos</i>	6
<i>Lepidozamia</i>	3
<i>Macrozamia</i>	3
<i>Microcycas</i>	0

1.4.1.3. Germination

La germination constitue une étape capitale dans la naissance d'une plante. En effet, si la germination ne rencontre pas des conditions optimales, la plante va tout simplement

interrompre son cycle de vie. Ce processus est influencé par de nombreux signaux, à la fois endogènes et exogènes, tels que l'équilibre hormonal et le taux d'humidité (Penfield, 2017).

1.4.1.3.1. Définition

La germination est une phase physiologique qui correspond au passage de la phase de dormance de la graine sèche à la phase de croissance et de développement de la plantule. Ce processus démarre avec l'absorption de l'eau par la graine. L'hydratation de la graine réactive le métabolisme de l'embryon (absorption de l'eau, imbibition, respiration et activité enzymatique), jusqu'à ce qu'il évolue en une jeune plante autotrophe (Heller, 1990).

D'après Maransari et Smith (2014), la germination correspond à un processus pendant lequel l'embryon subit des changements morphologiques et physiologiques. L'imbibition de la graine entraîne l'hydratation du protoplasme permettant à la teneur en H₂O d'atteindre 50 – 60% du poids frais. Alors que pour Copland et Mc Donald (2001), la germination est le développement de l'embryon indiquant la capacité à produire sous des conditions favorables, une nouvelle plantule.

1.4.1.3.2. Conditions externes de la germination

La germination n'est induite que lorsque les conditions ambiantes sont favorables pour garantir le développement de l'embryon.

i. Eau

L'eau représente un facteur limitant de la germination. Présente en petites quantités et à l'état liquide, elle hydrate la graine sèche et déclenche la germination alors qu'en excès, elle causerait l'asphyxie de l'embryon (Lafon et *al.*, 1985). L'eau permet la reprise des activités métaboliques dans la graine.

ii. Température

La température peut influencer la germination d'une manière directe et indirecte. Elle agit directement en augmentant la vitesse des réactions biochimiques. Ainsi, il suffit d'une simple élévation de quelques degrés pour déclencher la germination des graines. La température peut également agir indirectement à travers son effet sur la solubilité de l'oxygène au niveau de l'embryon (Mazliak et *al.*, 1982).

iii. Lumière

La lumière agit différemment sur les espèces. Elle accélère la germination des graines à photosensibilité positive et réprime celle des graines à photosensibilité négative (Anzala, 2006). Les espèces indifférentes à la photosensibilité se font rares (Heller, 1990).

iv. Oxygène

Pour la plupart des espèces, l'induction de la germination ne nécessite pas un niveau élevé d'oxygène, néanmoins il reste un élément essentiel à la respiration et donc au processus de la germination (Bewley et Black, 2013). L'oxygène est contrôlé par les enveloppes qui constituent une barrière et garantissent également son stockage sous forme de réserve (Meyer et Allen, 2004).

1.4.1.3.3. Dormance des graines

Chez de nombreuses plantes, la germination des graines est souvent précédée par une période dite de repos, marquée par l'inhibition du processus de germination par divers mécanismes. Ce phénomène est appelé dormance, stade crucial dans le cycle de vie des plantes. Il peut être défini comme étant une phase transitoire marquée par l'incapacité des graines à germer même en présence de conditions favorables. Cette inhibition est un caractère inné qui est déterminé par des facteurs environnementaux et génétiques durant l'établissement de la graine. La dormance peut être occasionnée par la présence d'inhibiteurs et de protéines sensibles à la lumière, à la résistance mécanique des téguments et à l'imperméabilité des enveloppes à l'eau ou à l'oxygène. Cet état physiologique diffère de la quiescence, lié au manque d'eau et d'oxygène bloquant ainsi la germination de la graine. La fin de cette vie latente de la graine, est communément appelée levée de dormance (N'Dri *et al.*, 2011) (Fig. 9).

Deux types de dormance peuvent être distingués ; une dormance primaire et une dormance secondaire. La dormance primaire s'établit durant la formation des graines, et persiste à la récolte. Cet état de repos profond survient sous l'effet des facteurs internes tels que la présence de tégument dur ou la maturité de l'embryon. La dormance secondaire ou induite se produit, quant à elle, après la récolte pendant le stockage des semences sous l'influence de divers facteurs externes (température, oxygène, lumière) défavorables à la conservation. Elle se déclenche systématiquement après la levée de la dormance primaire quand les conditions ne sont pas favorables pour la germination (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006).

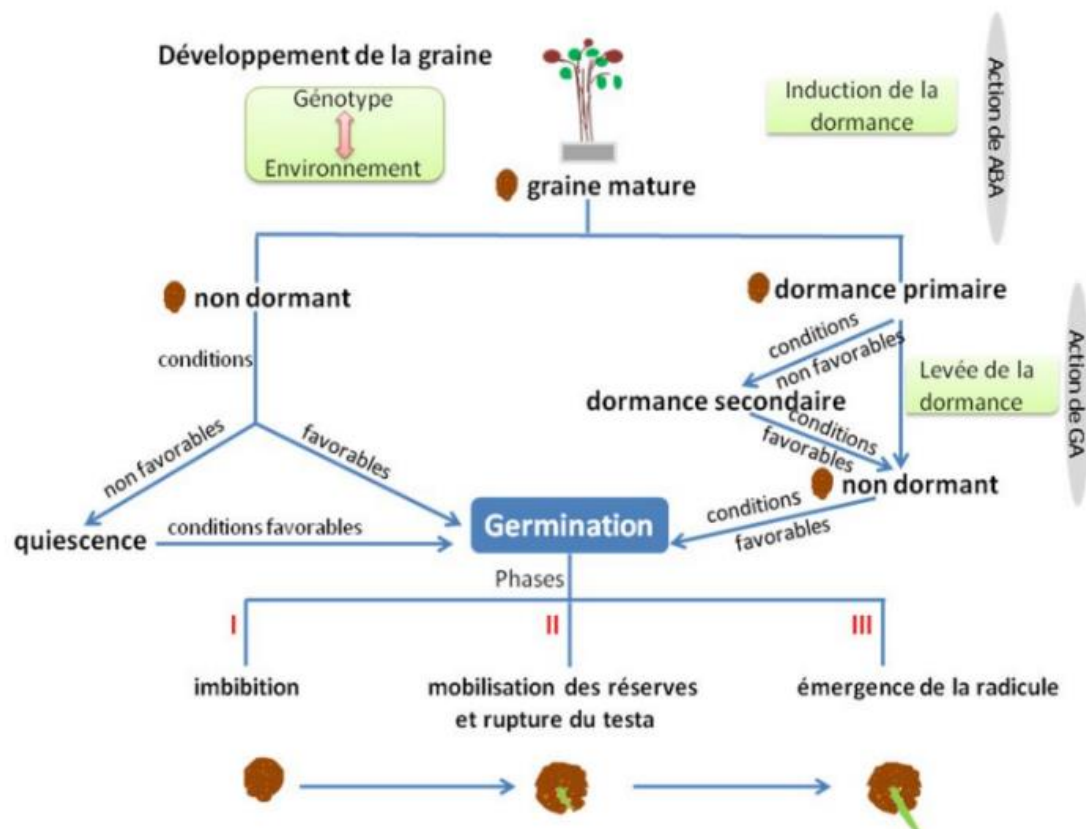


Figure 9. Impact des facteurs environnementaux sur la dormance et la germination de la graine (N'Dri et al., 2011).

1.4.1.3.4. *Physiologie de la germination*

Au cours de la germination, l'embryon croît et se développe dans le but d'atteindre l'autotrophie. De ce fait, des activités métaboliques se déclenchent pour permettre à l'embryon de profiter des réserves de la graine.

i. *Alpha-amylase*

L'alpha- amylase (α -amylase) est une enzyme pouvant avoir trois origines : végétale, animale et microbienne. Elle joue un rôle prédominant dans le métabolisme des glucides (Sivaramakrishnan et al., 2006). On la rencontre dans les graines, les fruits charnus et dans les tubercules comme la pomme de terre.

L' α -amylase est une protéine globulaire appartenant à la famille des glycosides hydrolases. Elle hydrolyse l'amidon stocké dans l'embryon en sucres métabolisables. Ces réserves glucidiques fourniront l'énergie nécessaire au développement du jeune embryon en cours de germination pour lui permettre d'atteindre l'autotrophie. En conséquence, si une graine est coupée en deux dans le sens de la largeur, seule la moitié contenant l'embryon produirait des

sucres réduits à partir de l'amidon ; l'embryon est alors indispensable à la synthèse d' α -amylase (Haq *et al.*, 2023). L' α -amylase coupe les liaisons α (1-4) glycosidiques de l'amylose et de l'amylopectine pour dégrader l'amidon et le réduire en glucose (substrat de la respiration), maltose et dextrines (Charles *et al.*, 2004).

Il a été démontré que les gibbérellines synthétisées dans l'embryon induisent l'expression des enzymes hydrolytiques, amylase et autres enzymes responsables de la dégradation des glucides utilisés par la suite dans le développement de l'embryon (Hopkins, 2003). Si par exemple on place des moitiés de grains d'orge dans un milieu contenant l'acide gibbérellique (GA), on remarque, après un certain temps, une production accrue de l' α -amylase (Heller, 1990). Des études ont montré que la vitesse de synthèse de l' α -amylase était en étroite corrélation avec la vitesse d'accumulation de son ARNm, en réponse à un traitement par la gibbérelline. Ces études ont souligné que l'action initiale des GAs, au cours de la germination des graines, est de réguler la transcription des gènes impliqués dans la synthèse de l' α -amylase (Hopkins, 2003).

ii. Balance hormonale

La levée de dormance primaire ou secondaire est régulée par divers processus, en particulier les interactions entre les conditions environnementales et deux principales phytohormones : l'acide abscissique (ABA) et les gibbérellines, l'acide gibbérellique (GA) entre autres (Fig. 10).

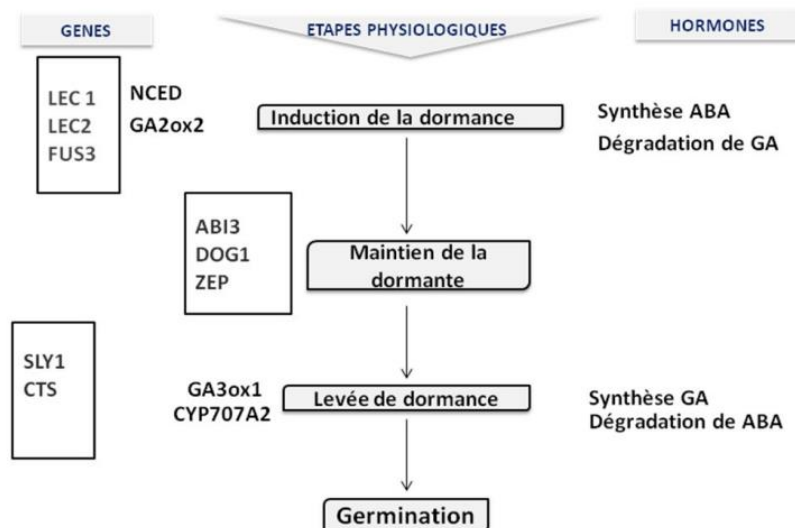


Figure 10. Rôle de l'acide abscissique et des gibbérellines dans la régulation de la dormance et la germination (N'Dri *et al.*, 2011).

L'ABA est une phytohormone qui intervient dans la régulation de plusieurs processus physiologiques chez les végétaux, y compris la germination, le contrôle de l'ouverture des stomates, l'initiation des racines secondaires, la croissance foliaire ou encore l'abscission des fruits. Son rôle dans la réponse des plantes aux contraintes environnementales a été largement identifié. Elle facilite également l'induction et le maintien de la dormance pendant la maturation de l'embryon et réprime la germination en bloquant le développement cellulaire (Tardieu et Tuberosa, 2010).

Quant aux gibbérellines, elles interviennent dans divers processus vitaux, en particulier dans le développement de la graine, la floraison, l'élongation des organes, le développement du fruit et la régulation de l'expression génique dans les tissus de réserve des céréales (aleurone) (Santner et *al.*, 2009). Elles jouent un rôle majeur dans la levée de dormance et la mobilisation des réserves de stockage (amidon) nécessaires à la germination. Ce groupe d'hormones active la synthèse des enzymes hydrolytiques qui fragilisent les tissus barrières tels que l'endosperme ou les téguments (Dhoran et Gudadhe, 2012) et a un effet antagoniste à l'ABA présent dans les graines dormantes (Almodovar et *al.*, 2010; Zarchini et *al.*, 2011; Pipinis et *al.*, 2015).

Le nitrate (NO_3^-) peut lever la dormance primaire et induire la germination des semences (Sanz-Luque et *al.*, 2015) (Fig. 11). Le NO_3^- agit en tant que source d'azote et peut jouer le rôle de molécule signal capable de neutraliser par nitrosation les protéines de la signalisation dépendante de l'ABA comme ABI5 (ABA insensitive 5) (Albertos et *al.*, 2015) et d'attiser les protéines de synthèse du GA_3 telles que GA_3OX (Pearce et *al.*, 2015). Ainsi, Les gibbérellines néo-synthétisées vont stimuler la germination des graines à travers l'activation de la transcription des gènes responsables de l'initiation de la germination et en réprimant l'activité de l'ABA (Miransari et Smith, 2014).

En l'occurrence, l'ABA et la GA génèrent une balance hormonale basée sur des corrélations entre leurs niveaux d'accumulation, pendant la dormance et la germination. Le ratio ABA/GA est déterminant : la germination est déclenchée par un faible ratio tandis que la maturation requiert un ratio élevé. Cet équilibre est régulé par les signaux environnementaux qui apportent des modifications dans l'expression des enzymes cataboliques et biosynthétiques (Finkelstein, 2008).

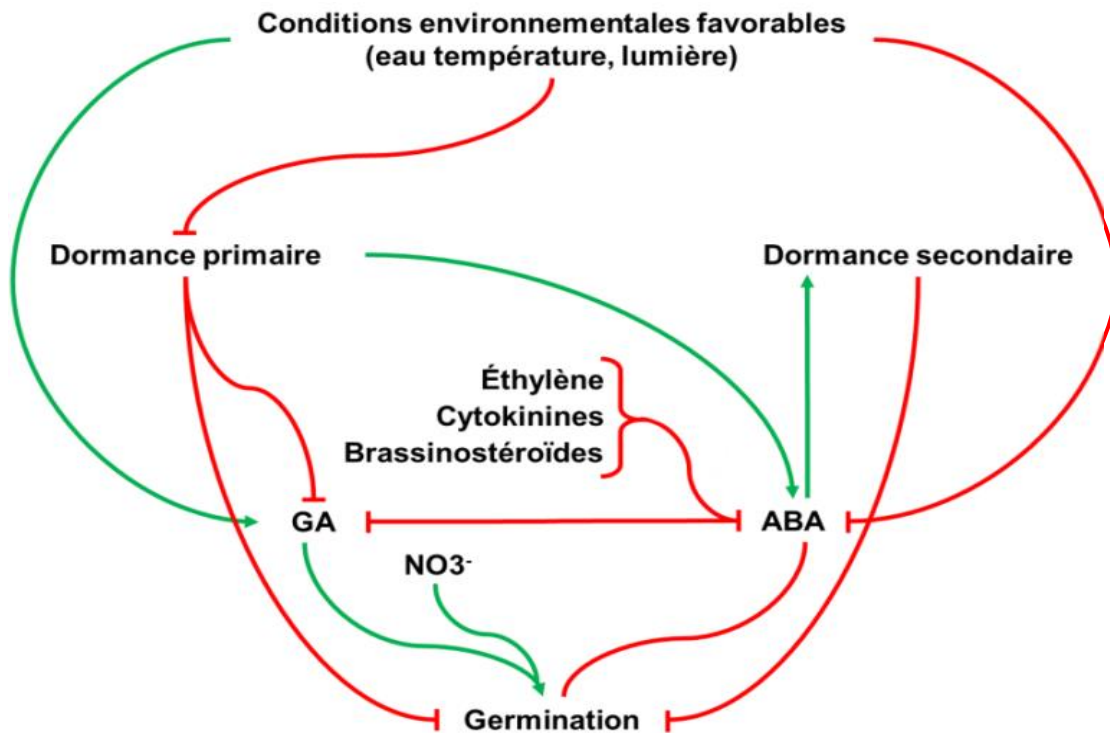


Figure 11. Schéma simplifié de la régulation de la germination (contrôle positif en vert, contrôle négatif en rouge) (Shu et *al.*, 2016).

Divers traitements abrasifs variant selon l'espèce et le type de la dormance, sont recommandés pour lever la dormance avant le semis. La stratification chaude (estivation) ou froide (vernalisation), la scarification (chimique, physique ou mécanique) et l'abrasion des téguments sont des procédés proposés par plusieurs auteurs (Frett, 1987; Muhammad et Amusa, 2003; Sautu et *al.*, 2006; Rouhi et *al.*, 2010; Azad et *al.*, 2013).

La germination des cycadales n'est pas immédiate. Les graines sont confrontées au phénomène de dormance qui dure plusieurs jours voire des mois (Zarchini et *al.*, 2011). Il s'agit d'une dormance primaire déterminée par les propriétés du tégument qui entoure la semence (Frett, 1987; Zarchini et *al.*, 2011; Ullah et *al.*, 2020) (Fig. 12). La sclerotesta, couche osseuse et épaisse, empêche l'infiltration de l'eau dans la graine (Dehgan et Schutzman, 1989; Worcester, 1995). La présence de cet obstacle mécanique crée une pression osmotique négative et un déséquilibre dans les échanges gazeux au niveau de la graine (Jiang et Zeng, 1995). Plusieurs traitements ont été expérimentés pour améliorer la germination.

Des études ont rapporté que les graines des cycadales sont très réactives à leur immersion dans le nitrate de potassium (KNO₃), l'acide gibbérellique (GA₃) ou l'acide sulfurique (H₂SO₄) (Dehgan et Schutzman, 1989). La durée du traitement pré-germinatif varie selon

l'espèce (Broome, 2004). Ainsi, le KNO_3 permet de réduire le temps de germination car le nitrate a un effet stimulant qui pourrait provoquer la rupture de la dormance (Hilhorst, 1990), il facilite également l'absorption de l'oxygène (Hilton et Slinger, 1986) et agit aussi comme cofacteur du phytochrome (Mavi et *al.*, 2006).

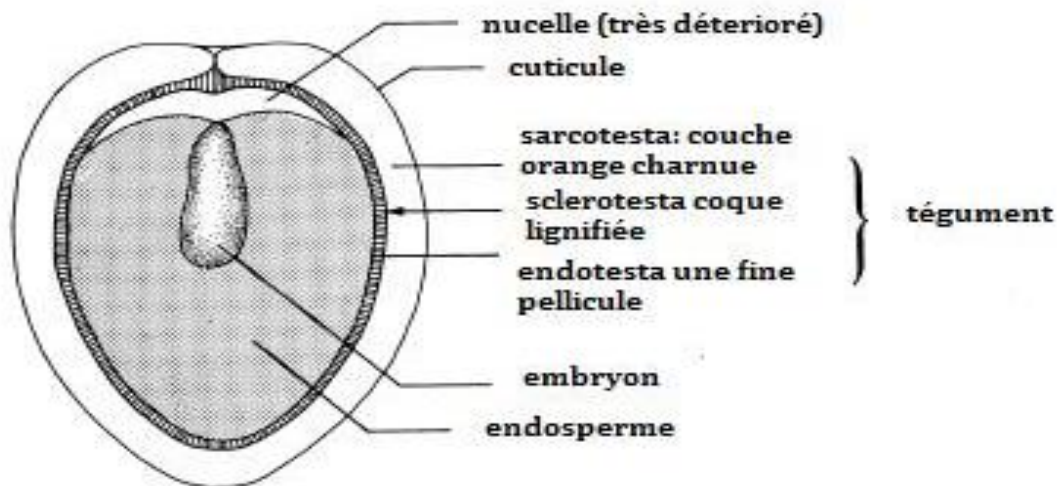


Figure 12. Schéma d'une coupe longitudinale d'une graine mûre de Cycas (Read et Solt, 1986).

L'application de l'acide sulfurique sur les graines donne également des résultats prometteurs. Chez les cycadales, le mode de ce traitement varie selon l'espèce. Par exemple *Zamia floridana* (Zamiacée) nécessite un trempage d'une heure dans H_2SO_4 , suivi d'une immersion dans la GA_3 durant 48 heures. A l'opposé, *Zamia furfuracea* nécessite seulement 20 à 25 minutes dans H_2SO_4 suivi d'une durée de 24 heures dans GA_3 . Ces prétraitements sont aussi bien bénéfiques pour *Cycas revoluta* que pour *Cycas cirunalis*, cependant les graines risquent d'être blessées (Dehgan et Schutzman, 1989).

Par ailleurs, la chaleur peut avoir un effet bénéfique sur la levée de la dormance (Stokes, 1965; Chmielarz, 2009). La germination du cycas est améliorée lorsque les graines séjournent dans de l'eau chaude à $34^\circ C$ pour une durée déterminée de 48 heures (Smith, 1978; Dehgan et Schutzman, 1989).

Un stockage approprié des semences s'avère intéressant pour optimiser la germination du cycas. Les graines requièrent un certain taux d'humidité et une température convenable pour continuer à se développer correctement après la récolte. Dans le cas échéant, les graines deviennent extrêmement sèches et l'embryon pourrait mourir (Broome, 2004; Calonje et *al.*, 2011; Zarchini et *al.*, 2011).

iii. Maturation de l'embryon

L'embryon des cycadales nécessite une période de croissance et de développement qui varie selon l'espèce (Dehgan et Schutzman, 1989). Chez les espèces *Cycas rumphii* et *Cycas revoluta*, l'embryon devient apte à la germination 6 mois après la chute des graines (De Silva et Tambiah, 1952; Dehgan et Schutzman, 1989). Toutefois, d'autres représentants des cycadales comme les espèces *Zamia loddigesi* et *Zamia fischeri* germent facilement, dès la dissémination des graines. De même, Grobbelaar (1990) a remarqué que les graines de l'espèce *Encephalartos manikensis* (Zamiacée) pouvaient germer peu de temps après leur chute. Wynston et ses collaborateurs se sont intéressés, en 2013, à l'espèce *Encephalartos natalencis*. Ils ont constaté qu'au moment de la dissémination des graines, l'embryon présente une structure rudimentaire suspendue à un suspenseur long et enroulé (Fig. 13 a). D'après Beers (1997); Schwartz et al., (1997) et Wredle et al., (2001), le suspenseur peut fournir à l'embryon les éléments nutritifs et les hormones nécessaires à sa croissance. Le suspenseur reste attaché à l'embryon jusqu'à l'âge de 6 mois, stade après lequel il devient ratatiné et déshydraté (Fig. 13 b-d).

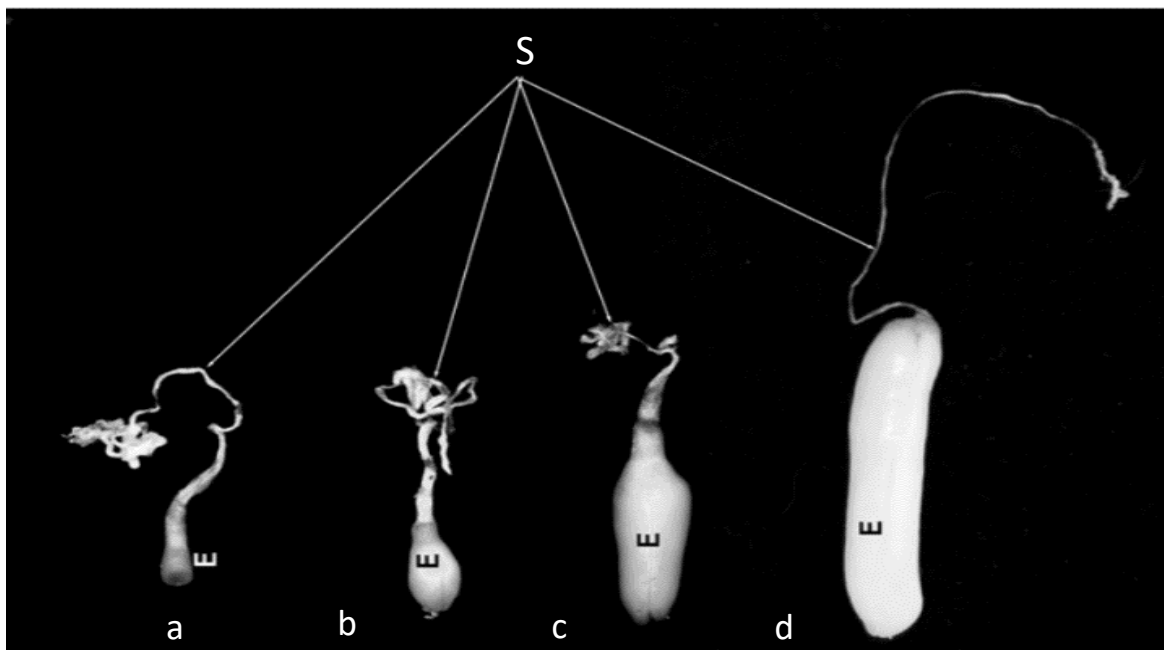


Figure 13. Différents stades de développement de l'embryon chez *Encephalartos natalencis*. (a) apparence externe de l'embryon (E) attaché à un long suspenseur (S) au moment de la dissémination de la graine, (b) apparence de l'embryon après 2 mois, (c) embryon au stade torpille toujours attaché au suspenseur, (d) embryon mature bien développé attaché à un suspenseur en phase de dégénérescence (suspenseur desséché et rabougri) (Woodenberg et al., 2009).

La germination immédiate des graines de cette espèce après leur chute s'avère difficile voire impossible. L'examen histologique a révélé que les embryons à ce stade (juste après la chute des graines) montrent l'absence de différenciation des cellules formant l'embryon. Ce dernier étant uniquement composé de cellules méristématiques (indifférenciées) à noyaux proéminents et délimitées par des parois minces (Fig. 14 a-b).

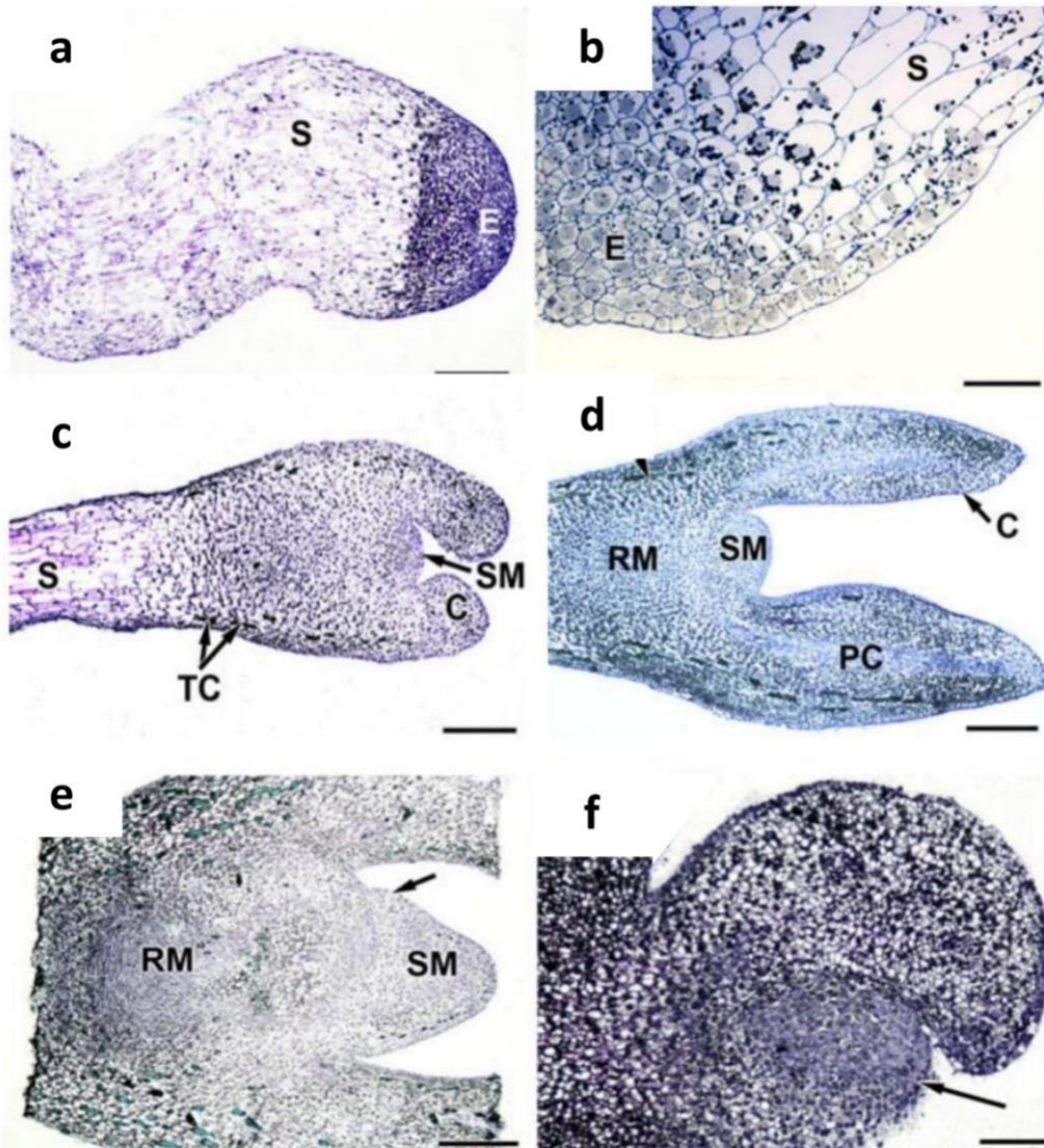


Figure 14. Histologie et ultrastructure de l'embryon de l'*Encephalartos natalensis* au cours des différents stades de développement. (a) et (b) observations microscopiques de l'embryon et du suspenseur juste après la dissémination des graines après coloration au bleu de toluidine. (c), (d) et (e) coupes longitudinales de l'embryon après 2 mois, 4 mois et 6 mois de développement, respectivement, (f) coupe transversale montrant le méristème caulinaire bien développé observé chez l'embryon âgé de 6 mois (Woodenberg et al., 2009).

Le suivi du développement de l'embryon montre une différenciation morphologique, histologique et cellulaire avec le temps. Pour cette espèce, on assiste à la formation du méristème caulinaire après 2 mois et du méristème racinaire après 4 mois de la dissémination des graines (Fig. 14 c, d). Deux protubérances cotylédonaire se développent résultant de la division active de deux groupes de cellules, se trouvant de part et d'autre du méristème caulinaire. Ce constat a été également signalé par Saxton en 1910. Les ébauches foliaires continuent à se développer jusqu'à atteindre une taille maximale, 6 mois après la dissémination des graines. Ce stade est aussi marqué par l'apparition des primordiums foliaires, reflétant ainsi un stade mature de l'embryon (Fig. 14 e, f).

1.5. Croissance des Cycadales

Les cycadales sont des plantes réputées pour leur longévité et leur croissance lente. Elles connaissent trois formes de croissance du point de vue taux de croissance et durée de vie : pieds présentant des tiges souterraines petites voire moyennes, ou des tiges aériennes multiples (bourgeons ou rejets qui prennent naissance à la base de la tige principale), ou une seule tige montrant plusieurs rejets tout au long de la tige (Fig. 15).

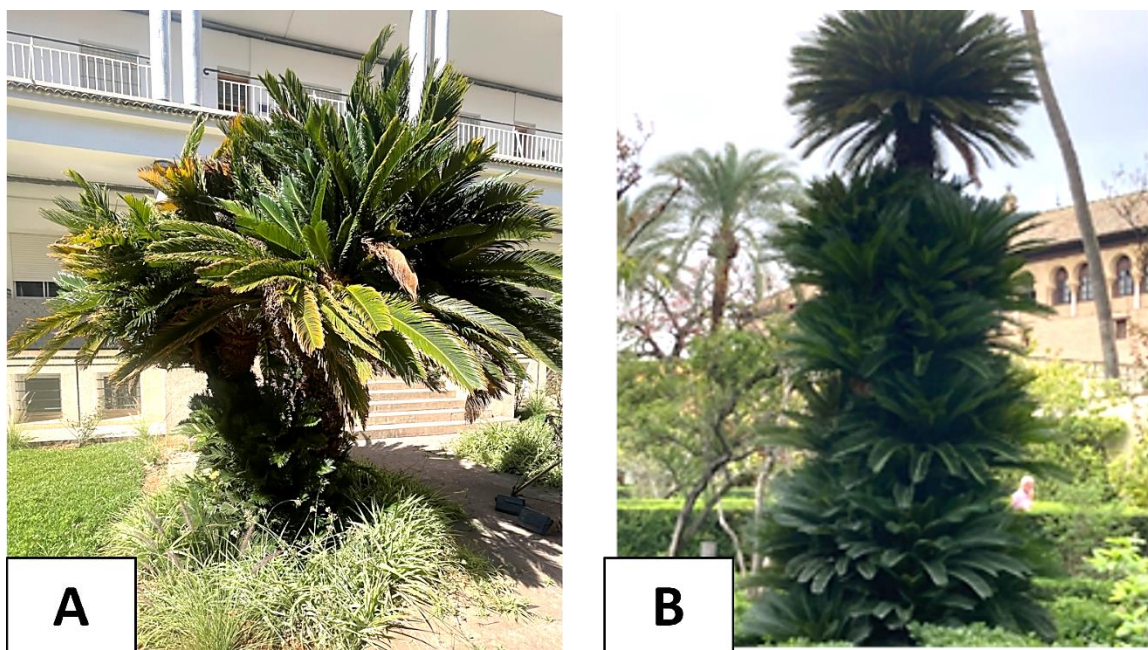


Figure 15. Croissance de *Cycas revoluta*. A : pieds à deux tiges. B : pieds de grande taille avec plusieurs rejets sur la tige principale (Benjelloun, 2024).

Les espèces à tiges multiples peuvent vivre très longtemps et développer de nouveaux bourgeons qui prendront la place des vieilles tiges. Des études faites sur le terrain (CITES, 2003) ont avancé que les espèces ayant un gros diamètre ou qui produisent des rejets avaient une durée de vie plus importante que les espèces munies d'une tige unique et petite. La longévité des plantes de cycadales est difficile à mesurer, elle varie selon l'espèce. Pour les grandes espèces comme *Dioon edule* (Zamiaceae), la longévité moyenne est de 900 ans (Vovides, 1990) alors qu'elle est estimée à 125 ans pour les espèces de sous-bois qui sont de petite taille telles que l'*Encephalartos villosus* (Donaldson, 1995). Par ailleurs, il est crucial de signaler que les plantes de grande taille ne sont pas essentiellement âgées. Vogel et al., (1995) ont considéré que des représentants de l'*Encephalartos transvenosus* de 3 mètres de haut, n'étaient vieux que de 150 ans.

En raison de leur nature robuste, les cycas sont des plantes faciles à entretenir et s'adaptent à diverses situations. Ils se développent dans presque tous les milieux et n'exigent aucun entretien précis. La plupart des cycas sont rustiques aux basses températures (-9°C) et peuvent s'adapter à des positions ensoleillées sous des climats chauds tropicaux et tempérés. Les températures élevées endommagent le feuillage qui prend une couleur jaune ou marronne.

Le cycas pousse à l'ombre en plein air et tolère une gamme étendue de sols bien drainés et répondant à ses besoins nutritifs. L'apport en eau dépend du mode de culture, dans le sol ou dans des conteneurs. La mise en pot exige un arrosage régulier afin de conserver une humidité convenable, alors qu'en pleine terre, l'apport en eau se fait au moins une fois par semaine (Hill et al., 2004).

Pour favoriser la croissance des *Cycas*, permettre une meilleure maintenance et protection et pour stimuler la formation de nouvelles feuilles, une fertilisation appliquée régulièrement pendant la période de croissance du mois de mars à août serait utile. L'utilisation d'engrais organiques à base de fumiers d'animaux est bénéfique pour tous les Cycadales (Whitelock, 2002; Hill et al., 2004). Ils agissent en tant qu'engrais à libération lente, fournissant des nutriments en petites quantités sur une longue période de temps (Saji, 2021). Les amendements organiques tels que les fumiers et les compostes permettent de maintenir des conditions optimales de fertilité du sol visant les propriétés physiques de ce dernier en réduisant la densité apparente, optimisant la capacité de rétention d'eau du sol et augmentant les taux d'infiltration (Werner, 1997; Gopinath et al., 2008).

1.6. Insectes et ravageurs

Etant robustes, les cycadales sont rarement attaquées par les agents phytopathogènes. Le ravageur *Aulacaspis yasumatsui*, insecte connu sous le nom de cochenille *Cyca dulacaspis*, a été signalé pour la première fois en 1972, chez un *Cycas* sp. (Takaji et al., 1977). Il se propage facilement par le vent et cause de sérieux dommages aux feuilles, ce qui pourrait entraîner la perte des cycas (Fig. 16). Une ablation des feuilles infectées suivie d'une application périodique (1 à 2 semaines d'intervalles) d'insecticides systémiques limite les dégâts de ce ravageur.



Figure 16. Feuille de *Microcycas calocoma* attaquée par l'*Aulacaspis yasumatsui* (Goel et Khuraijam, 2015).

1.7. Utilisation des cycadales

Les valeurs médicinales et nutritives et traditionnelles des cycadales sont connues depuis longtemps par les habitants des régions tropicales et subtropicales. Certaines espèces appartenant au genre *Cycas* suscitent l'intérêt des habitants des régions tropicales et subtropicales. Ces plantes ont un potentiel ethnobotanique, pharmacologique et phytochimique. Les graines de *Cycas sphaerica* et les cônes mâles de *Cycas beddomei*, dans certaines régions en Inde, sont largement vendus sur les marchés locaux (Figure 17) et fortement utilisés par la population comme nourriture et comme des toniques rajeunissants (Singh et al., 2011).



Figure 17. Cônes mâles du *Cycas* vendus sur les marchés en Inde (Goel et Khuraijam, 2015).

Aux îles Comores, les fruits de *Cycas thouarsii* sont comestibles. Une fois séchés et broyés, ils donnent une farine utilisée pour produire des bouillies très recherchées pendant le mois sacré de Ramadan car elles sont très énergétiques et de ce fait, il est conseillé traditionnellement de la consommer pendant la rupture du jeûne.

Cycas revoluta étant l'espèce la plus connue des cycadales, est très appréciée pour ses vertus médicinales et nutritives. Les différentes parties de la plante servent de nourriture et entrent dans la préparation de liqueurs, et sont également utilisées pour traiter plusieurs maladies telles que les hémorroïdes, les mictions douloureuses, les ballonnements intestinaux et les vomissements. En plus, un grand nombre de produits chimiques tels que les lipides, les flavonoïdes, la cycasine, la lectine, les peptides et les bi-flavonoïdes sont présents dans cette plante, ce qui lui confère plusieurs activités pharmacologiques telles qu'antioxydant, anticancéreuse, antifongique, antibactérienne et antimicrobienne (Deora et *al.*, 2020).

Les feuilles et les graines des cycas ont également un usage artisanal. Les feuilles peuvent être tressées pour fabriquer des chapeaux portés par les paysans. La coque asséchée des graines peut servir de combustible pour cuisiner.

1.8. Microflore des cycadales

La rhizosphère, région du sol influencée directement ou indirectement par les racines, est caractérisée par une biodiversité biologique importante. La plante libérant des sucres, des aminoacides, des iso-flavonoïdes, des acides organiques, des régulateurs de croissance et des enzymes procure à cette partie du sol, les conditions propices pour le développement de nématodes, de vers de terre, de protozoaires, de champignons et surtout de bactéries dénommées rhizobactéries (Philippot et *al.*, 2013). Parmi ces rhizobactéries, il y'a celles qui sont nuisibles pour la plante, certaines sont bénéfiques et d'autres n'affectent pas la santé de

la plante (Germida et *al.*, 1998). Ces micro-organismes ont un rôle important dans la vie des plantes Suty (2015) par :

- le maintien de la structure du sol,
- la transformation de la matière organique en éléments nutritifs azotés assimilables par les racines,
- l'entrée en compétition avec des agents pathogènes,
- l'excrétion de substances promotrices de la croissance des plantes. Dans ce cas les bactéries sont des bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria),
- l'établissement de relations symbiotiques bénéfiques pour la plante.

1.8.1. Rhizobactéries promotrices de la croissance (PGPR)

1.8.1.1. Définition

Les PGPR, nommées également rhizobactéries promotrices de la croissance, constituent un groupe particulier des rhizobactéries bénéfiques pour la plante grâce à des mécanismes divers qu'elles possèdent, tels que la fixation d'azote moléculaire (N₂), la solubilisation ou la chélation de différentes substances nutritives minérales, la synthèse de substances promotrices de la croissance comme l'auxine, l'éthylène, la cytokinine ainsi que les vitamines et autres substances. Elles permettent également la destruction ou l'inhibition d'organismes phytopathogènes.

Bien que les PGPR puissent être présentes dans la rhizosphère, une partie de cette population nommée endophytes, peut pénétrer et coloniser les tissus internes des plantes. Au niveau extracellulaire, elles sont localisées en surface ou à proximité des racines (Gray et Smith, 2005). Ces rhizobactéries bénéfiques occupent la rhizosphère en se servant des exsudats racinaires comme substrats nutritifs, ce qui confère à leur association avec le système racinaire de la plante des étendues importantes aussi bien sur la santé de la plante que sur la productivité et la qualité du sol (Davet, 1996).

1.8.1.2. Diversité taxonomique

Le nombre des PGPR identifiées au cours des dernières années a augmenté d'une façon significative. Ces microorganismes, présentant une diversité de genres et d'espèces, appartiennent majoritairement aux trois phylums suivants : les protéobactéries, les actinobactéries et les firmicutes (Fig. 18) (Pérez-Montañó et *al.*, 2014).

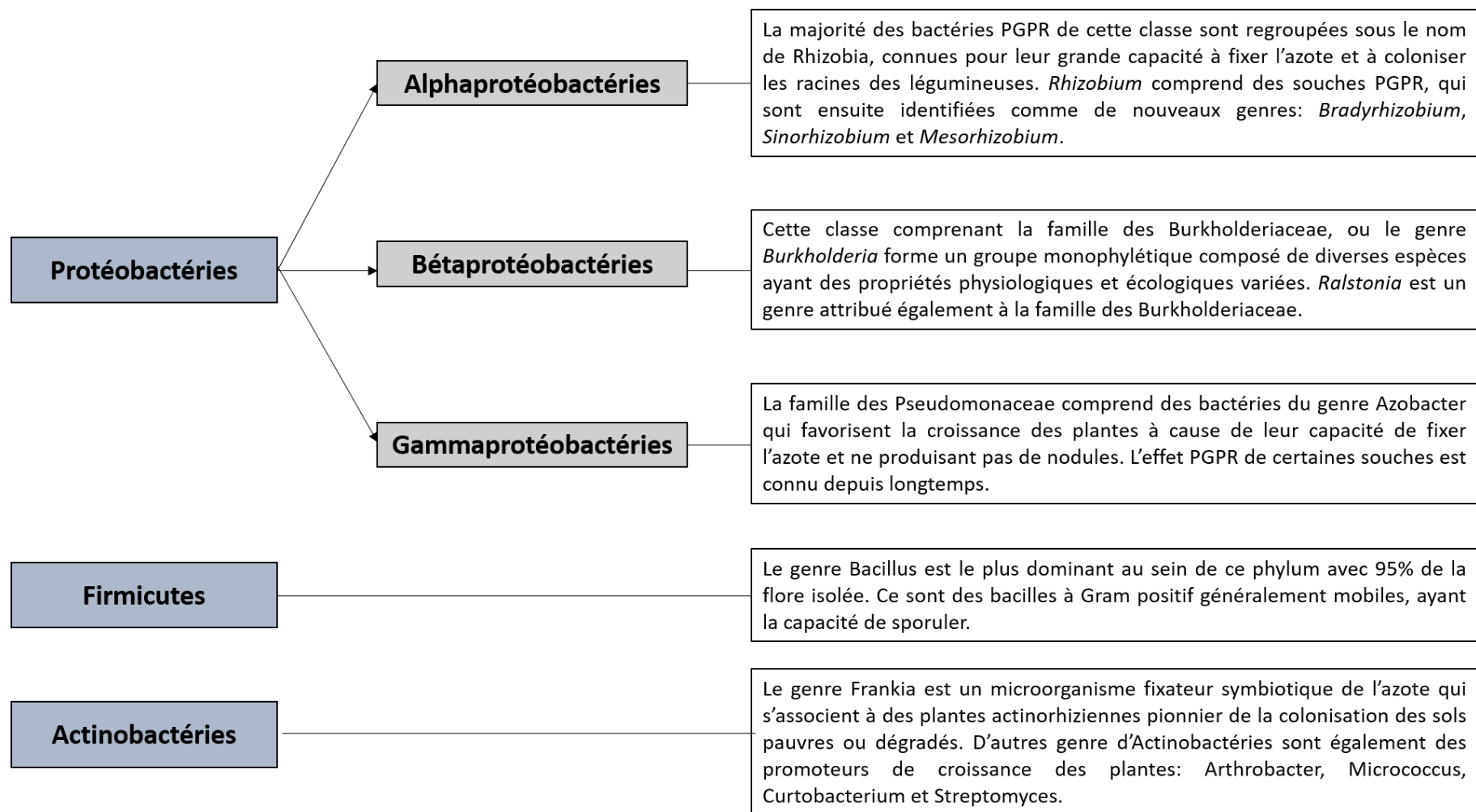


Figure 18. Principaux phylums des PGPR identifiés dans la nature et leurs principales caractéristiques (Pérez-Montaña et al., 2014).

1.8.1.3. Modes d'action des PGPR

Les PGPR peuvent agir directement ou indirectement sur la croissance de la plante grâce à leur influence sur l'acquisition des éléments nutritifs, les taux d'hormones et leur capacité à réduire les impacts négatifs des facteurs abiotiques et biotiques par divers mécanismes (Ahemad et Kibret, 2014) (Fig. 19).

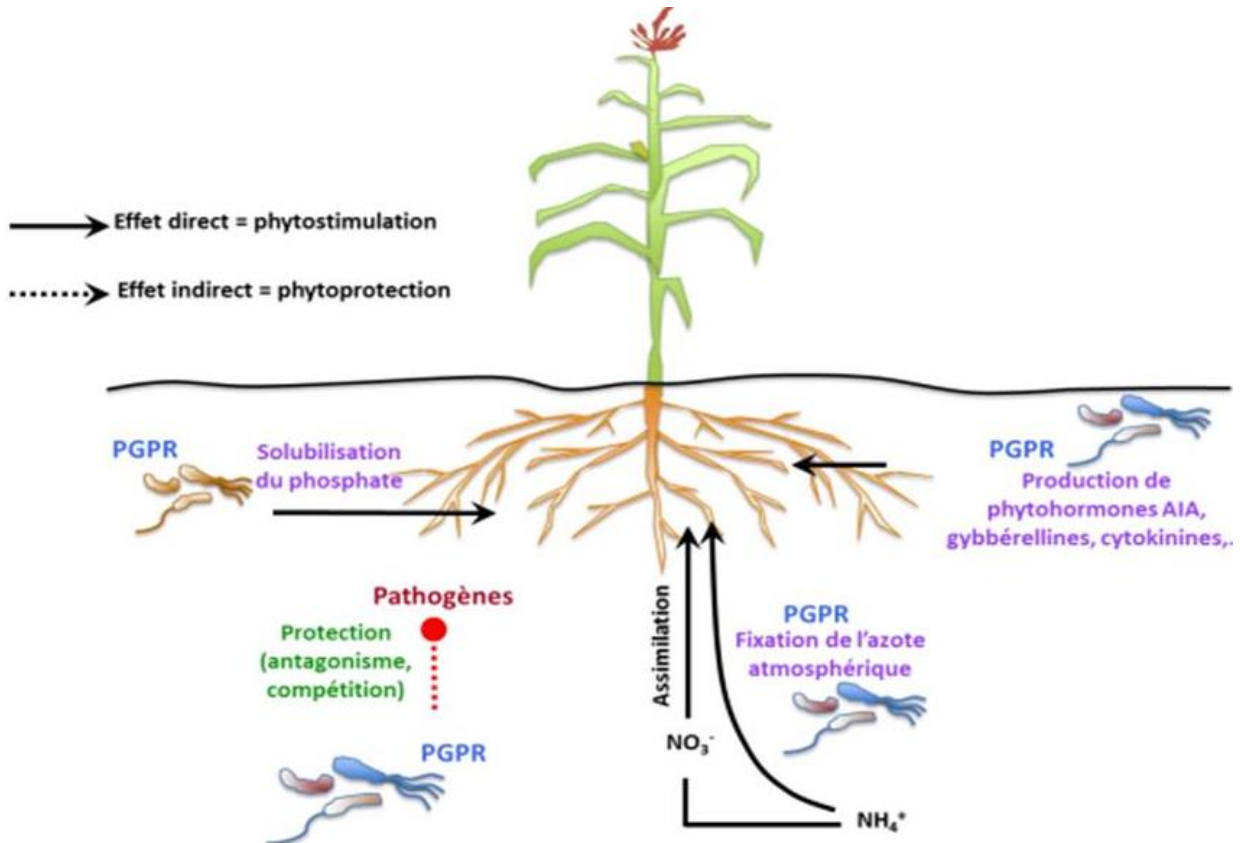


Figure 19. Ensemble des mécanismes impliqués dans l'interaction plante-PGPR dans la rhizosphère (Khan et al., 2010).

1.8.1.3.1. Stimulation de la croissance (mode direct)

La promotion directe de la croissance des plantes se produit lorsque la bactérie facilite l'acquisition des éléments nutritifs essentiels tels que l'azote, le fer et le phosphore ou bien elle module les niveaux des phytohormones de la plante dont les auxines, les gibbérellines, les cytokinines et l'éthylène (Narula et al., 2013).

i. Fixation d'azote

L'azote est un élément indispensable pour toute forme de vie, il fait partie des nutriments vitaux utiles à la croissance, le développement et la productivité des plantes. L'azote constitue 78% de la composition atmosphérique, cependant, sous cette forme il n'est pas assimilable par les plantes (Gupta et *al.*, 2015).

Les PGPR sont parmi les micro-organismes fixateurs d'azote qui utilisent la nitrogénase, enzyme impliquée dans la fixation biologique de l'azote atmosphérique N_2 et sa transformation en ammoniac NH_3 utilisé par la plante selon deux mécanismes : un symbiotique et l'autre non symbiotique. La fixation symbiotique de l'azote est une relation mutualiste entre un organisme fixateur d'azote et la plante. Cet organisme entre dans la racine, puis forme des nodules fixateurs d'azote. Les Rhizobiums par exemple, forment un large groupe de rhizobactéries doté de la capacité d'établir des interactions de type symbiotique avec certaines plantes. Cette relation est marquée par la colonisation et l'établissement de nodules racinaires avec des légumineuses. Dans ces nodules, l'azote est fixé sous forme d'ammoniac pour être biodisponible pour la plante (Ahemad et Kibret, 2014). Les PGPR symbiotiques sont communément représentées par les genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* qui établissent une symbiose avec les légumineuses. Cette relation symbiotique peut se faire également avec des non-légumineuses et des arbustes comme le cas du genre *Frankia* (Gaby et Buckley, 2012).

Par ailleurs, la fixation de l'azote non symbiotique est effectuée par des diazotrophes libres chez les plantes non légumineuses, ces bactéries appartiennent à des genres tels que *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Diazotrophicus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* et des cyanobactéries telles que *Anabaena* et *Nostoc* (Ahemad et Kibret, 2014).

ii. Solubilisation du phosphate

Le phosphore constitue, après l'azote, un élément clé dans la nutrition des plantes. Il participe dans l'ensemble des processus métaboliques majeurs des plantes, y compris la photosynthèse, la respiration, la transduction du signal, le transfert d'énergie et la biosynthèse des macromolécules (Reed et *al.*, 2011). Malgré sa grande importance, les plantes ne peuvent pas utiliser la forme du phosphate présente dans le sol car 95 à 99% de ce phosphate est insoluble et non assimilable (Khan et *al.*, 2011). Comme le cas de l'azote, certaines PGPR solubilisent le phosphate inorganique insoluble présent dans le sol en phosphore organique soluble qui

sera absorbé par les plantes, et ce par deux principaux mécanismes : soit en libérant des acides organiques de faible poids moléculaire comme l'acide cétagluconique et gluconique, laquelle libération se traduit par une acidification du milieu rhizosphérique, ce qui va libérer des ions orthophosphates solubles, facilement assimilés par la plante, soit par l'utilisation de phosphatases qui vont aider à détacher les groupes phosphates de la matière organique (Pandey et Maheshwari, 2007). Les genres *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Beijerinckia*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, et *Rhodococcus* sont parmi les PGPR capables de solubiliser le phosphate inorganique comme le phosphate tricalcique ou dicalcique, et le phosphate de roche en forme assimilable par la plante (Sharma et al., 2003).

iii. Production des sidérophores

Le fer est le 4^{ème} élément le plus abondant dans le globe terrestre. Dans le sol, il est prédominant sous forme d'ion ferrique Fe^{3+} qui est peu soluble et non assimilable aussi bien pour les bactéries que pour les plantes (Liu et al., 2012). Les microorganismes dont les PGPR ont développé des mécanismes sophistiqués pour faciliter l'assimilation du fer par les plantes, comme la production de molécules de faible poids moléculaire (~ 400-1000 daltons). Ces molécules, connues sous le nom sidérophores, ont la capacité de chélater le fer. Ces molécules peuvent être de différents types, on cite les phénolcatécholates, les hydroxamates et les carboxylates. Les PGPR produisent les sidérophores pour piéger le fer par la formation de complexes de Fe^{3+} afin de réduire cette forme insoluble en ions de fer ferreux Fe^{2+} solubles qui seront absorbés par des mécanismes de transport actif qui ne sont activés que lors d'une faible disponibilité de fer (Kundan et al., 2015). Les bactéries produisant les sidérophores lient le complexe fer-sidérophore par un récepteur spécifique situé sur la face externe de leur membrane cellulaire (O'Sullivan et O'Gara, 1991). Parmi ces bactéries productrices de sidérophores isolés de la rhizosphère, il y'a celles qui appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Streptomyces* et *Serratia* (Mehnaz, 2013).

iv. Synthèse des phytohormones

Les phytohormones sont des substances chimiques agissant à faible concentration sur la croissance et le développement des plantes (Gobat et al., 2010). Les PGPR sont capables de produire des hormones telles que les auxines (particulièrement l'acide indole 3-acétique), les gibbérellines et les cytokinines connues pour leur rôle crucial dans le développement et la croissance des végétaux (Etesami et Glick, 2020).

a. Acide indole 3-acétique

L'acide indole 3-acétique (AIA) est l'auxine naturelle la plus répandue chez les plantes (Sharma *et al.*, 2003). Il a été démontré que les rhizobactéries sont capables de synthétiser presque 80% de la quantité d'AIA qui agit conjointement avec l'AIA endogène de la plante, pour assurer la croissance de cette dernière (Zahran, 2001) (Fig. 20).

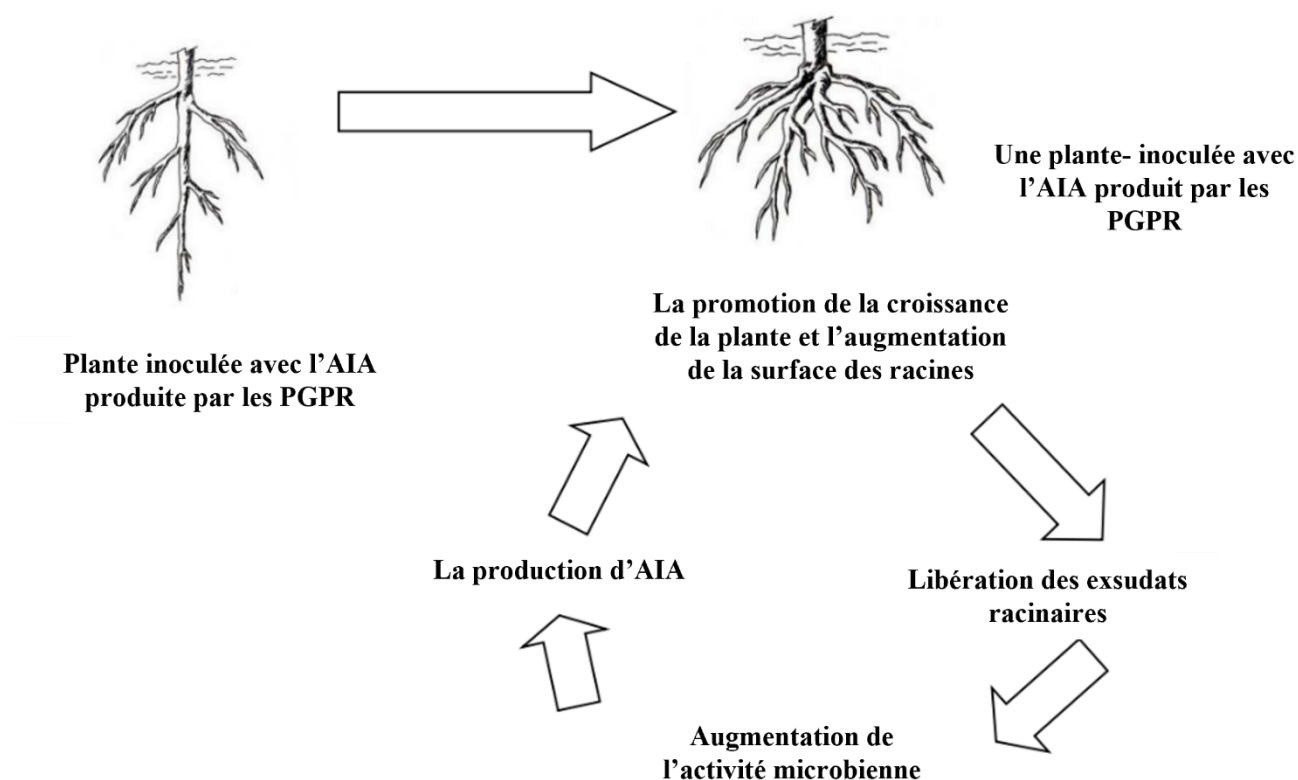


Figure 20. Mode d'action des bactéries productrices de l'AIA (Gamalero *et al.*, 2011).

L'AIA joue le rôle d'une molécule signal et régule ainsi le développement des plantes. Il intervient dans les premiers stades de l'embryogenèse, à travers le contrôle de l'organisation du méristème apical, la formation de la racine principale, l'initiation des racines adventives et latérales et la ramification des parties aériennes de la plante (Khalid *et al.*, 2004). Ces bactéries synthétisent et sécrètent l'AIA à partir du tryptophane, acide aminé souvent présent dans les exsudats racinaires et agit en tant que précurseur de la biosynthèse de l'AIA chez les bactéries (Spaepen et Vanderleyden, 2011). Cette biosynthèse est fréquente chez des bactéries telles que *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter* et *Klebsiella* et favorise la croissance des plantes en stimulant la division, l'expansion et la différenciation cellulaires (Shilev, 2013).

b. Cytokinines

Les cytokinines sont des phytohormones qui dérivent de l'adénine. Elles interviennent dans le contrôle de la division cellulaire en favorisant la croissance et la différenciation des racines, la stimulation de la germination et le retardement du vieillissement des feuilles (Nabors, 2008). Plusieurs PGPR telles qu'*Azotobacter sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodospirillum rubrum*, *Paenibacillus polymyxa* et *Bacillus subtilis* sont connues pour la production de cette hormone (Etesami et Glick, 2020).

c. Gibbérellines

Les gibbérellines sont des hormones de croissance naturellement synthétisées par les végétaux. En plus de leur rôle clé dans la régulation du processus de germination (détaillée précédemment ii) balance hormonale), elles contrôlent l'élongation des tiges et la croissance des feuilles. Elles activent également la croissance des bourgeons, la floraison et le développement des fruits. Les gibbérellines interviennent aussi dans la stimulation de la croissance de la racine à travers la régulation de l'abondance des poils absorbants (Bottini et al., 2004). Les bactéries du genre *Rhizobium* sont parmi celles qui se caractérisent par la présence d'un taux élevé de cette phytohormone au niveau des nodosités (Nabors, 2008).

1.8.1.3.2. Protection contre divers phytopathogènes (mode indirect)

Les PGPR peuvent être utilisées comme agents de bio-contrôle et de lutte contre l'attaque des racines par des micro-organismes pathogènes. Leur action se traduit par différents mécanismes.

a. Antibiose

Ce mécanisme est impliqué dans le contrôle biologique. Il se base sur la production et la libération de métabolites secondaires (antimicrobiens) ayant un rôle dans la suppression ou la réduction de la croissance d'agents phytopathogènes (Fernando et al., 2006). Parmi ces métabolites, les PGPR appartenant surtout aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces* produisent surtout des antibiotiques ayant un large spectre d'activités tel que l'amphicine, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), les phénazines, la pyolutéorine et la pyrrolnitrine (Shameer et Prasad, 2018).

b. Compétition pour l'espace et les nutriments

Ce mécanisme est décrit comme étant un mécanisme biologique employé par les PGPR afin d'éliminer les agents phytopathogènes par l'entrée en compétition sur l'espace, des éléments nutritifs, ou des autres facteurs environnementaux nécessaires pour la croissance des microorganismes. Cette compétition peut concerner deux ou plusieurs microorganismes à la fois (Shameer et Prasad, 2018). Toutefois, les PGPR doivent être présentes sur les racines en nombre suffisant pour pouvoir assurer une compétition pour les éléments nutritifs dans la rhizosphère (Haas et Défago, 2005). A titre d'exemple, les PGPR capables de fixer l'azote et le phosphore vont à la fois favoriser la croissance des plantes et inhiber la croissance des pathogènes (Pal et Gardener, 2006).

c. Résistance systémique induite (ISR)

La résistance systémique induite (Induced Systemic Resistance) désigne la capacité des plantes à faire face aux attaques de pathogènes ou d'insectes à travers l'activation de plusieurs mécanismes. Ces mécanismes peuvent être déclenchés par l'interaction avec certaines rhizobactéries non pathogènes. Ce mécanisme améliore la résistance des plantes contre une éventuelle attaque des agents pathogènes (virus, bactéries et champignons). Cela implique l'interférence de plusieurs composants bactériens tels que les lipopeptides cycliques, lipopolysaccharides (LPS) et les sidérophores (Gupta et *al.*, 2015).

1.8.2. Bactéries associées aux cycadales

Les cycadales sont considérées comme le taxon le plus ancien des plantes à graines. Ces plantes ont conservé des caractéristiques primitives de leurs ancêtres. Ceci est peut-être associé à leur capacité d'établir des relations symbiotiques avec des bactéries endophytes, principalement des cyanobactéries qui se trouvent dans leurs racines coralloïdes (Lobakova et *al.*, 2003). Hormis les cyanobactéries, les bactéries endophytes qu'hébergent ces racines spécialisées sont encore mal étudiées et identifiées (Hardoim et *al.*, 2015). La capacité des cycadales à former une telle relation bénéfique avec ces micro-organismes, leur permet de s'adapter aux sols stériles et aux climats secs (Lobakova et *al.*, 2003).

1.8.2.1. Cyanobactéries

Les cyanobactéries sont des bactéries apparues il y a au moins 3,6 milliards d'années grâce à l'acquisition d'une nouvelle fonction : la photosynthèse. Ces bactéries peuvent vivre dans des environnements divers et difficiles et sont considérées comme le groupe de micro-organismes le plus performant sur terre (Sand-Jensen, 2014).

Le groupe des cycadales avec toutes ses espèces, est considéré comme le seul membre des gymnospermes actuellement capable de former des associations symbiotiques avec les cyanobactéries dans des structures racinaires spécialisées à croissance apogéotropique appelées racines coralloïdes (Fig. 21a). Ces bactéries se regroupent entre le cortex externe et le cortex interne sous l'épiderme de la racine coralloïde prenant la forme d'une bande circulaire verte appelée « anneau cyanobactérien » (Fig. 21b). Cet abri leur sert d'environnement stable loin des prédateurs ce qui leur permet d'assurer leurs survie et préservation (Sandra et *al.*, 2013).

La fixation de l'azote chez *Nostoc*, qui est le genre symbiotique dominant dans les racines coralloïdes des cycadales, se déroule dans des structures appelées hétérocystes, qui se présentent sous forme de chaîne de cellules formant un filament (Fig. 21 c) (Gehring et *al.*, 2010).

Dans cette relation mutuelle entre les cycas et les cyanobactéries, l'activité photosynthétique des cyanobactéries diminue au profit de la fixation de l'azote sous sa forme ammoniacale NH_3 qui va être assimilée par la plante en échange avec les composés carbonés organiques que va fournir cette plante aux cyanobactéries (Suty, 2015). Selon Chang et *al.*, (2019), d'autres bactéries hétérotrophes résident avec des cyanobactéries dans les racines coralloïdes mais en nombre réduit. Ceci est lié à la capacité des cycadales à produire des métabolites secondaires qui inhiberaient la croissance des micro-organismes, mais pas celle des cyanobactéries. Ce phénomène peut être également attribué à la communication concentrée entre l'hôte et la bactérie, probablement par la production de certaines substances, ce qui peut autant jouer un rôle dans la prévention du surpeuplement à l'intérieur des racines coralloïdes par des bactéries autres que les cyanobactéries (Sandra et *al.*, 2013).

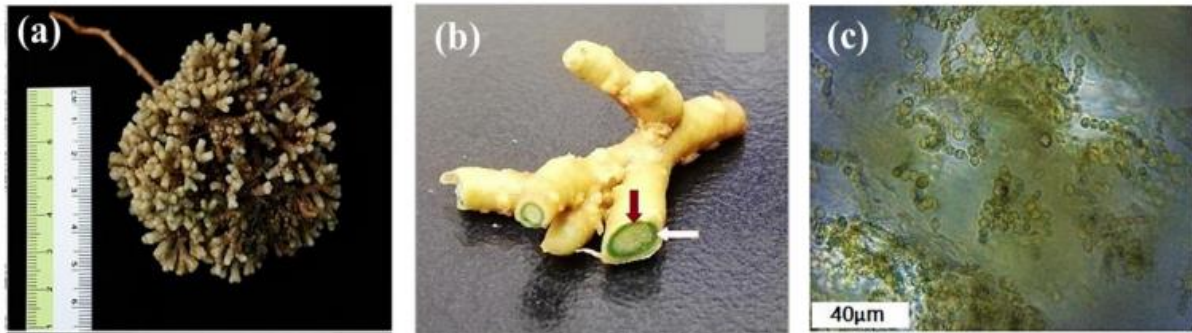


Figure 21. Structure des racines de Cycas. (a) : Racines coralloïdes de *Cycas fairylakea* à ramification dichotomique ; (b) : Coupe transversale d'une racine coralloïde avec une zone verte distincte : anneau cyanobactérien, (c) : Image microscopique de cyanobactéries filamenteuses (Chang et al., 2019).

1.8.2.2. Autres bactéries endophytes

Les racines coralloïdes des cycadales abritent une diversité de cyanobactéries mais encore d'autres bactéries endophytes qui portent l'intérêt de beaucoup de chercheurs (Hardoim et al., 2015). En effet, Zheng et al. se sont intéressés en 2018 à la population microbienne vivant dans les racines régulières et coralloïdes de l'espèce *Cycas bifida*. Ils ont pu identifier, en utilisant les méthodes de séquençage NGS (Next Generation Sequencing) en plus des cyanobactéries, des endophytes appartenant à la famille des *Sinobacteraceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Bacillaceae*, et *Hyphomicrobiaceae* (Fig. 22).

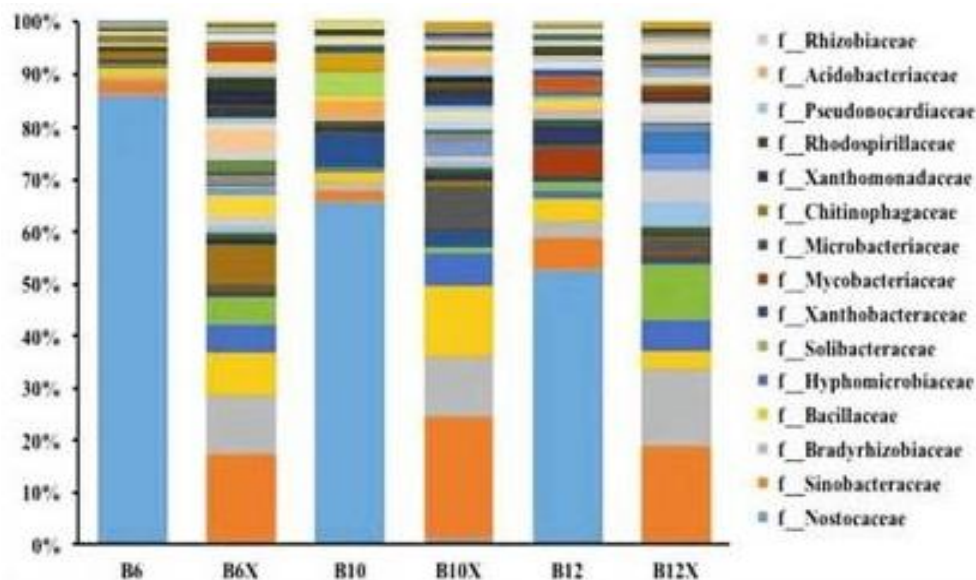


Figure 22. Diversité taxonomique des endophytes dans les racines de *Cycas bifida* (Zheng et al., 2018).

Une autre étude menée par Gutiérrez-García et al., (2019) a révélé l'existence d'une communauté bactérienne endophyte hétérogène différente des cyanobactéries, à l'intérieur des racines coralloïdes de l'espèce *Cycas dioon*. Leur mise en évidence est rendue possible en utilisant cette fois-ci une technique qui combine la métagénomique et la phylogénomique afin de détecter et valoriser la diversité taxonomique et les relations phylogénétiques chez ces endophytes. Cette étude a révélé la présence d'endophytes diazotrophes tels que les espèces des genres *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium* et *Rhizobium* (Fig. 23).

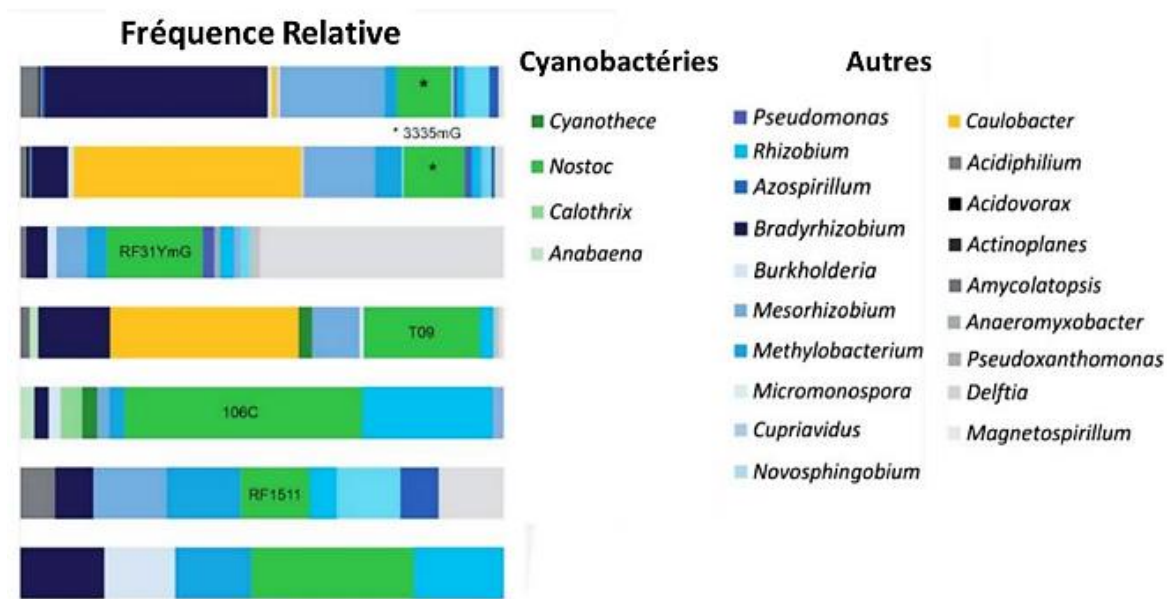


Figure 23. Diversité taxonomique de communautés endophytes : les cyanobactéries (marquées en vert), les espèces de *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium* et *Rhizobium* (marquées en bleu) (Gutiérrez-García et al., 2019).

Le présent travail s'inscrit dans le cadre du développement de nouvelles stratégies pour l'amélioration de la germination *in vivo* et de la croissance des plantes de *Cycas revoluta*, plante primitive qui persiste jusqu'à nos jours en partie grâce à ses associations bénéfiques avec des cyanobactéries et d'autres bactéries endophytes. Une caractérisation de ces microorganismes colonisant les racines coralloïdes est entreprise afin d'explorer leur capacité de ces bactéries à favoriser la croissance des plantes en conditions normales et de stress salin. L'objectif est de développer de nouvelles solutions durables, respectueuses de l'environnement, en utilisant les bactéries présentant un fort potentiel de la promotion de la croissance (PGP), afin d'améliorer la tolérance des plantes au stress salin, notamment des plantes de tomate.

MATERIEL ET METHODES

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

Les graines de cycas utilisées dans cette étude, sont fraîchement récoltées de pieds femelles âgés de 50 ans cultivés dans le jardin de la Faculté des Sciences de l'Université Mohammed V de Rabat.

2. Méthodes

2.1. Amélioration de la germination des graines de *Cycas revoluta*

2.1.1. Traitement des graines

Des graines de *Cycas revoluta* fraîchement récoltées ont été exposées à différents traitements thermiques (traitement de stratification) en vue d'étudier l'effet de la stratification sur la germination *in vivo* des graines. Les traitements consistaient en un stockage des semences à température ambiante ou 30°C pendant 2 ou 4 mois selon le traitement. Le choix des températures testées repose sur des travaux rapportés par la bibliographie, qui soulignaient l'effet bénéfique du stockage des semences à 30 °C sur la germination des graines (Roh et Bentz, 2002; Baldos et *al.*, 2014; Keun et *al.*, 2016). Le tableau 4 résume les différents traitements appliqués.

Tableau 4. Traitements thermiques des graines de *Cycas revoluta*.

Traitement	Type de traitement	Durée d'application
T ₀	Témoin/ non traité	0 heures
T ₁	Température ambiante	2 mois
T ₂	30°C	2 mois
T ₃	Température ambiante	4 mois
T ₄	30°C	

2.1.2. Mesure de la longueur et de la largeur de l'embryon

A la fin des traitements, les graines sont trempées dans l'eau pendant 48 heures afin de ramollir la couche externe orange, la sacrotesta qui, par la suite est enlevée mécaniquement avec un couteau. La sclérotesta (coque dure) est éliminée à la main après avoir flambé les graines débarrassées de la sarcotesta avec de l'éthanol à 70% pendant 2 minutes. La désinfection de la surface des mégagamétophytes se fait par trempage dans une solution commerciale d'eau de javel (NaOCl) diluée à 30% additionnée de 2 à 3 gouttes/ 100 ml de Tween-20 pendant 20 min sous agitation périodique. Les mégagamétophytes sont ensuite

rincés 3 fois à l'eau distillée stérile à raison de 3 à 5 min pour chaque rinçage puis coupés en deux longitudinalement pour isoler délicatement l'embryon zygotique (EZ). Pour chaque traitement (voir Tab. 2), la longueur et la largeur des EZs sont mesurée avec une règle graduée et la moyenne est calculée à partir des valeurs de 20 échantillons.

2.1.3. Observation microscopique des embryons zygotiques

L'analyse microscopique a concerné uniquement les graines témoin et les graines du meilleur traitement. Les embryons issus de ces deux traitements ont été fixés suivant le protocole décrit par Brhadda et Abousalim (2007). La fixation a été réalisée en utilisant un mélange d'éthanol à 95° et d'acide acétique (3 :1) pendant 24 heures. Les EZs ont été déshydratés par passage dans une série de bains d'alcool (70°, 95° et 100°). Après déshydratation complète, les EZs ont été transférés dans deux bains successifs de toluène pendant 24 heures. L'inclusion des échantillons dans la paraffine a été réalisée dans trois bains successifs de paraffine maintenus à 80°C, chaque bain durant 60 minutes. Les coupes de 10-15 µm d'épaisseur, réalisées au microtome, ont été étalées sur des lames parfaitement dégraissées. Les sections ont été colorées avec du bleu de toluidine à 1 % et visualisées avec un microscope optique Epson équipé d'un logiciel d'imagerie.

2.1.4. Dosage de l'activité de l'alpha-amylase au niveau des embryons zygotiques

2.1.4.1. Dosage qualitatif de l'activité de l'alpha-amylase

La présence d'activité alpha-amylase a été évaluée selon la méthode de Xie et *al.* (2007). Les embryons zygotiques et les demi-graines sans embryon ont été placés dans des boîtes de Pétri comprenant la gélose à 2 %, 0,2 % d'amidon de pomme de terre soluble, 20 mM de CaCl₂ et 20 mM de succinate de sodium pH 5,0. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 28°C pendant 48 heures. Après incubation, une solution I₂/KI (2,8 mM I₂ + 43,4 mM KI dans 0,2 N HCl) a été ajoutée aux plaques. Après 5 minutes, la réaction entre l'amidon et l'iode transforme les plaques de gélose en bleu-violet. L'agar autour des EZs ou des demi-graines à activité alpha-amylase reste incolore en raison de l'hydrolyse de l'amidon déclenchée par l'activité alpha-amylase.

2.1.4.2. Dosage quantitatif de l'activité de l'alpha-amylase

L'activité alpha-amylase a été déterminée quantitativement selon une méthode légèrement modifiée de celle développée par Miller, en 1959 décrite par Liu et *al.* (2018). Des embryons zygotiques isolés ont été collectés, broyés et mélangés avec 100 ml d'eau distillée réfrigérée. Le mélange a été trempé dans un bain de refroidissement (4°C) pendant 10 minutes. Le mélange a été filtré et l'extrait a ensuite été recueilli et centrifugé à 12 000 tr/min pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant récupéré a été chauffé pendant 15 minutes à 70°C. 1 ml d'extrait d'embryons a ensuite été mélangé avec 1 ml d'amidon soluble à 1 % dissous dans du tampon acétate de sodium à pH 5,6. Le mélange a été incubé pendant 15 minutes à 40°C puis bouilli durant 5 minutes en présence de 2 ml d'acide 3,5-dinitrosalicylique. La quantité de sucre réduit libéré a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm en utilisant le maltose comme étalon de sucre réduit.

Une courbe d'étalonnage est préparée à partir d'une solution mère de maltose d'une concentration de 1g/l allant de 0.2g/l à 1g/l (Fig. 24).

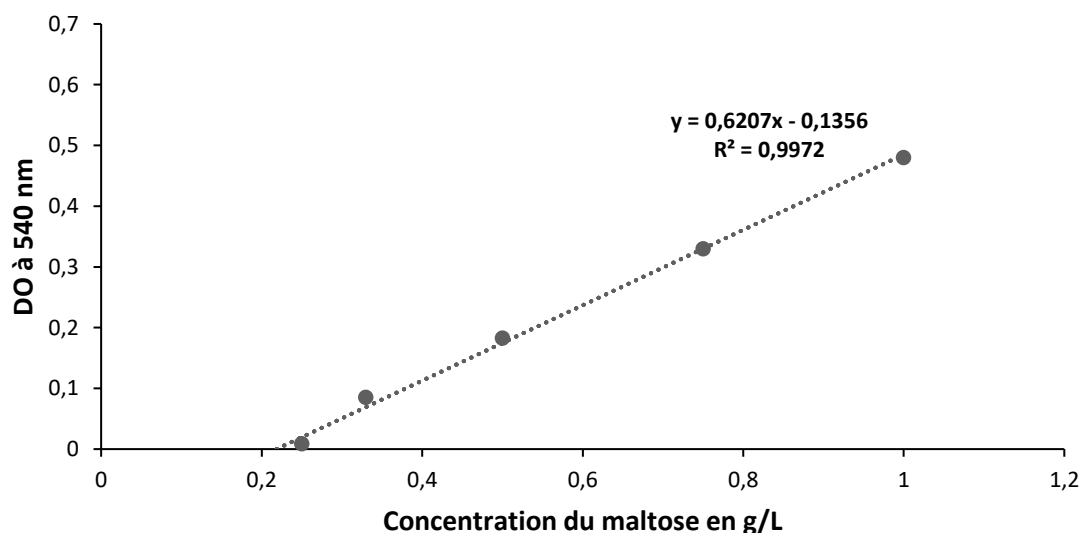


Figure 24. Courbe étalon du maltose employé pour la quantification de l'activité de l'alpha-amylase selon le protocole décrit par Liu et *al.* (2018).

2.1.4.3. Dosage des sucres solubles au niveau de l'embryon

La quantification de la teneur en sucres solubles au niveau des embryons traités et non traités a été réalisée suivant le protocole décrit par Dubois et *al.* (1956). 100 mg de la matière fraîche issue des embryons ont été mis dans des tubes à essai contenant 5 ml d'éthanol à 80%. Les tubes ont été par la suite placés dans le bain-marie à 80°C pendant 1 heure. Après

refroidissement des tubes, 0.5 ml d'eau distillée et 1 ml de phénol à 5% ont été ajoutés et les tubes ont été incubés pendant 1 heure à la température ambiante. Enfin, 2.5 ml d'acide sulfurique a été ajouté. L'absorbance a été déterminée par spectrométrie à 485 nm. Les résultats sont reportés sur une courbe-étalon de maltose réalisée dans les mêmes conditions.

Une courbe d'étalonnage a été préparée à partir d'une solution mère de glucose d'une concentration de 10 mg/l allant de 0.15mg/l à 2.5mg/l (Fig. 25).

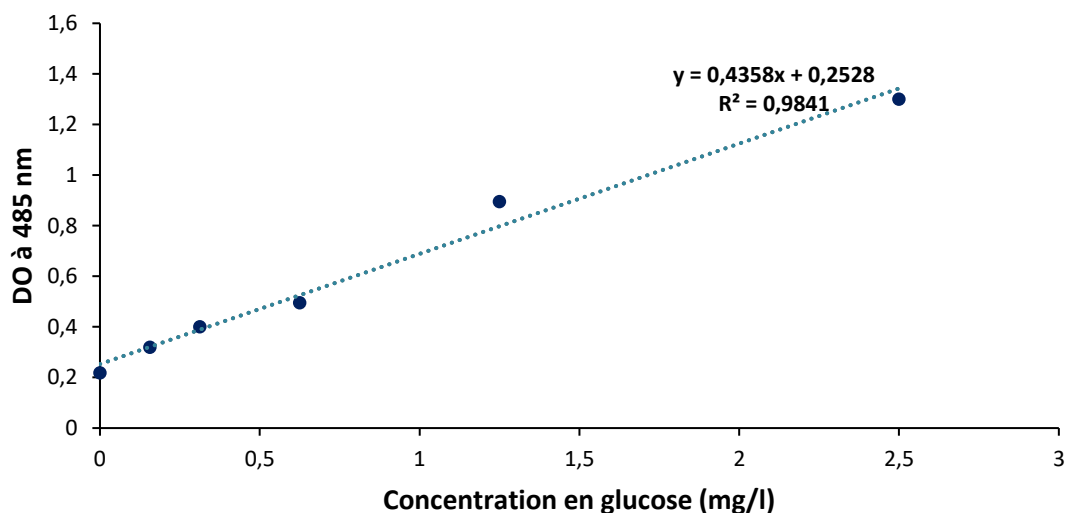


Figure 25. Courbe étalon du glucose employé pour la quantification des sucres solubles selon le protocole décrit par Dubois et *al.* (1956).

2.1.4.4. Quantification des phytohormones dans les embryons zygotiques

La quantification de l'acide abscissique (ABA) et de l'acide gibbérellique (GA₃) dans les embryons zygotiques a été réalisée sur LC-MS/MS sur un système de type Finnigan LC-MS/MS (Thermo Electron, San Jose, CA, USA). Le logiciel d'acquisition de données utilisé était Xcalibur. La séparation LC a été réalisée par une colonne HiQ Sil C18 (250 mm × 4,6 mm i.d., 5 m). Les deux phytohormones ont été éluées avec du méthanol/eau contenant 0,2 % d'acide formique (50 :50, v/v) au débit de 1,0 ml/min. Le volume d'injecteur sélectionné était de 25L. Les conditions LC-MS/MS étaient les suivantes : ESI tension de pulvérisation, 4 kV ; débit de gaz gaine, 70 arb ; débit de gaz auxiliaire, 20 arb ; tension capillaire, -38 V ; température capillaire, 350 °C et lentille tubulaire, 95 V. Le mode SRM a été utilisé pour la détermination des deux phytohormones. GA₃ et ABA ont été surveillés aux transitions m/z de 345 → 239 et 263 → 153, 219, respectivement. Les énergies de collision optimisées pour GA₃ et ABA étaient respectivement de 21 et 20 eV.

2.1.4.5. Germination des graines et croissance des plantules

A la fin des traitements, les graines sont mises à germer dans des bacs contenant de la tourbe à 25 cm de profondeur. Les graines non traitées sont désignées comme traitement témoin (T₀). Les cultures sont incubées à 25±2°C, avec une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité et arrosées quotidiennement en fonction de l'humidité du sol. Des observations hebdomadaires concernant le temps (en jours), la cinétique, le taux de germination et le nombre de graines qui ont germé ont été enregistrées sur une durée de 10 mois après la mise en culture. Pour chaque traitement, trois répétitions biologiques dont chacune comprenant 20 répétitions techniques ont été réalisées. Après 6 mois de culture, plusieurs paramètres de croissance à savoir le nombre de feuilles par plante, la longueur et la largeur du stipe, la longueur des racines et de la feuille la plus développée, ont été évalués pour tous les traitements étudiés (T₀, T₁, T₂, T₃ et T₄) décrits dans le tableau 4.

2.2. Amélioration de la croissance des plantes de *Cycas revoluta* par apport des amendements organiques

2.2.1. Traitements du sol

Des plantules de *Cycas revoluta* âgées d'un an, issues de graines soumises au traitement T₂ ont été placées en serre, dans des pots de 3 litres et réparties en trois lots selon le traitement sol-substrat : (i) plantes cultivées sur substrat de sol agricole uniquement, (ii) plantes cultivées sur substrat de sol agricole mélangé avec du fumier de mouton (sol : fumier de mouton = 90:10) et (iii) plantes cultivées sur substrat de sol agricole, mélangé avec du fumier de cheval (sol : fumier de cheval = 90:10). La composition chimique du sol agricole et des amendements organiques est représentée dans le Tableau 5. Dans chacun des trois traitements décrits, 20 répétitions (une plantule par pot) ont été effectuées. Au cours de l'expérience, toutes les plantules ont été irriguées trois fois par semaine avec de l'eau distillée.

Des échantillons de sol agricole et d'amendements organiques ont été placés à l'air libre pendant au moins 48 heures à température ambiante, pour pouvoir sécher. Ensuite, ils sont tamisés en utilisant un tamis de 2mm pour se débarrasser des petits cailloux. L'analyse chimique a été réalisée par le laboratoire d'analyses physico-chimiques de l'unité de recherche sur l'environnement et la conservation des ressources naturelles, du centre régional de la recherche agronomique de Rabat (CRRA-Rabat). Cette analyse avait concerné : le pH, la matière organique, la matière sèche, la capacité d'échange cationique, l'azote total, le carbone, le phosphore disponible et les cations échangeables (magnésium, sodium et potassium). Les

paramètres mentionnés ci-dessus ont été déterminés comme suit : le pH a été déterminé à partir d'une pâte de sol préparée obtenue par mélange d'eau avec le sol (1 :2.5, v:w). La matière organique a été estimée comme décrit par Walkley-Black (1934). La matière sèche a été déterminée en séchant des échantillons de sol à masse constante à 105°C, en calculant la différence de masse de la quantité de sol avant et après le séchage. La capacité d'échange cationique a été déterminée selon la méthode décrite par Gillman (1979). La quantité totale d'azote a été estimée à l'aide de la méthode de Kjeldahl. Le phosphore disponible a été estimé par la méthode décrite par Olsen et *al.* (1954).

Tableau 5. Caractérisation et composition en éléments nutritifs du sol agricole et des amendements organiques. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm écart type de trois répétitions biologiques indépendantes. CEC: capacité d'échange cationique.

	Sol Agricole	Sol + Fumier de cheval	Sol + Fumier de mouton
pH	7,64 \pm 0,05	8,50 \pm 0,01	8,3 \pm 0,01
CEC (mS/cm)	0,21 \pm 0,02	2,13 \pm 0,08	2,15 \pm 0,04
Potassium (ppm)	120,02 \pm 12,50	612,91 \pm 5,56	512,38 \pm 2,58
Phosphore (ppm)	58,45 \pm 0,71	330,97 \pm 0,99	329,16 \pm 0,98
Azote total (%)	0,038 \pm 0,004	1,87 \pm 0,01	2,55 \pm 0,01
Matière organique (%)	2,88 \pm 0,91	44,8 \pm 1,2	46,12 \pm 1,07
Matière fraîche (%)	91,13 \pm 0,26	97,08 \pm 0,03	98,335 \pm 0,06
Magnesium (%)	7,25 \pm 0,04	0,65 \pm 0,01	0,7 \pm 0,01
Carbone (%)	1,81 \pm 0,005	105,23 \pm 0,01	106,12 \pm 0,005
Sodium (még/100g)	1,29 \pm 0,06	7,35 \pm 0,05	7,65 \pm 0,15

2.2.2. Détermination de la teneur en éléments nutritifs des feuilles, des tiges et des racines

A la fin de la période expérimentale, les feuilles, les tiges et les racines de *Cycas revoluta* ont été récoltées, lavées et séchées. La biomasse sèche a été transmise à l'unité de recherche sur la technologie alimentaire, du CRRA de Rabat pour la détermination de la teneur en éléments nutritifs. Pour chaque échantillon, la biomasse sèche a été réduite en une poudre fine avant de passer au tamis de 0.59 mm. 0,5 g de la poudre fine de chaque échantillon ont été placés à 515°C dans un four à moufle pendant 5 heures. Les cendres obtenues ont été dissoutes dans 3 ml de HCl 6 N puis diluées dans 50 ml d'eau bi distillée. Les concentrations de P, Na, K, Fe, Cu et Zn ont été déterminées en utilisant la méthode DTPA comme décrit par Lindsay et Norvell, (1978). La teneur en azote a été estimée à l'aide de la méthode de Kjeldahl. Les macronutriments (P, Na, K et N) ont été exprimés en % MS, tandis que les quantités de micronutriments (Fe, Cu et Zn) ont été exprimées en mg/Kg MS.

2.2.3. Mesure de la fluorescence de la chlorophylle

Les mesures de fluorescence de la chlorophylle ont été effectuées à l'aide d'un fluoromètre à modulation d'impulsions (OS30p, Opti-Sciences, Hudson, NH, USA). Les mesures de fluorescence ont été évaluées sur des feuilles adaptées à l'obscurité, à l'aide de pinces foliaires placées sur les limbes adaxiaux loin de la nervure foliaire. Deux mesures ont été faites sur chaque pot. Les paramètres de fluorescence de la chlorophylle suivants ont été déterminés : l'efficacité photochimique maximale du PSII (Fv/Fm), le rendement quantique maximal de la photochimie primaire (Fv/F0) et le rendement photosynthétique quantique du PSII.

2.2.4. Détermination de la teneur en chlorophylle a, b et en chlorophylle totale

La teneur en chlorophylle a été réalisée comme décrit par Bassa et *al.* (2012) avec une légère modification. 0,25 mg de feuilles fraîches ont été prises au hasard pour chaque traitement. Le tissu frais a été broyé finement dans un mortier et des pilons en présence de 80 % d'acétone. Le mélange a ensuite été centrifugé à 10000 tr/min pendant 1 minute. Les échantillons ont été analysés par spectrophotométrie à deux longueurs d'onde, 645nm et 663nm, en utilisant 80 % d'acétone comme blanc. Les teneurs en chlorophylle **a**, **b** et en chlorophylle totale ont été calculées selon les équations suivantes : Chl **a** = 0,999 (663nm) - 0,0989 (645nm) ; Chl **b** = 0,328 (663nm) + 1,77 (645nm) et la teneur totale en chlorophylle = 20,2*Chl **a** + 8,02*Chl **b**.

3. Isolement et caractérisation des populations bactériennes associées au *Cycas revoluta*

Deux ans après leur développement, les plantules de l'espèce *Cycas revoluta* cultivées en présence d'amendements organiques, présentent toutes des racines coralloïdes (Fig. 26). Une analyse microbiologique a été réalisée pour explorer et isoler les bactéries colonisant ces racines coralloïdes. Le but étant d'identifier ces bactéries et d'évaluer leurs activités PGP, pour une potentielle application en agriculture.

3.1. Isolement des cyanobactéries à partir des nodosités du *Cycas revoluta*

3.1.1. Stérilisation des nodosités

Les nodosités prélevées (Fig. 26) à partir de chaque plante ont été maintenues séparément, désinfectées par l'alcool à 95% pendant 10 secondes, ensuite, stérilisées avec une solution de chlorure de mercure $HgCl_2$ à une concentration de 0.2% pendant 1-2 minutes, suivies par une série de rinçage à l'eau distillée stérile.



Figure 26. Racines coralloïdes de *Cycas revoluta* hébergeant des cyanobactéries et autres bactéries endophytes.

3.1.2. Isolement des cyanobactéries

L'isolement et la stérilisation des nodules ont été appliqués selon le protocole décrit précédemment. L'isolement a été réalisé en conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire suivant le protocole décrit par Vincent (1970). Un nodule stérile est déposé dans un Eppendorf contenant 50 μ l d' H_2O stérile, écrasé à l'aide d'une pince fine préalablement stérilisée par incinération. Le jus de nodule obtenu est ensemencé directement dans un erlenmeyer contenant 250 ml de milieu Bleu Green Medium (BG11) (Stanier *et al.*, 1971), la culture est incubée pendant 10-15 jours dans un agitateur orbital, avec un éclairage continu et une température de 25°C, sous agitation mécanique 120 tr/min. La composition du milieu BG11 est détaillée dans l'annexe 1.

3.1.3. *Caractérisation morphologique des isolats*

La caractérisation morphologique de la collection des cyanobactéries a été réalisée à l'aide de microscope optique sous le grossissement de $\times 400$ dans le but de les identifier et de déterminer leur aspect morphologique.

3.1.4. *Caractérisation moléculaire des isolats*

3.1.4.1. Extraction de l'ADN

La biomasse des cyanobactéries a été récupérée après 15 jours de culture (la période optimale de croissance) suivant le protocole décrit par Atashpaz et *al.* (2009) avec quelques modifications. La biomasse cellulaire est récupérée après centrifugation à 8000 tr/min pendant 30 min. 100 mg du culot bactérien est remis en suspension dans 567 μl de tampon de lyse (Tris-HCl 10mM, pH 8,0, Trisodium citrate 1mM et 1,5 % SDS) et mélangé par vortex, suivie par une incubation à 37°C pendant 1 heure. Ensuite, 30 μl de SDS 10% et 3 μl de 20 mg ml^{-1} protéinase K, 100 μl de NaCl 5M et 80 μl de solution CTAB/NaCl (10 % CTAB/0,7 M NaCl) sont ajoutés, suivi d'une incubation à 65°C pendant 10 min. Le lysat est par la suite extrait avec un volume égal de Chloroform Isoamyl alcool, suivi d'une douce agitation des tubes jusqu'à obtention d'une solution blanche. La séparation des phases aqueuse et organique s'est faite par centrifugation à 13000 tr/min pendant 10 min. La récupération de la phase aqueuse contenant les acides nucléiques est réalisée par transfert d'un volume de 500 μl dans de nouveaux tubes Eppendorf stériles, suivie d'un ajout de 100 μl d'acétate de sodium et un volume égal d'Isopropanol. Le mélange est ensuite incubé à -80°C pendant 30 min, suivi d'une centrifugation à 13000 tr/min pendant 20 min. La dernière étape est la précipitation de l'ADN, réalisée par l'ajout de deux volumes de l'éthanol absolu suivi par une centrifugation à 13000 tr/min de 10 min. L'ADN est à la fin lavé avec de l'éthanol 70 %. Le surnageant est jeté et le culot séché à l'air libre. Ce dernier est dissous dans 30 μl de l'eau pure.

3.1.4.2. Dosage de l'ADN

L'ADN extrait est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDropR 2000, Thermo Scientific. La qualité de l'ADN est estimée par les deux rapports : DO 260/280 qui renseigne sur la présence d'une contamination par les protéines. Ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2. La DO 260/230 indique la contamination par des composés organiques tels que le phénol, l'EDTA. Sa valeur doit être comprise entre 2 et 2,2. Les ADN extraits sont par la suite stockés à -20°C.

3.1.4.3. Caractérisation des souches par PCR inter-REP

La caractérisation des souches isolées a été réalisée par PCR inter-REP (repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction). Cette approche consiste à amplifier par la réaction de polymérisation en chaîne, des régions de l'ADN génomique bactérien situées entre des séquences de type REP. La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique qui permet l'amplification spécifique d'un fragment d'ADN cible en présence d'oligonucléotides codant cette région d'intérêt. Son principe consiste en une série de répétitions de cycles contenant 3 phases : dénaturation d'ADN, hybridation des amorces et l'élongation des amorces (Mullis et Faloona, 1987). Les séquences REP sont hautement conservées et répétées dans le génome bactérien, d'où l'intérêt de les utiliser pour analyser du génome des bactéries appartenant à des groupes phylogénétiques proches ou éloignés. Cette technique a été largement utilisée pour la caractérisation et la détermination de la diversité génétique des cyanobactéries (Mehta et al., 2002 ; Muralitharan et al., 2011). La réaction de la rep-PCR a été effectuée en utilisant les amorces REP (REP1 et REP2) pour étudier la diversité génétique au sein de notre collection de cyanobactéries. L'amplification a été effectuée dans des tubes PCR contenant le mélange réactionnel qui comprend les amorces, la Taq polymérase et l'ADN. Le programme utilisé pour amplification ainsi que la séquence des deux amorces sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Combinaison d'amorces utilisées pour la réaction de polymérisation en chaîne décrite par Mehta et al. (2002).

Profil	Amorces	Programme PCR
REP	REP1: 5'-TTTCGICGICATCIGGC-3' REP2: 5'-TCGTCTTATCIGGCCTAC-3'	5min 94°C, 40x(30s 94°C, 30s 40°C, 1 min 72°C), 5 min 72°C.

Les produits de la PCR ont été analysés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 2% (p/v) Les bandes ont été visualisées sous rayons UV après incubation dans une solution de Bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,4 % (p/v) et prises en photo à l'aide du système d'imagerie ENDURO GDS. Les profils de la rep-PCR obtenus ont été analysés par le logiciel Gel-Compar II afin de construire le dendrogramme en se basant sur l'algorithme UPGMA (the unweighted pair group method with arithmetic averages - la méthode du groupe de paires non pondérées avec des moyennes arithmétiques).

3.1.4.4. Amplification et séquençage de l'ADNr 16S

L'ARNr16S est un gène qui est présent et fortement conservé chez toutes les bactéries en raison de sa fonction essentielle dans l'assemblage du ribosome. Il contient également des régions variables qui peuvent servir d'empreintes digitales pour des espèces particulières. Ces caractéristiques ont fait du gène 16S ARNr un fragment génétique idéal à utiliser dans l'identification, la comparaison et la classification phylogénétique des bactéries (Woese, 1987). L'amplification de l'ADNr 16S a été réalisée afin de séquencer et d'identifier les isolats étudiés, les amorces universelles utilisées sont CYA106F et CYA781R : (5' CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA3') / (5' GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT3') proposées par Nübel et *al.* (1997). La réaction d'amplification d'ADNr 16S a été effectuée dans un volume réactionnel de 25 µl, selon le programme suivant : 40 cycles ; dénaturation de 30s à 95°C, 30s d'hybridation à 58°C et 1min d'élongation à 72°C, suivi par 1 min d'élongation finale à 72°C. Un volume de 3 µl de chaque amplifiat a été utilisé pour l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Le marqueur de taille 1Kb DNA Ladder (Promega) a été utilisé comme marqueur du poids moléculaire lors de chaque migration. Les bandes ont été visualisées sous lumière UV et prises en photo avec le système d'imagerie ENDURO GDS.

Les amplicons ont été purifiés et séquencés selon la technique de Sanger (Sanger et *al.*, 1977) par le Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) de Rabat, en utilisant les amorces (CYA 106F et CYA781R). L'ensemble des séquences brutes obtenues après séquençage sous forme de chromatogramme, sont traités avec le logiciel ChromasPro V2.1, afin de vérifier la qualité des séquences, éliminer le début et la fin des séquences qui présentent souvent des pics illisibles, corriger les ambiguïtés (N= base non déterminée, M = A ou C, K = G ou T, R = A ou G, Y= C ou T) et identifier les doubles pics, reflet d'un mélange de deux séquences différentes. Les séquences traitées sont par la suite exportées sous format FASTA au Logiciel GeneDOC V2.7 (Nicholas et *al.* 1997), alignées entre elles et comparées aux séquences de référence obtenues par BLASTN NCBI (National Center for Biotechnology Information). La construction des arbres phylogénétiques a été basée sur la méthode de NJ (NeighbourJoining Methods : NJ) en utilisant le logiciel MEGA X (Tamura et *al.*, 2013).

3.1.5. Extraction des polysaccharides

Une culture fraîche de 1000 ml de chaque isolat de cyanobactéries est centrifugée à 5000 tr/min pendant 10 min. Ensuite, 2 volumes de l'éthanol absolu sont ajoutés au surnageant. Le

mélange est par la suite incubé à 4°C pendant 24h. Les polysaccharides précipités sont récupérés par centrifugation à 5000 tr/min pendant 10 min et le culot est séché dans l'étuve à 50°C et stocké à température ambiante. La quantité des polysaccharides obtenus a été déterminée en g/L (Mutale, 2017).

3.2. Isolement d'autres bactéries endophytes des nodosités du *Cycas revoluta*

3.2.1. Isolement des bactéries endophytes

L'isolement et la stérilisation des nodules ont été appliqués selon le protocole décrit précédemment dans la section 2.3.1.2 dans des conditions aseptiques (sous une hotte à flux laminaire). Le jus de nodule obtenu est par la suite, prélevé avec une anse de platine stérile et ensemencé en 5 exemplaires directement sur le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) au rouge Congo (Annexe 2) pour l'isolement des rhizobiums et le milieu BN (Bouillon nutritif) (Annexe 3) pour les bactéries endophytes. Il s'agit d'une phase cruciale qui permet la différenciation des isolats issus d'un même nodule et d'éliminer les éventuels contaminants. Après l'identification de l'aspect morphologique des colonies, une série de repiquages a été nécessaire afin de s'assurer de la pureté de l'isolat bactérien.

3.2.2. Caractérisation moléculaire des bactéries endophytes

3.2.2.1. Extraction de l'ADN

L'ADN génomique des vingt souches isolées a été extrait selon la méthode classique décrite par Chen et Kuo (1993), à partir d'une culture bactérienne fraîche sur milieu YEM. Pour chaque souche, l'extraction a été réalisée à partir d'un culot bactérien obtenu par centrifugation à 10000 tr/min pour une durée de 10 minutes. Le culot obtenu est ensuite suspendu dans 300µl de tampon de lyse (40mM Tris acétate 1M (pH=7,8), 30 mM acétate de sodium 3M, 1% SDS à 20%, 20µg/ml d'ARNase 1mg/ml, EDTA 0,2/ml). Après agitation au vortex, 100µl de NaCl (5M) sont ajoutés aux tubes avant d'être incubés à 4°C pendant 15min. Le surnageant est ensuite récupéré après centrifugation à 13000 tr/min pendant 10 minutes à une température de 4°C, avant d'ajouter un volume égal de chloroforme. Cette étape est ensuite suivie d'une centrifugation à 13000tr/min pendant 5 minutes. Les acides nucléiques sont ensuite précipités par ajout de 2 volumes d'éthanol absolu suivi d'une incubation à -80°C pendant 1 heure. Un lavage à l'éthanol à 70% suivi d'une centrifugation à 13000tr/min pendant 10 minutes sont réalisés pour éliminer les traces des différentes solutions d'extraction.

Le culot obtenu est séché à l'air libre pour être suspendu dans 30 µl d'eau pure et stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

3.2.2.2. Dosage de l'ADN

L'ADN extrait est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDropR 2000, Thermo Scientific, comme décrit précédemment dans la section 2.3.1.4.2.

3.2.2.3. Amplification et séquençage de l'ADNr 16S

L'amplification de l'ADNr 16S a été réalisée dans le but de séquencer et d'identifier les souches bactériennes isolées des nodosités présentes dans les racines du *Cycas revoluta*. L'amplification de l'ADN des souches a été réalisée dans un volume réactionnel final de 25µl. Les amorces employées pour l'amplification de cette séquence sont représentées dans le tableau ci-dessous (Tab. 7).

Tableau 7. Couple d'amorces utilisées pour l'amplification du gène ADNr 16S.

Amorce	Séquence
<i>fDI</i>	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3'
<i>rDI</i>	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Dans chaque tube à PCR, un volume de 1µl d'ADN bactérien et 24µl du mélange réactionnel sont déposés. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur programmable (Veriti 96 Well Thermal Cycler) suivant le programme décrit dans le tableau 8. Chaque série de PCR comprend un contrôle négatif et un témoin positif. Les produits PCR ont ensuite été vérifiés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose (1%) additionné de 2.5µl de bromure d'éthidium (BET) incorporé dans le gel.

Tableau 8. Programme de la réaction de polymérisation en chaîne employée pour l'amplification du gène ADNr 16S.

Phase	Nombre de cycles	Température (°C)	Temps
<i>Dénaturation initiale de l'ADN</i>	1	95°C	1min
<i>Dénaturation</i>	30	95°C	15s
<i>Hybridation</i>		60°C	15s
<i>Extension</i>		72°C	10s
<i>Extension final</i>	1	72°C	1min

Le séquençage a été réalisé au niveau de la plateforme de biologie moléculaire et de génomique fonctionnelle aux UATRS (Unités d'Appui Techniques à la Recherche Scientifique) au Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) à Rabat. Le séquençage des échantillons a été fait par Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer selon la méthode de Sanger. Après la réception des résultats du séquençage, les séquences de mauvaises qualités ont été éliminées. Les séquences restantes (de bonne qualité) ont été visualisées à l'aide du logiciel Chromas pro (version 2.1.10) et alignées grâce au logiciel MEGA (version 11) avec d'autres séquences de référence obtenues par le programme 33 BLAST utilisé pour identifier les séquences grâce aux informations taxonomiques connues disponibles sur la banque de données du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.2.3. Evaluation du potentiel PGP des bactéries endophytes

Les vingt souches isolées ont subi un premier criblage sur la base de trois activités liées à la promotion de croissance chez les plantes : la synthèse d'AIA, la production de sidérophores et la solubilisation du phosphate inorganique. A la fin du premier criblage, six souches ont été sélectionnées et testées pour les mêmes activités décrites précédemment sous l'effet de différentes concentrations de NaCl allant de 50mM, 100mM jusqu'à 120mM ajouté au milieu suivant le même protocole décrit pour chaque activité. A noter que pour tous les tests, trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche.

3.2.3.1. Synthèse d'AIA

Les souches étudiées ont été testées pour leur capacité à synthétiser l'acide indole acétique (AIA) selon la méthode décrite par (Loper, 1986). La préculture de chaque souche a été ensemencée dans des tubes à essai contenant 5ml du milieu YEM additionné de 50µg/ml de tryptophane (annexe 2), de façon à ce que la densité optique initiale (DO à 600nm) soit de 0.05. Après incubation à 28°C pendant 48h sous agitation (150 tr/min), les cultures ont été centrifugées à 13 000 tr/min pendant 15min, 1ml du surnageant de chaque souche a été récupéré dans des cuves à spectrophotomètre où il a été additionné par 1ml du réactif de Salkowsky (annexe 4), puis les cuves sont incubées dans l'obscurité à température ambiante pendant 30min, l'obtention d'une coloration rose confirme la production d'AIA, l'absorbance des échantillons a été mesurée à 540nm à l'aide d'un spectrophotomètre ultraviolet-visible (UV2005). Les concentrations d'AIA ont été déterminées grâce à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une série de solutions à concentrations déterminées d'auxine allant de 0 jusqu'à 125ppm (annexe 5).

3.2.3.2. Production de sidérophores

La production de sidérophores est démontrée par la méthode analytique chrome azurol-S (CAS) (Annexe 6) dans un milieu dépourvu de fer (Schwyn et Neilands, 1987). La préculture des vingt souches a étéensemencée dans des flacons contenant 5 ml de milieu Modi liquide (annexe7), d'une manière à ce que la DO initiale soit de 0.05. Ces flacons ont été par la suite incubés à 28°C pendant 7 jours sous agitation (180tr/min). Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 10000 tr/min pendant 20min. Le pH de chaque surnageant a été ajusté à la neutralité (pH=6.8). La révélation de la production de sidérophores a été réalisée dans des tubes à hémolyse 34 prétraitées par l'HCl contenant le mélange d'1ml du surnageant avec 1ml du réactif CAS (annexe5). Après 2heures d'incubation à l'obscurité, la production des sidérophores est mise en évidence par le changement de la couleur bleue en couleur jaune. La DO des échantillons a été mesurée à 630 nm (valeur As), cette valeur sera comparée à celle du milieu non inoculé (valeur Ar) afin de calculer le pourcentage de sidérophores produits par chaque souche selon l'équation suivante : **% sidérophore = [(Ar-As)] / Ar x 100.**

3.2.3.3. Solubilisation du phosphate

La capacité des souches à solubiliser le phosphate inorganique a été démontrée par l'utilisation du milieu Pikovskaya phosphate liquid medium (PVK) (Pikovskaya, 1948) (Annexe 8). Dans des erlenmeyers de 250 ml, la préculture des souches a étéensemencée dans 100ml du milieu PVK additionné de 50 mg de la roche phosphatée brute de façon à ce que la DO initiale soit de 0.05 avant d'être incubées à 28°C sous agitation (180 tr/min) pendant 7 jours. Après cette durée, la croissance (DO à 600nm) ainsi que le pH ont été mesurés et le surnageant de chaque souche a été récupéré par centrifugation à 13 000 tr/min pendant 15min. La quantité du phosphate solubilisé a été déterminée grâce à la méthode colorimétrique employé par (Tandon et *al.*, 1968), en mélangeant 1ml du surnageant avec 1ml du réactif vanadate molybdate (Annexe 9). Après 2h d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la DO a été mesurée à 405 nm et l'estimation de la quantité de phosphate solubilisé a été déterminée grâce à une courbe étalon établie à partir des DO de solutions à concentrations connues de phosphate soluble (KH₂PO₄) (annexe 10).

4. Effet de certaines bactéries endophytes isolées des racines du *Cycas revoluta* sur la germination et la croissance des plantes de tomate.

4.1. Matériel végétal

La plante modèle choisie pour cette étude est une espèce de plante herbacée de la famille des Solanacées : la tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Le choix s'est porté sur la tomate pour une multitude de raisons dont son importance économique et nutritionnelle. La variété utilisée est enregistrée dans le catalogue européen sous le nom Campbell 33 et se caractérise par un court cycle de développement tout en s'accommodant aux essais de laboratoire.

4.2. Matériel biologique

Sur la base du criblage des activités PGP réalisé en conditions normales et stressantes, deux souches bactériennes des 20 isolées ont été utilisées pour l'évaluation de l'effet de ces bactéries sur la germination et la croissance de la tomate en conditions normales et de stress salin. Les deux bactéries sélectionnées sont FC11P1 (*Bacillus* sp.) et M42Y (*Pantoea* sp.).

4.3. Activation des souches bactériennes

Les deux souches bactériennes (*Pantoea* sp. et *Bacillus* sp.) ont été repiquées dans des boîtes contenant le milieu YEM additionné du Rouge Congo, préalablement stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes. Les cultures ont ensuite été incubées à 25°C pendant 24h.

4.4. Effet de l'inoculation sur la germination des graines de tomate

4.4.1. Préparation de la suspension bactérienne

Les deux souches bactériennes sélectionnées ont été cultivées pendant la nuit dans le milieu YEM liquide avec agitation constante à 150 tr/min à 28°C jusqu'à atteindre une densité optique de l'ordre de 0.8 (DO à 600nm).

4.4.2. Désinfection des graines de tomate

La désinfection des graines a été effectuée par trempage de celles-ci dans une solution d'hypochlorite de sodium à 20% pendant 10 minutes suivi d'un rinçage 3 à 4 fois à l'eau distillée stérile et d'un séchage à l'air libre sous la hotte à flux laminaire.

4.4.3. Inoculation et mise en culture des graines

Le lot de graines a été divisé en deux ; un premier lot dit témoin ou "non inoculées", comprenant des graines de tomate qui ont été trempées dans de l'eau distillée stérile, ensuite déposées dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée à 0.8% additionné de différentes concentrations de chlorure de sodium : [0mM], [100mM], [120mM] et [150mM]. Les graines du deuxième lot « inoculées » ont été trempées dans 20ml de la suspension bactérienne pendant 30 min avant leur mise en culture dans des boites de Pétri contenant les mêmes traitements que le premier lot. Les boites ont été ensuite scellées puis placées dans une chambre de culture à une température de 25°C et à une photopériode de 16h lumière/8h obscurité. Pour chaque condition, 3 répétitions ont été réalisées (chaque répétition comprenant un total de 10 graines).

4.4.4. Détermination du pourcentage de germination

La germination a été enregistrée quotidiennement pendant 15 jours et a été considérée comme terminée une fois que la radicule dépassait d'environ 2 mm de longueur. Le pourcentage de germination a été déterminé à l'aide de l'équation suivante : $G (\%) = (N_g/N_t) * 100$. N_g est le nombre de graines germées et N_t est le nombre total de graines utilisées dans l'expérience.

Détermination de l'indice de germination

L'indice de germination a été calculé à l'aide de l'équation suivante : $GI = \sum G_t/D_t$, alors que G_t est le nombre de graines germées en t jours et D_t est le nombre de jours de germination correspondants (KaramiMehrian et al. 2016).

4.4.6. Détermination du temps moyen de germination

Le temps moyen de germination (MGT) a été déterminé selon l'équation décrite par (Ellis et Roberts 1981) : $MGT = \sum(n*d) / N$, où n = nombre de graines germées chaque jour, d = nombre de jours depuis le début de l'expérience et N = nombre total de graines ayant germé à la fin de l'expérience.

4.5. Effet de l'inoculation sur la croissance des plantes de tomate

4.5.1. Culture des plantes

Les graines de tomate de la variété Campbell 33 ont été préalablement stérilisées pendant dix minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 50% puis rincées abondamment à l'eau distillée stérile. Les graines ont ensuite été mises en culture sur de l'eau gélosée à 0.8%. Les

boîtes ont été placées ensuite en chambre de culture à conditions contrôlées pendant une semaine ($T = 25^{\circ}\text{C}$ et une photopériode de 16 heures de lumière / 8 heures d'obscurité). Après une semaine de culture, les jeunes plantules ont été transférées dans des pots contenant du sol agricole dont les propriétés physico-chimiques sont représentées dans le Tableau 5.

4.5.2. Inoculation des plantes par les bactéries

L'inoculation des plantes a été effectuée par dépôt de 1ml de l'inoculum aux alentours du système racinaire de chaque plante. Deux doses d'inoculum ont été appliquées au total, à un intervalle d'une semaine. L'inoculum bactérien a été préparé comme décrit précédemment dans la section 2.4.4.1. Quatre différents traitements ont été appliqués : traitement 1 ou NI désignant le lot de plantes n'ayant pas subi d'inoculation et les traitements 2, 3 et 4 qui consistent en une simple inoculation des plantes par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes respectivement.

4.5.3. Application du stress

Le stress salin a été appliqué une semaine après la deuxième inoculation bactérienne en appliquant 150 mM de NaCl. Des contrôles parallèles ont été maintenus en cultivant des plantes de tomate sans inoculation bactérienne et en les irriguant avec de l'eau distillée. Chaque traitement comprenait trois répétitions biologiques, avec trois répétitions chacune. Après 9 semaines, les plantes de tomate ont été récoltées pour des analyses morphologiques et biochimiques.

4.5.4. Évaluation des paramètres de croissance

Plusieurs paramètres de croissance ont été évalués après 9 semaines de culture, notamment le poids sec des parties aériennes et racinaires, la hauteur de la plante, la surface foliaire, le nombre de feuilles par plante, le ratio pousse/racine (shoot : root ratio) et la longueur de la racine principale.

4.5.4.1. Détermination du poids sec

Les poids secs de la partie aérienne et racinaire ont été déterminés après séchage des échantillons à 70°C pendant 72 heures. Le poids sec de chaque partie a été déterminé à l'aide d'une balance de précision et la moyenne des poids a été calculée sur la base de six plantes par condition.

4.5.4.2. Détermination de la hauteur de la plante et de la longueur de la racine principale

La hauteur de la plante ainsi que la longueur de la racine principale ont été déterminées à la récolte à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats obtenus sont exprimés en cm.

4.5.4.3. Détermination du nombre de feuilles par plante

Le nombre de feuilles par plante a été déterminé par comptage du nombre de feuilles développées sur chaque pied de tomate. Les résultats sont enregistrés sous forme de moyenne calculée sur la base de six plantes par condition.

4.5.4.4. Détermination du rapport pousse/racine

Ce ratio a été calculé selon l'équation suivante : rapport pousse : racine (poids sec des pousses/poids sec des racines) * 100.

4.5.4.5. Détermination de la surface foliaire

La surface foliaire a été déterminée à l'aide du logiciel Mesurium Pro (version 3.4), en utilisant une feuille bien développée (généralement la cinquième feuille à compter de la base de la plante). Les résultats obtenus sont exprimés en cm².

4.5.5. Évaluation des paramètres physiologiques et biochimiques

Plusieurs paramètres physiologiques ont été quantifiés dans les différentes conditions testées. Les tests physiologiques et biochimiques réalisés sont les suivants : la teneur en chlorophylle **a**, **b** et en chlorophylle totale, la quantification des anthocyanes, le dosage des sucres solubles et la teneur relative en eau des feuilles.

4.5.5.1. Teneur en chlorophylle

La teneur en chlorophylle **a**, **b** et (**a+b**) a été déterminée suivant le protocole décrit par McKinney (1994). Pour cela, des feuilles fraîchement récoltées ont été utilisées pour la quantification de la chlorophylle. 100 mg de feuilles ont été pesés et mis en suspension dans 10 ml de solution d'acétone : alcool (3:1). Après 48 heures d'incubation à l'obscurité, les échantillons ont été analysés par spectrophotométrie à deux longueurs d'onde ; 663 nm et 647 nm. La chlorophylle **a**, la chlorophylle **b** et la chlorophylle (**a+b**) ont été calculées à l'aide des équations suivantes : chlorophylle **a** = $12,25 * A_{663} - 2,7 * A_{647}$; Chlorophylle **b** = $21,5 * A_{647} - 4,7 * A_{663}$ et chlorophylle **a+b** = $7,15 * A_{663} + 18,71 * A_{647}$.

4.5.5.2. Teneur en anthocyanes

La teneur en anthocyanes a été déterminée selon la méthode Lange et *al.* (1971). Les feuilles des plantes ont été homogénéisées dans 1.5 ml du mélange propanol: HCl: eau (18: 1: 81) puis extraites au bain-marie bouillant pendant 3 min. Après centrifugation, l'absorbance du surnageant a été mesurée à 535 et 650 nm. L'absorbance due aux anthocyanes a été calculée comme $A = A_{535} - A_{650}$.

4.5.5.3. Teneur en sucres solubles

La teneur totale en sucres solubles a été déterminée par la méthode Dubois et *al.* (1956). Pour cela, 100 mg de feuilles fraîches de chaque échantillon ont été homogénéisés dans 5 mL d'éthanol à 80 % dans des tubes à essai. Ces derniers ont été conservés dans un bain-marie à 80 ° C pendant 1 h et les extraits d'échantillons ont été transférés dans un autre tube à essai. 0.5 ml d'eau distillée et 1 ml de phénol à 5% ont ensuite été ajoutés et laissés à incuber pendant 1 h. Enfin, après 1 heure, 2.5 ml d'acide sulfurique ont été ajoutés aux tubes à essai et bien agités sur un agitateur orbital. L'absorbance a été lue à 485 nm sur le spectrophotomètre. La teneur en sucres solubles a été déterminée à partir la courbe d'étalonnage en utilisant le saccharose comme étalon.

4.5.5.4. Teneur relative en eau

Des feuilles jeunes complètement développées (habituellement la cinquième feuille à compter de la base) ont été prélevées sur des plantes de trois semaines bien hydratées et ont été rapidement pesées pour déterminer leur poids frais (PF). Ensuite, les échantillons de feuilles ont été partiellement trempés dans l'eau et placés à 4°C et à l'obscurité. Après 24 heures, les feuilles ont été légèrement essorées au papier filtre (de manière à éliminer l'eau résiduelle non contenue dans les tissus) et le poids à la turgescence (PT) a été déterminé. Enfin, les échantillons ont été mis dans une étuve à 70°C pendant 48 heures pour déterminer leurs poids sec (PS). La teneur relative en eau, exprimée par RWC est calculée comme suit : $RWC = (PF - PS) / (PT - PS) \times 100$.

4.5.6. Évaluation des paramètres liés à la productivité

Les paramètres de productivité ont été mesurés dans neuf plantes par condition. Le nombre de fruits par plante a été calculé et le poids moyen des fruits a été déterminé après pesée individuelle de chaque fruit, à l'aide d'une balance semi-analytique d'une sensibilité de 0,01 g.

5. Analyse statistique

Les résultats figurant dans ce travail sont représentés en moyennes arithmétiques \pm écart type. L'analyse statistique a été faite moyennant le test t de Student avec un seuil de significativité fixé à 0,05 en utilisant le logiciel Statistica version 10 (Statsoft, Tulsa, USA) et ceci pour les données relatives au développement biométrique des embryons zygotiques (longueur et largeur) et celles des dosages de l'acide abscissique, l'acide gibbérellique et des sucres solubles.

En ce qui concerne le reste des résultats, les données sont exprimées en moyennes \pm écart type. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse de variance à 5% par ANOVA à un seul facteur et les différences significatives ont été classées par le test de Tukey avec le même seuil de significativité (0,05). La relation entre les paramètres a été observée à l'aide du coefficient de Pearson. Une analyse en composantes principales a également été réalisée pour déterminer quel paramètre contribue le plus à la variation de données.

RESULTATS & DISCUSSION

Résultats et discussion

1. Amélioration de la germination des graines et de la croissance des plantes de *Cycas revoluta*

1.1. Allongement de l'embryon zygotique

Le traitement des graines à la chaleur a montré un effet bénéfique sur l'allongement de l'embryon zygotique (EZ) de l'espèce *Cycas revoluta*. En effet, toutes les graines exposées à la chaleur quelles que soient la température et la durée du traitement ont manifesté une croissance importante de l'EZ par rapport à ceux des graines non traitées (T₀) (Fig. 27). Les taux de croissance manifestés par les EZ sous les différents traitements sont de 134% (T₁), 276% (T₂), 300% (T₃) et 342% (T₄) en comparaison avec le témoin (T₀). L'analyse statistique des données relevées (longueur des EZ en mm) a confirmé qu'il existe une différence significative entre chaque traitement et le témoin mais pas de différence significative entre les graines ayant subi les traitements T₁ et T₄.

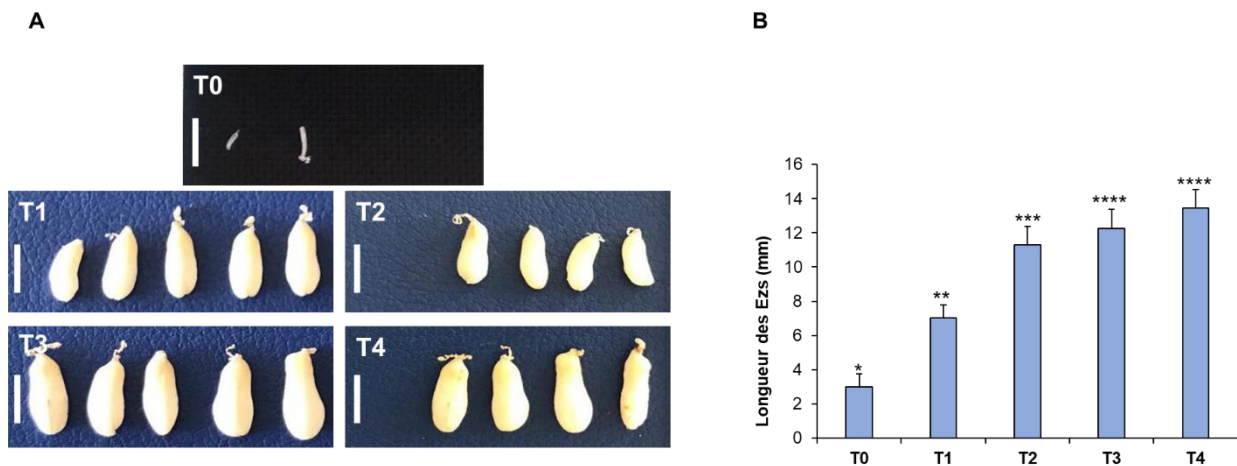


Figure 27. Effet des prétraitements à la chaleur sur la longueur des embryons de *Cycas revoluta*. (A) Embryons zygotiques isolés à partir de graines soumises à T₀, T₁, T₂, T₃ et T₄. Barres d'échelle = 1 cm. (B) Longueur des embryons zygotiques dans les différents traitements. Les astérisques indiquent une différence statistique selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

1.2. Germination des graines

Dans l'objectif d'analyser les effets de la stratification à la chaleur sur la germination des graines de *Cycas revoluta*, nous nous sommes intéressés au temps, au pourcentage et à la cinétique de la germination dans le cas de chaque traitement.

1.2.1. Temps de germination

Le temps de germination a été calculé à partir du premier jour de mise en culture en germination des graines. Les temps de germination les plus courts ont été observés dans le cas des graines stockées à 30°C pendant 2 mois (T₂) et 4 mois (T₄) et sont respectivement de 198,19 jours et 163,33 jours. Celles restées à température ambiante autrement dit les traitements T₁ (2 mois) et T₃ (4 mois), ont enregistré des temps de germination respectifs de 256,75 jours et de 202 jours. Ces résultats ont montré que les quatre conditions de stockage ont nettement amélioré le temps de germination en comparaison avec la condition témoin (T₀) où les EZ ont germé après un délai de 294,4 jours. De ce fait, nous pouvons avancer qu'un séjour des semences de 2 mois à 30°C ou de 4 mois à température ambiante et à 30°C, a accéléré nettement la germination. Cependant, l'analyse statistique des résultats a révélé qu'il n'y a pas eu de différence significative entre ces trois traitements même si le traitement T₄ a permis d'obtenir le temps de germination le moins long (Fig. 28).

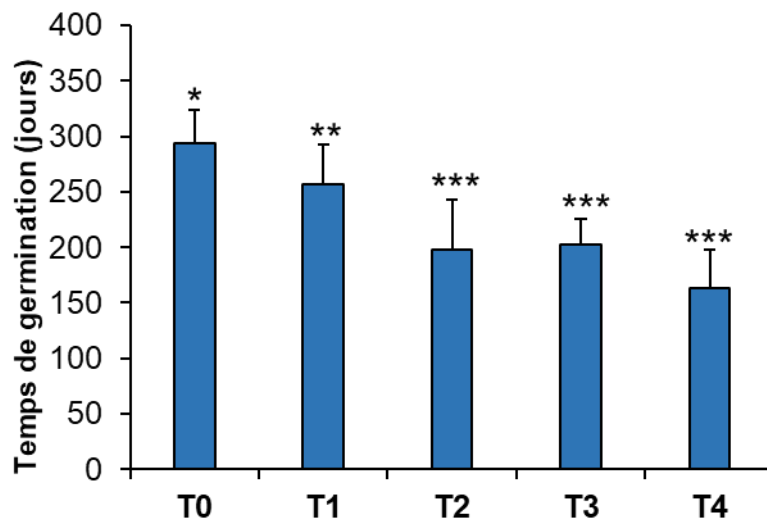


Figure 28. Effet de la chaleur sur le temps de germination des embryons du *Cycas revoluta*. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins trente répliques biologiques. Les astérisques indiquent une différence statistique selon le test de Tukey ($p < 0.05$).

1.2.2. Pourcentage de germination

L'examen de la figure 29, illustrant l'évolution du taux de germination en fonction de la température et de la durée de son application a indiqué une augmentation et une diminution du taux de germination autrement dit des variations de ce dernier. Une durée de traitement de 4 mois, qu'elle soit appliquée à température ambiante (T₃) ou à 30°C (T₄), a un effet négatif sur le pourcentage de germination de *Cycas revoluta* qui a atteint les valeurs respectives de 7% et

de 12%. Les graines "témoins" par contre, ont enregistré un taux de germination de 25%. En comparaison avec ce dernier résultat, nous avons remarqué que 2 mois de traitement à température ambiante (T_1) ou à 30°C (T_2), améliorait la capacité germinative des graines qui a manifesté une valeur de 49,33%, un pourcentage équivalent au double de celui manifesté par le témoin.

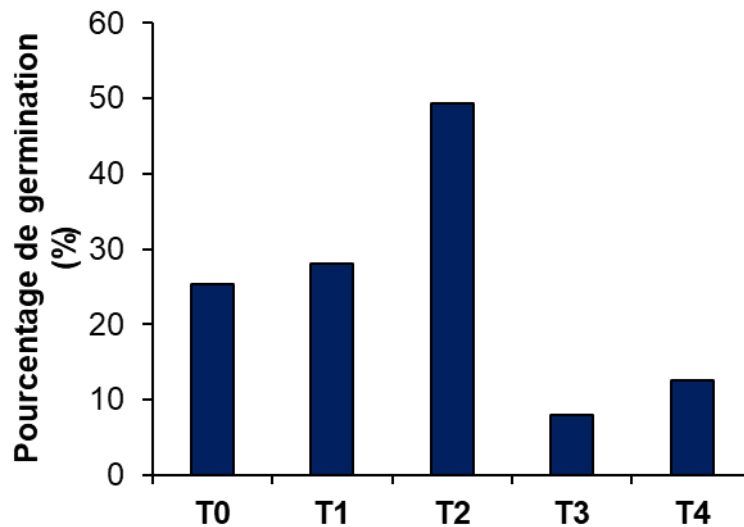


Figure 29. Effet des différents traitements thermiques sur le pourcentage de germination des embryons de *Cycas revoluta*.

1.2.3. Cinétique de la germination

La figure 30 montre la cinétique de germination des graines de *Cycas revoluta* pour chacune des températures testées et la durée de leur application. Les courbes représentent le nombre de graines germées pour une période de 10 mois. L'analyse de cette cinétique a indiqué une première phase de latence due à l'imbibition des graines, une deuxième phase exponentielle où nous assistons à un démarrage de la germination et enfin une troisième phase caractérisée par une accélération de la germination annonçant un nombre important de graines germées. Le temps de latence était variable selon la nature du traitement, en T_0 il a été de 6 mois ; en T_1 il a affiché une durée de 5 mois ; en T_3 il a demeuré 7 mois. Les traitements T_2 et T_4 (30°C, 2 mois et 4 mois) ont enregistré le temps de latence le plus court : 4 mois. Cependant, nous avons remarqué qu'il y a eu un ralentissement de la germination en T_4 où le nombre de graines qui avait germé est resté très inférieur (8 graines) à celui atteint en T_2 (38 graines) au terme de 10 mois. Nous pouvons avancer que le traitement à 30°C pendant 2 mois a eu un effet bénéfique sur la vitesse de germination. Nos résultats ont démontré que c'est le traitement T_2 qui a permis d'avoir le nombre le plus élevé de graines germées de *C. revoluta*

et que le traitement T₄ a retardé la germination des graines d'un mois par rapport au témoin T₀.

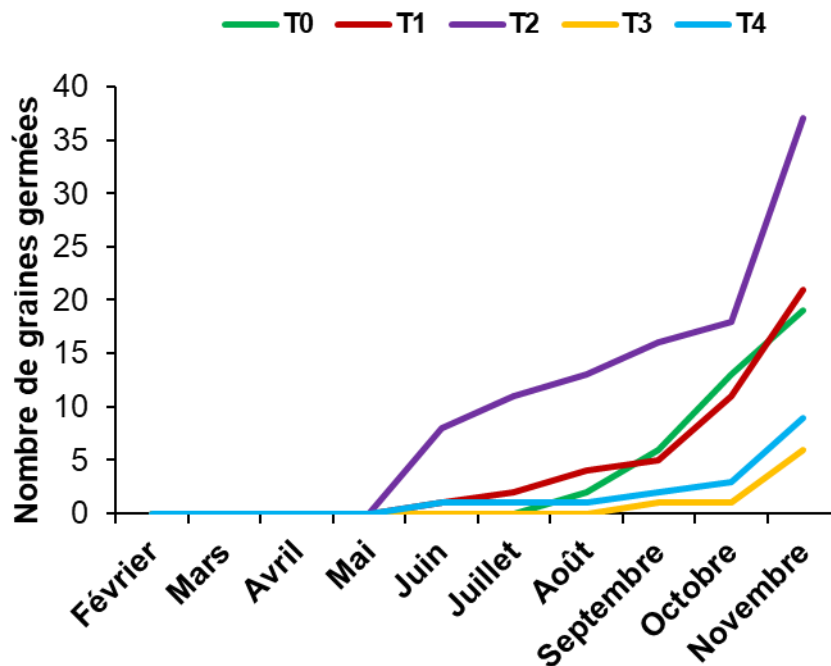


Figure 30. Effet de différents traitements thermiques sur la cinétique de germination des embryons de *Cycas revoluta*.

L'espèce *Cycas revoluta* est une plante très appréciée et utilisée en ornement. Cependant, elle est confrontée à un problème de germination causé essentiellement par la dureté du tégument qui enveloppe la graine (Ullah et *al.*, 2020). De ce fait, plusieurs méthodes de scarification (mécanique, physique et chimique) sont testées pour rendre le tégument perméable à l'absorption de l'eau et favoriser la germination aussi bien chez *Cycas revoluta* que chez d'autres cycadales. Schutzman (1984, 1989) a pratiqué une scarification chimique sur les graines de *Zamia furfuracea* et *Cycas revoluta*, en utilisant de l'acide sulfurique concentré (H₂SO₄) dans un premier temps suivi d'un trempage des graines dans de l'acide gibbérellique (GA₃). Néanmoins, ces prétraitements ne sont pas toujours fiables avec les cycadales (Dehgan et Yuen, 1983), par exemple, Zarchini et *al.* (2011) ont constaté que l'utilisation de l'acide sulfurique, même à de faibles concentrations, semble affecter négativement la germination des graines, tandis que sa combinaison avec l'eau chaude semble améliorer le pouvoir germinatif de *Cycas revoluta*.

De nombreux chercheurs se sont intéressés aux traitements thermiques pré-germinatifs des semences. Baskin *et al.* (2002) ; Merritt *et al.* (2007) et Razavi et Hajiboland (2009) ont avancé que le stockage des graines dans un environnement chaud entraîne généralement un développement embryonnaire relativement rapide. Cependant, aucun travail antérieur n'a été mené pour étudier l'effet du stockage à chaud des graines, sur la germination et le développement de *Cycas revoluta* bien que ce procédé ait été employé chez d'autres espèces. En effet, Chen *et al.* (2007) ont rapporté qu'un traitement à la chaleur pour une durée de 4 à 6 semaines, suivi de 8 semaines de scarification à froid, sont susceptibles d'améliorer amplement la germination de *Prunus campanulata*. Ce résultat positif est dû au fait que les basses températures ont permis l'accumulation du taux d'acide gibbérélique dans l'embryon alors que le traitement à la chaleur était insuffisant à lui seul d'induire la synthèse de cette phytohormone en quantité suffisante au développement de l'embryon. Chez d'autres arbustes tels *Haloxylon salicornicum* et *Styrax imbricate*, la germination est significativement améliorée lorsque les graines sont conservées à $40 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant trois mois (El-Keblawy, 2013). La même observation a été annoncée par Baskin en 2009, une stratification chaude pendant au moins 1 mois semble essentielle pour briser la dormance des graines et améliorer ainsi la germination de l'espèce *Styrax japonicus* (clochette des neiges du Japon). Chez certaines orchidées, principalement *Epipactis palustris* et *Goodyera pubescens*, Roh et Bentz (2003) ont constaté que la dormance des graines pourrait être brisée par une incubation des graines à la chaleur, suivie d'un stockage au froid. Cela s'expliquerait par le fait que la scarification chaude appliquée dans un premier temps suivie d'une autre froide, dans un deuxième temps, augmenterait la perméabilité des graines à l'eau, ramollissant ainsi le tégument qui enveloppe la graine.

1.2.4. Analyse histologique

A la lumière des résultats fournis par les tests de germination, une analyse histologique des embryons a été réalisée à partir de graines ayant subi les prétraitements T₁ et T₂. L'objectif de cette démarche est de déterminer le stade de développement des embryons exposés à ces traitements pré-germinatifs et de faire une comparaison avec le stade embryonnaire en T₀ (Fig. 31).

L'observation microscopique de fines coupes longitudinales colorées au bleu de toluidine a révélé que les embryons témoins (T₀) ont une structure rudimentaire suspendue par un long suspenseur. L'embryon est à un stade de développement correspondant au stade précoce de

l'embryon globulaire (Fig. 31A). Les cellules embryonnaires n'ont présenté aucun espace intercellulaire apparent. Elles sont délimitées par de fines parois renfermant des noyaux proéminents. Le stockage des embryons à température ambiante pendant 2 mois (T_1) n'a pas impacté de manière positive le développement de l'embryon. En effet, les embryons soumis à T_1 ont présenté une structure embryonnaire primitive, marquée par l'absence de structures différenciées (Fig. 31B).

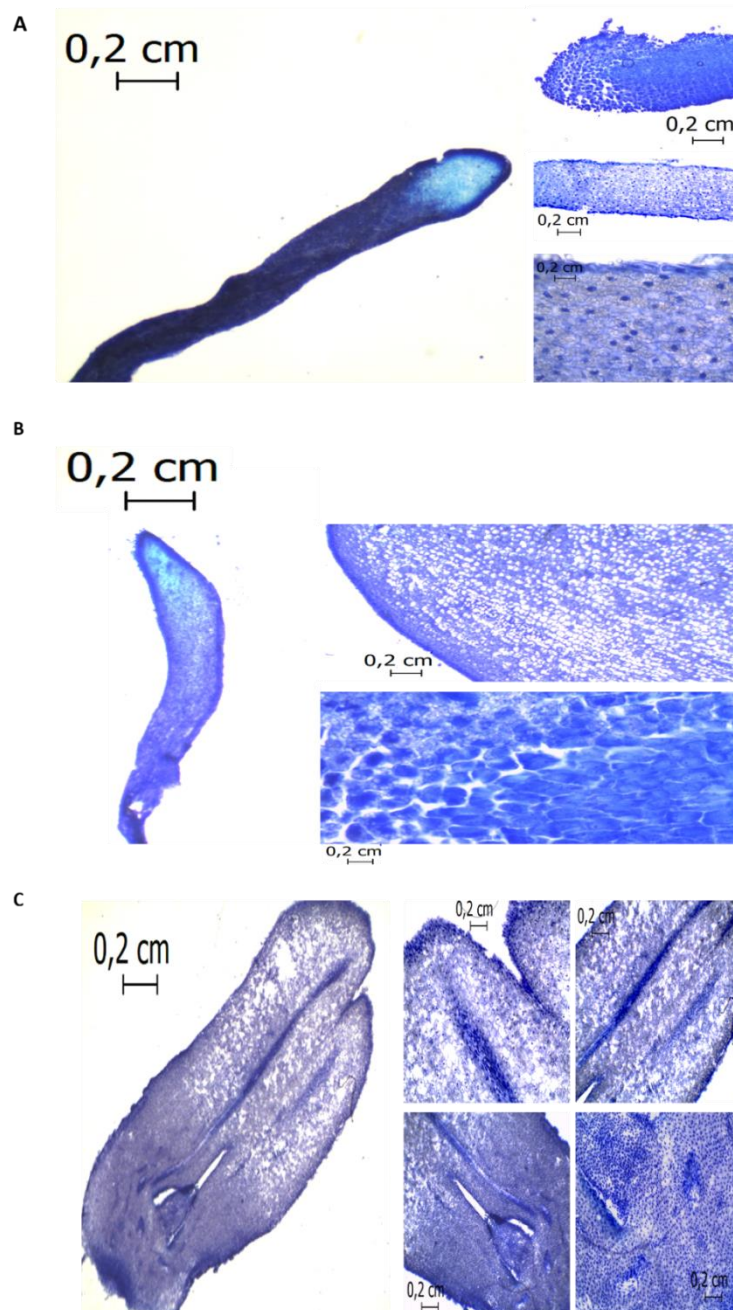


Figure 31. Coupes histologiques d'embryons isolés et colorés au bleu de toluidine. Barre, 200 μm . (A) Embryons témoins (T_0). (B) Embryons conservés à température ambiante pendant 2 mois. (C) embryons conservés à 30°C pendant 2 mois (T_2).

En contrepartie, les embryons prétraités (T₂) manifestent plusieurs différenciations morphologiques, histologiques et cellulaires (Fig. 31C). Ces embryons ont pu atteindre le stade cotylédonaire en seulement 2 mois. A ce stade, les méristèmes caulinaire et racinaire sont bien visibles. Le méristème caulinaire est bien différencié montrant des protubérances cotylédonaires. Le procambium, tissu méristématique chargé de fournir les tissus primaires du système vasculaire, est nettement développé comparé au stade globulaire. Les embryons prétraités (T₂) ont subi alors, une croissance et un développement considérables, ce qui est en concordance avec les observations antérieures (croissance en longueur des embryons (Fig. 27).

L'effet bénéfique de la température sur la croissance et le développement de l'embryon et de la graine a été souligné par plusieurs études. En effet, Devillez (1976) a démontré que le prétraitement à chaud permet d'écourter la durée de la dormance des graines de *Taxus baccata* (conifère) par le fait que la scarification chaude provoque une maturation des embryons immatures ainsi que la suppression de la dormance morphologique. Chien et *al.* (1998) ont découvert que la chaleur favorisait le développement des embryons chez les espèces de *Taxus* ; les embryons atteignant le double de leur taille après six mois de stockage. Cette constatation est cohérente avec nos résultats antérieurs, selon lesquels une exposition des graines durant 4 mois à 30°C augmentait la longueur des embryons de *Cycas revoluta* (Benjelloun et *al.*, 2021). La germination des graines dormantes se produit généralement à la suite de l'activation métabolique (Bewley et Black, 2013), fournissant aux cellules l'énergie nécessaire à leur différenciation, leur expansion et leur développement. Par exemple, Woodenberg et *al.* (2013) ont montré que les embryons de *Encephalartos natalensis* accumulent au stade embryonnaire, de grandes quantités d'amidon par rapport aux autres stades. Ils ont également suggéré que l'amidon accumulé est plus utilisé pendant la germination en tant que réserves glucidiques servant à l'établissement des plantules que durant la croissance de l'embryon.

Compte tenu des résultats mentionnés ci-dessus, seules les graines ayant subi le prétraitement T₂ qui ont donné lieu à des analyses biochimiques.

1.2.5. Dosage de l'alpha-amylase

L'estimation de l'activité catalytique de l'alpha-amylase dans les embryons placés en conditions T₀ et T₂ est présentée dans la figure 32. Une importante activité a été manifestée par les embryons prétraités (T₂), à peu près 550µM / graine, tandis que les embryons bruts (T₀) ont présenté une activité alpha-amylase un peu moins de 400µM/graine (Fig. 32A). Ce résultat a également été confirmé par les données qualitatives (Fig. 32B). En effet, les graines témoins laissent apparaître au voisinage des demi-téguments dépourvus de l'embryon, une petite zone incolore comparativement à celle observée autour des demi-téguments des graines préalablement stockées à 30°C pendant 2 mois (T₂).

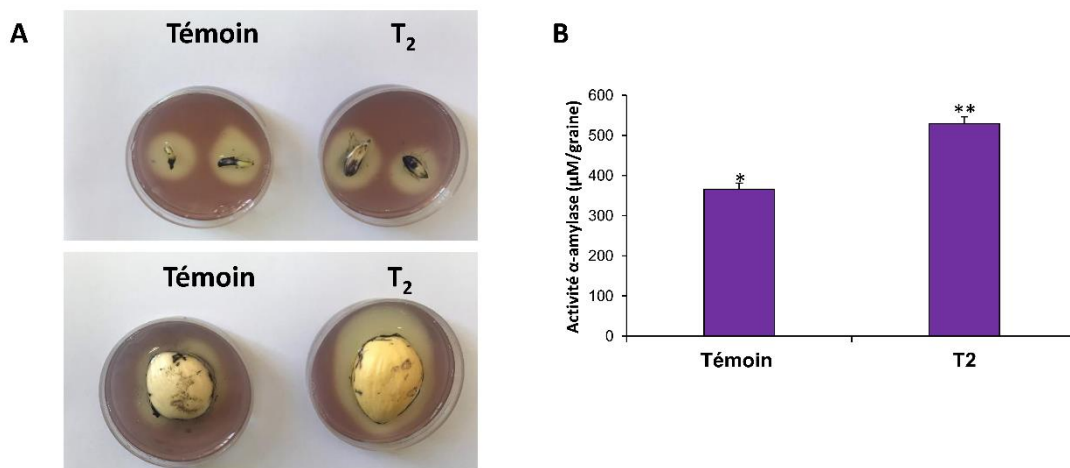


Figure 32. Estimation qualitative (A) et quantitative (B) de l'activité de l'α-amylase dans les embryons non traités (T₀) et ceux conservés à 30°C pendant 2 mois (T₂). Les valeurs correspondent aux moyennes (± écart-type) de trois répétitions biologiques. L'astérisque (*) est statistiquement significatif selon le test T-Student (p < 0,05).

La germination repose en partie sur la dégradation des réserves de stockage des graines matures. Les sucres issus de hydrolyse de l'amidon sont la principale source d'énergie nécessaire à l'émergence des plantules (Beck et Ziegler, 1989). L'alpha-amylase est la principale enzyme impliquée dans la mobilisation de l'amidon et sa dégradation en petites molécules organiques qui fournissent l'énergie et les nutriments indispensables à la germination des graines (Ali et Elozeiri, 2017). Les graines prétraitées (T₂) affichent une activité appréciable de l'α-amylase. Notre résultat corrobore ceux de travaux antérieurs faits par Salisbury et Ross (1995) qui ont démontré que l'activité de certaines enzymes dont l'α-amylase augmentait à des températures qui s'élèvent de 0°C à 35°C. Cependant, au-dessus de 40 °C, toute activité enzymatique diminue en raison de la dénaturation des enzymes. Sari et

al. (2021) ont rapporté qu'à 30-40°C, l'enzyme α -amylase est très active dans les graines de riz (*Oryza sativa* var Cisokan). Les mêmes auteurs ont remarqué que l'absence ou la diminution de l'activité alpha-amylase se faisait respectivement à des températures inférieures à 28°C et supérieures à 40°C. Nos résultats peuvent être interprétés par l'effet bénéfique des températures modérées, 30°C dans notre cas, sur le comportement de l'enzyme alpha-amylase qui s'est traduit par une activation notable et significative.

En plus de la régulation positive de l'activité de l' α -amylase par le traitement thermique, il semblerait que le prétraitement des graines à chaud a influencé la teneur en sucres solubles au niveau des embryons. Nous avons noté que la stratification à chaud (30°C) a provoqué une augmentation considérable de la teneur en sucres solubles (9,68 mg/g de matière fraîche) dans l'embryon en comparaison avec le témoin (4,35 mg/g de matière fraîche), comme le montre la figure 33.

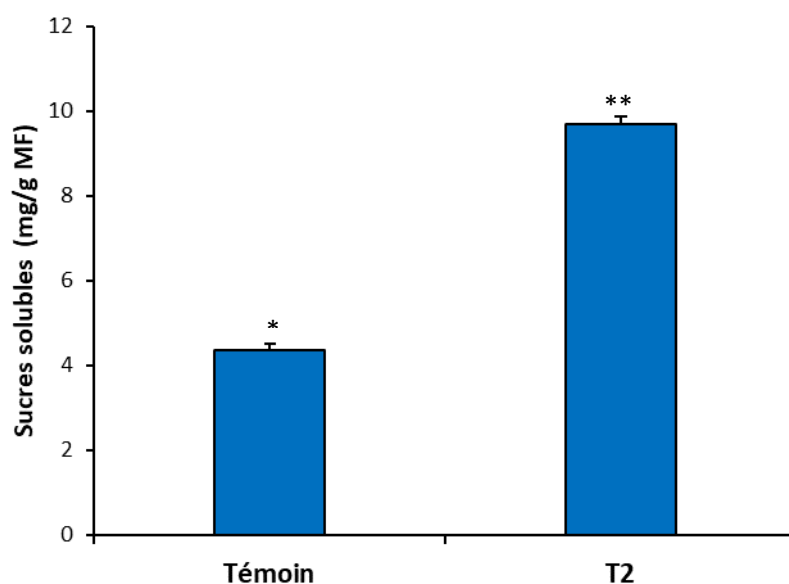


Figure 33. Détermination de la teneur en sucres solubles en mg/g de matière fraîche d'embryons en T₀ et T₂. Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm écart-type) de trois répétitions biologiques indépendantes. L'astérisque (*) est statistiquement significatif selon le test T-Student ($p < 0,05$).

Les réserves présentes dans la graine sont essentielles pour la germination et le développement des plantules. Ces réserves, stockées sous forme d'amidon, lipides ou protéines sont mobilisées lors de la germination pour fournir l'énergie nécessaire à la croissance des plantes (Downie et Bewley, 2000). L'amidon est transformé en sucres simples par l'action de l' α -amylase, engendrant ainsi une augmentation de la teneur en sucres solubles totaux pendant la germination (Zhao et al., 2018 ; Rosa et al., 2009). Dans notre étude, les embryons prétraités montrent une accumulation accrue des sucres solubles, comparés aux

embryons non-traités. Cette accumulation peut être expliquée par la mobilisation des réserves glucidiques pour garantir le développement de l'embryon. Cette hypothèse est appuyée par les résultats du dosage de l' α -amylase, enzyme clé impliquée dans l'hydrolyse de l'amidon. En effet, comme le montre la figure 33, l'activité de l' α -amylase est statistiquement plus importante chez les embryons prétraités par rapport au témoin, ce qui laisse suggérer une activité hydrolytique importante des réserves glucidiques chez ces embryons et expliquant ainsi les fortes teneurs en sucres solubles observées chez ces embryons (T₂).

1.2.6. Antagonisme acide abscissique / acide gibbérellique

Le dosage de l'acide abscissique (ABA) et de l'acide gibbérellique (GA₃) dans les embryons de *Cycas revoluta* prétraités (T₂) et non prétraités (T₀) a engendré une variation dans les quantités d'ABA et de GA₃ accumulées (Tableau 9). La teneur en GA₃ synthétisée dans les graines prétraitées a été légèrement plus élevée (68,91 μ g/g MF \pm 1,35) que dans le témoin (65,15 μ g/g MF \pm 0,81), mais cette légère augmentation reste statistiquement non significative.

Si les teneurs en GA₃ ont peu varié, celles en ABA dans les embryons ont, en revanche été beaucoup plus importantes chez le témoin (42,09 μ g/g MF \pm 0,44) alors que les graines prétraitées ont présenté des teneurs significativement plus faibles atteignant 30,11 μ g/g MF \pm 1,29. Ainsi, les embryons sous T₂ ont accumulé plus de GA₃ que d'ABA, à savoir 65,15 μ g/g MF \pm 0,81 et 30,11 μ g/g MF \pm 1,29, respectivement.

De l'ensemble de ces résultats, il est intéressant de noter qu'une température égale à 30°C a favorisé une augmentation des teneurs en GA₃ ainsi qu'une diminution des teneurs en ABA. La synthèse de l' α -amylase a été avantagée, ce qui a permis l'accumulation des sucres solubles dans les embryons des graines prétraitées. En outre, ces embryons ont pu facilement germer ce qui explique l'effet stimulant de la chaleur sur la germination des embryons, précédemment rapporté par Benjelloun et al. (2021).

Tableau 9. Teneurs en GA₃ et ABA dans des embryons non prétraités (T₀) et prétraités à 30°C (T₂) exprimées en µg/g de matière fraîche (µg/g MF). Les valeurs sont la moyenne ± SD de trois répétitions indépendantes. L'astérisque (*) montre une signification statistique selon le test t-Student (p < 0,05).

	GA ₃	ABA
Embryons non prétraités (T₀)	68,91±1,35 (*)	42,09±0,44(*)
Embryons prétraités (T₂)	65,15±0,81 (*)	30,11±1,29(**)

La dormance et la germination des graines sont principalement régulées par deux phytohormones antagonistes majeures, l'acide abscissique (ABA) et la gibbérelline (GA). La première régule positivement l'induction et le maintien de la dormance des graines tandis que la dernière améliore la germination (Tuan et al., 2018). Il a été précédemment rapporté que l'équilibre des niveaux d'ABA/GA dans les graines est un mécanisme de régulation pivotant qui sous-tend le maintien et la levée de la dormance des graines. L'étude de la dormance des graines chez *Arabidopsis thaliana* a révélé que la suppression de la biosynthèse de GA₃ et du catabolisme de l'ABA inhibait la germination des graines et entraînait la mise en place de la dormance (Chen et al., 2020). Chez le riz, l'amélioration de la germination des graines est liée au déclenchement du métabolisme glycolytique et à la restauration de l'équilibre GA/ABA dans les semences (Yang et al., 2022).

2. Croissance et développement des plantules

2.1. Effet des prétraitements à chaud des graines sur la croissance et le développement des plantules de *Cycas revoluta*

Suite aux résultats obtenus antérieurement qui se résument à l'effet positif des prétraitements à la chaleur des graines de *Cycas revoluta* sur l'allongement des embryons zygotiques ainsi que sur l'amélioration de la germination, nous avons suivi de près la croissance et le développement des plantules issues des graines prétraitées. Plusieurs paramètres de croissance, à savoir le nombre de feuilles par plante, la hauteur et la largeur des tiges, la longueur des racines et de la feuille la plus développée, ont été évalués. Le tableau 10 résume les résultats obtenus lors de cette approche.

Tableau 10. Effets des différents prétraitements des graines de *Cycas revoluta* sur la croissance et le développement des plantules. Les valeurs sont la moyenne \pm écart-type de trente répétitions biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent la signification statistique ($p < 0,05$) selon le test de Tukey.

Traitements	Nombre de feuilles/plante	Longueur du stipe (cm)	Largeur du stipe (cm)	Longueur des feuilles (cm)	Longueur des racines (cm)
T ₀	1,31 \pm 0,47 a	3,00 \pm 0,47 a	1,81 \pm 0,19 b	50,63 \pm 6,24 abc	26,62 \pm 3,15 bc
T ₁	1,20 \pm 0,42 a	3,92 \pm 0,32 a	2,10 \pm 0,24 a	48,22 \pm 4,23 bc	21,60 \pm 2,07 cd
T ₂	1,50 \pm 0,59 a	3,77 \pm 0,45 a	2,15 \pm 0,22 a	55,91 \pm 4,25 ab	35,42 \pm 2,69 a
T ₃	1,33 \pm 0,57 a	3,5 \pm 0,86 a	1,86 \pm 0,30 ab	57,33 \pm 3,05 a	31,66 \pm 2,31 ab
T ₄	1,14 \pm 0,37 a	3,50 \pm 0,47 a	1,58 \pm 0,15 b	49,00 \pm 5 c	21,00 \pm 3 d

La figure 34 illustre l'aspect général des plantules après 6 mois de culture. L'analyse des données a montré que le prétraitement des graines n'affectait pas le nombre de feuilles par plante. Le stockage des graines pendant 2 mois à 30°C a enregistré un nombre maximal de feuilles par plante (1,50 \pm 0,59 cm) tandis que la valeur la plus faible a été obtenue avec le prétraitement T₄ (1,14 \pm 0,37 cm).

Par ailleurs, la longueur des feuilles n'a pas non plus été impactée de manière significative par la chaleur. Il a été constaté que la longueur maximale des feuilles est de 57,33 \pm 3,05 cm chez les plants soumis au traitement T₃, tandis qu'une valeur minimale de 48,22 \pm 4,23 cm a été enregistrée avec le prétraitement T₁. Nous avons constaté également que la longueur du stipe n'a montré aucune différence significative entre les différents prétraitements, à l'inverse de la largeur dont la valeur présentait des variations significatives entre les différents prétraitements ; en l'occurrence, une augmentation significative de la largeur du stipe a été observée chez les semis soumis à T₁ et T₂ par rapport au témoin (T₀), tandis que des changements non significatifs ont été notés entre les prétraitements restants (T₃ et T₄).

Concernant le développement racinaire, la longueur des racines a présenté des variations significatives entre les différents prétraitements. Le stockage des graines pendant 2 mois à 30°C et 4 mois à température ambiante a entraîné une croissance notable de la racine principale annonçant les longueurs respectives de 35,42 cm \pm 2,69 et 31,66 cm \pm 2,31. Alors que les traitements pré-germinatifs T₁ et T₄ ont affiché respectivement les valeurs de 21,60 cm \pm 2,07 et 21 cm \pm 3. Ces dernières estimations restent inférieures à celle évaluée en T₀ (26,62 cm \pm 3,15).

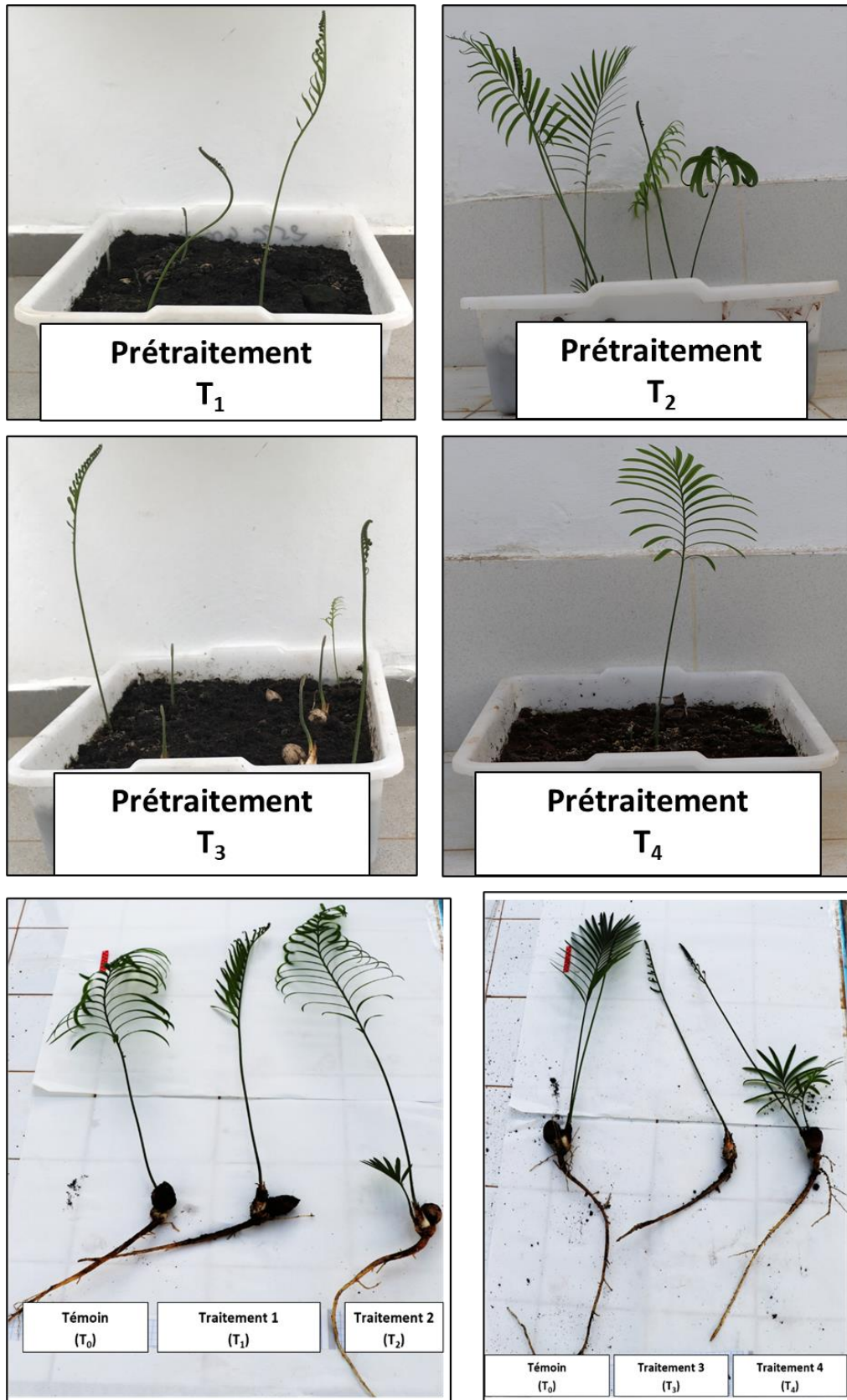


Figure 34. Plantes de *Cycas revoluta* obtenues à partir de graines prétraitées (T₁, T₂, T₃ et T₄) et de graines non prétraitées (T₀).

2.2.Effet des amendements organiques sur la croissance et le développement des plantes

Compte tenu de l'effet bénéfique des traitements pré-germinatifs en particulier le traitement T₂ sur la germination, nous avons enrichi le sol de culture avec du fumier de cheval ou de mouton. L'intérêt de cet apport est d'améliorer la croissance et le développement des plantules étant donné que les cycadales sont caractérisées par une croissance très lente.

2.2.1. Croissance des plantes en présence des différents apports organiques

Dans cette partie de notre travail, nous avons suivi l'allure de la croissance des plants de *Cycas revoluta* pendant une durée de 6 mois, en absence et en présence d'amendements organiques. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 11.

Tableau 11. Effet des amendements organiques (fumier du cheval et du mouton) sur les paramètres morphologiques des plantes de *Cycas revoluta*. Les valeurs sont moyennes \pm SD d'au moins douze répétitions indépendantes. Pour chaque paramètre, les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

	Sol agricole	Sol+ Fumier de cheval	Sol + Fumier de mouton
Nombre de feuilles par plante	1,69 \pm 0,48 (a)	2,94 \pm 0,99 (b)	2,73 \pm 0,47 (b)
Hauteur de la plante (cm)	20,17 \pm 2,40 (a)	57,43 \pm 4,53 (b)	58,14 \pm 2,91 (b)
Longueur du stipe (cm)	3,19 \pm 0,32 (a)	4,35 \pm 0,34 (b)	4,34 \pm 0,42 (b)
Largeur du stipe (cm)	3,52 \pm 0,34 (a)	4,15 \pm 0,38 (b)	4,17 \pm 0,32 (b)
Longueur des racines (cm)	21,14 \pm 1,68 (a)	21,11 \pm 3,60 (a)	32,02 \pm 2,51 (b)
Densité des racines	1,13 \pm 0,23(a)	1,23 \pm 0,20 (ab)	1,49 \pm 0,29 (b)
Nombre de nodules par plante	3,18 \pm 1,93 (a)	4,31 \pm 1,19 (a)	12,67 \pm 2,05 (b)
Longueur des nodules (cm)	0,81 \pm 0,12 (a)	0,95 \pm 0,19 (b)	1,22 \pm 0,21(c)
Largeur des nodules (cm)	0,84 \pm 0,12 (a)	1,39 \pm 0,30 (b)	1,35 \pm 0,35(b)

Il ressort du tableau 11 que l'ajout de fumier de mouton ou de cheval au substrat de culture de *Cycas revoluta* favorise de manière significative la longueur de la tige, le nombre de feuilles par plante ainsi que l'allongement et la densité racinaires. En conséquence, les plants apparaissent plus développés et plus épanouis comparés aux témoins (Fig. 35). En effet, la hauteur des plantes ayant reçu le fumier de cheval ou celui de mouton a montré les moyennes respectives de 57,43 cm \pm 4,53 et 58,14 cm \pm 2,9. Dans ces conditions, la croissance des plantes a été améliorée de trois fois par rapport à celle des plantes témoins qui n'avaient reçu

aucun apport organique ($20,17 \text{ cm} \pm 2,40$). Quant au développement des feuilles, le nombre moyen le plus élevé a été obtenu en sol enrichi au fumier de cheval ($2,94 \text{ feuilles} \pm 0,99$) suivi du sol fertilisé par le fumier de mouton ($2,73 \text{ feuilles} \pm 0,47$) et enfin le sol témoin est arrivé en dernier ($1,69 \text{ feuilles} \pm 0,48$). Les résultats du tableau 11 ont démontré que la matière organique a eu également un effet positif sur le développement du stipe. Avec l'application du fumier de cheval ou de mouton, les plants de cycas ont donné des stipes ayant une longueur et une largeur supérieures à celles des stipes des plantes cultivées en sol témoin.

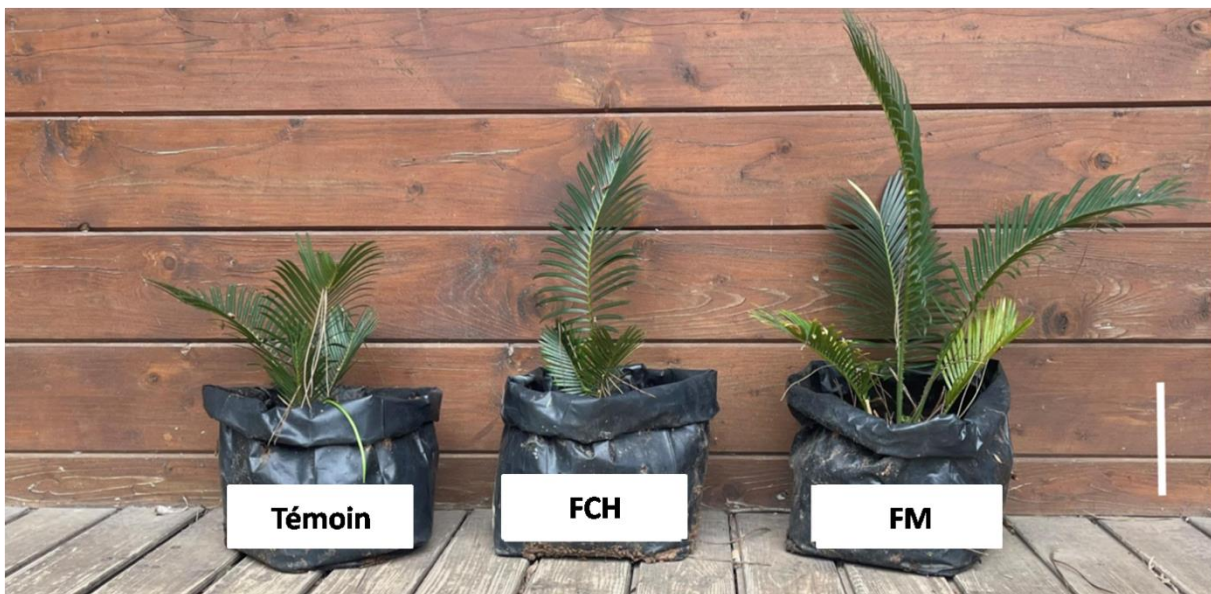


Figure 35. Effet des amendements organiques sur la croissance de *Cycas revoluta*. Témoin : plante cultivée dans le sol uniquement. FCH : plante cultivée dans un mélange de terre et de fumier de cheval. FM : plante cultivée en présence de mélange de terre et de fumier de mouton. Barre d'échelle = 13 cm.

D'une manière générale, l'apport au sol des deux types de fumier, a influencé et a amélioré tous les paramètres de croissance en comparaison avec le sol témoin, soulignant des différences significatives au seuil de 5% de probabilité. Néanmoins, aucune différence significative entre les deux sols fertilisés n'a été enregistrée excepté le système racinaire qui a montré une densité et un allongement appréciables en présence du fumier de mouton.

La disponibilité des éléments minéraux comme le magnésium, le potassium et le calcium dans les amendements organiques, contribue à la formation d'agrégats colloïdaux stables au niveau du sol. Celui-ci serait bien aéré et assurerait un développement favorable des plantes (Azarmi et al., 2009; Chang et al., 2010). Dans la présente étude, nous avons constaté que les engrais organiques (fumiers de mouton ou de cheval) améliorent de manière significative la croissance en hauteur des plantes, optimisent l'apparition des feuilles par plante et avantagent

l'élongation de la tige. En effet, l'ajout du fumier augmente la teneur en macro et micronutriments et entretient les propriétés physico-chimiques du sol, ce qui induirait une meilleure croissance végétative (Adekiya et al., 2020).

Par ailleurs, le développement des racines peut être considérablement influencé par la composition minérale du sol. En effet, notre expérimentation a démontré qu'un sol suffisamment riche en nutriments favorise le développement du système racinaire. Chez le quinoa (*Chenopodium quinoa*), Kakabouki et al. (2019) ont lié le meilleur développement du système racinaire des plantes cultivées dans un sol fertilisé à la présence de teneurs élevées d'azote. De plus, des niveaux supplémentaires d'azote peuvent entraîner une meilleure croissance des feuilles chez de nombreuses espèces de cycadales (Smith, 1978). Gregory (1994) a confirmé que la fertilisation du sol a un impact positif sur la croissance des plantes d'une manière générale. Le fumier de mouton utilisé dans cette étude présentait la teneur en azote la plus élevée ($2,55 \pm 0,01 \%$) (Tab. 5), expliquant ainsi le meilleur développement végétal enregistré.

D'autre part, nous avons relevé l'existence de nodules au niveau des racines de *Cycas revoluta* (figure 36). Ces structures apparaissent en grand nombre chez les plantes cultivées en présence de fumier de mouton (riche en azote), moins chez les plantes avec le fumier de cheval, en nombre réduit chez les plantes témoins. Le développement de ces nodules permettrait un meilleur potentiel de fixation d'azote, ce qui pourrait augmenter l'apport de la plante en celui-ci. D'après Halliday et Pate (1976) et Grove et al. (1980), les cycas s'associent aux cyanobactéries via les racines coralloïdes, cette symbiose serait une source d'azote dont bénéficierait la plante au cours de sa croissance (Dehgan, 1983). La fixation de l'azote par les racines coralloïdes a été estimée entre 18,8 kg N/ha et 35 kg N/ha par an (Smith, 1978). Par ailleurs, des études antérieures ont également montré la présence d'endophytes dans les racines régulières et coralloïdes de *Cycas bifida* (Zheng et al., 2018). Les bactéries endophytes ont été associées à la promotion de la croissance de plusieurs espèces cultivées telles que le maïs (*Zea mays*) (Alkahtani et al., 2020), le blé (*Triticum aestivum*) (Khan et al., 2017), la tomate (*Solanum esculentum*), le piment (*Capsicum annuum*) (Amaresan et al., 2012) et le riz (*Oryza sativa*) (Khan et al., 2020). La croissance des plantes est favorisée par une meilleure acquisition des nutriments, notamment la fixation de l'azote et la production de substances favorisant la croissance des plantes telles que l'acide indole acétique et les cytokinines (Miliute et al., 2015). Il serait donc intéressant d'étudier les structures nodulaires observées chez le cycas.



Figure 36. Plante de *Cycas revoluta* présentant des structures de type globulaire ou des nodules dans la partie souterraine de la plante. (A) Système racinaire de *Cycas revoluta* avec plusieurs structures nodulaires. (B) Touffe de nodules. (C) Nodule isolé présentant un halo bleu-vert qui indique la présence de cyanobactéries. Barre d'échelle = 1 cm.

2.2.2. *Physiologie des plantes en présence des différents apports organiques*

En réponse aux traitements appliqués au milieu de culture, les plants de *Cycas revoluta* ont simulé des changements sur le plan morphologique et certainement sur le plan biochimique. C'est dans ce contexte que la suite de notre étude portera sur l'analyse de la composition chimique de la partie aérienne et des racines, du taux de chlorophylle et de la fluorescence chlorophyllienne.

2.2.2.1. Teneurs en chlorophylles

La chlorophylle est un pigment nécessaire à la photosynthèse, présent chez tous les organismes végétaux chlorophylliens. Sous l'effet de la lumière et d'autres facteurs environnementaux tels que la température, elle se décompose facilement. Nous avons estimé les teneurs en chlorophylles **a** et **b** et en chlorophylle totale (**a+b**) dans les feuilles de *Cycas revoluta* cultivés dans les trois conditions : sol non amendé, sol enrichi de fumier de cheval ou de mouton.

2.2.2.1.1. Chlorophylles a, b et totale

Le protocole préconisé pour l'extraction des chlorophylles a permis de déterminer la teneur des chlorophylles **a**, **b** et totale (**a+b**) (Tab. 12). L'examen des résultats a révélé que quelle que soit la nature du fumier apporté, il y a eu une accumulation du taux des pigments chlorophylliens chez les plants de cycas cultivés sur les sols amendés comparativement aux teneurs enregistrées chez les plantes témoins. En effet, une augmentation moyenne de 2,52 mg/g MF et 2,42 mg/g MF de la teneur en chlorophylle **a** a été enregistrée, respectivement avec l'application de fumier de cheval et de fumier de mouton.

Tableau 12. Effet des amendements organiques sur les taux de chlorophylle a, b et totale. Les valeurs sont moyennes \pm SD d'au moins douze répétitions indépendantes. Pour chaque paramètre, les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

	Chlorophylle a (mg/g MF)	Chlorophylle b (mg/g MF)	Chlorophylle totale (mg/g MF)
Sol agricole	5.03 \pm 0.74 (b)	8.48 \pm 0.52 (b)	169.80 \pm 11.98 (b)
Sol+Fumier de cheval	7.56 \pm 0.84 (a)	12.10 \pm 0.63 (a)	243.46 \pm 23.80 (a)
Sol+ Fumier de mouton	7.45 \pm 0.75 (a)	13.10 \pm 0.17 (a)	251.02 \pm 25.14 (a)

Une tendance similaire a également été observée avec les teneurs en chlorophylle **b**, inscrivant les valeurs respectives de 3,62 mg/g MF et 4,62 mg/g MF. Bien que cette hausse ne soit pas assez importante, elle s'annonce significative selon l'analyse statistique des moyennes. Par contre, sur un sol riche en nutriments organiques, les teneurs en chlorophylle totale ont vivement augmenté, soient 73,66 mg/g MF et 81,22 mg/g MF, enregistrées respectivement suite à l'application du fumier de cheval et du fumier de mouton. Cette augmentation a été estimée respectivement à 43,38% et 47,83% par rapport au sol témoin. Comme le montrent les résultats obtenus, l'addition du fumier de mouton au sol de culture est associée à une élévation significative des taux des chlorophylles **a**, **b** et **a+b** par rapport aux

taux témoins. Il faut noter, cependant, que les différences observées entre les deux types de fumiers restent statistiquement insignifiantes.

2.2.2.1.2. Fluorescence chlorophyllienne

Afin d'étudier l'efficacité du système photosynthétique des feuilles des plants de *Cycas revoluta*, différents paramètres sont suivis en tant que bio-indicateurs potentiels de la qualité du sol. Les réponses aux apports de fumiers relatives à la capacité photosynthétique des plantes de cycas sont reportées sur la figure 37. Les mesures de la fluorescence chlorophyllienne telles que le rapport F_v/F_o et F_v/F_m , nous indiquent respectivement l'activité potentielle et le rendement quantique photochimique maximal du PSII. L'activité potentielle (F_v/F_o) ou la production primaire maximale du photosystème II caractérise le rendement quantique potentiel du photosystème II, permettant, ainsi, d'estimer la capacité des feuilles à réaliser la photosynthèse. Le ratio F_v/F_m ou l'efficacité photochimique maximale du PSII traduit l'efficacité du PSII à utiliser la lumière pour la conversion photochimique. Ces deux paramètres fournissent une image claire quant à l'état de santé de la plante et permettent de détecter le stress et les carences en éléments nutritifs. L'amendement du sol en fumier de mouton n'a eu aucun effet significatif sur la fluorescence chlorophyllienne des feuilles en comparaison avec le sol témoin.

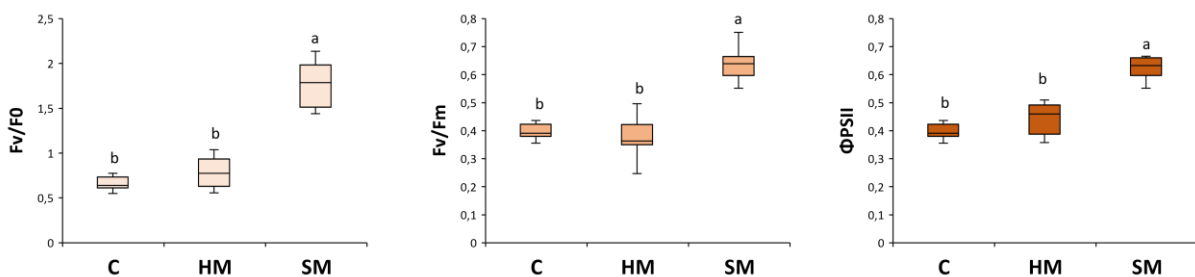


Figure 37. Effet des amendements organiques sur la fluorescence chlorophyllienne des plantes de *Cycas* cultivées en présence des différents amendements organiques (C : contrôle, FCH: fumier de cheval et FM: fumier de mouton). (A) Activité potentielle du PSII, (B) Rendement quantique photochimique maximal du PSII et (C) Rendement quantique maximal. Les valeurs sont moyennes \pm SD d'au moins douze répétitions indépendantes. Pour chaque paramètre, les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

En revanche, nous avons noté une interaction positive et significative entre l'efficacité photosynthétique du PSII et le traitement du sol au fumier de mouton. Par ailleurs, comme nous pouvons le constater, l'apport en fumier de mouton a permis d'avoir un rendement quantique maximal Φ_{PSII} (paramètre traduisant l'efficacité du PSII à utiliser l'énergie lumineuse et la transformer en énergie chimique) beaucoup plus élevé que celui enregistré en

sol témoin ou en mélange sol - fumier de cheval. L'interaction fumier de mouton - Φ PSII illustre un effet significatif alors que l'apport en fumier de cheval ne présente aucune différence significative relative à la fluorescence chlorophyllienne des feuilles du *Cycas*.

Il est bien établi que les engrais organiques influencent la croissance et le développement des plantes, en améliorant les propriétés physico-chimiques du sol et la disponibilité des nutriments (Eneji et al., 2001; Azarmi et al., 2009; Osama et al., 2016) ce qui affecterait directement le processus de photosynthèse (Osama et al., 2016). De nombreuses études menées sur diverses espèces végétales telles que la canne à sucre (*Saccharum officinarum*), le soja (*Glycine max*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et le kiwi (*Actinidia délicieux*) ont souligné l'effet positif des amendements organiques sur la teneur en chlorophylle (Ghosh et al., 2004; Bokhtiar et Sakurai, 2005; Najm et al., 2012; Sharma et al., 2022). Sharma et al. (2022) ont associé ces effets bénéfiques sur les propriétés photosynthétiques à la présence de quantités élevées d'azote conférées par l'apport du fumier organique. Moriwaki et al. (2019) ont expliqué l'effet positif de l'azote sur les attributs photosynthétiques (rendement quantique photosynthétique) par l'augmentation de la densité des thylakoïdes, qui peut améliorer l'absorption de la lumière. A propos de *Cycas revoluta*, nous avons constaté que les engrais organiques, plus précisément le fumier de mouton, améliorent significativement les attributs photosynthétiques des plantes (F_v / F_m et Φ PSII). Cela peut probablement être attribué à la teneur élevée en azote du fumier de mouton ainsi qu'à la présence d'un grand nombre de nodules au niveau des racines coralloïdes.

2.2.2.2. Composition en éléments nutritifs des feuilles et des racines

L'analyse chimique des racines des plantes cultivées sur sol + fumier de cheval a montré une augmentation de la concentration en potassium de 51%, en sodium de 30% et en phosphore de 9% par rapport au sol non amendé avec une augmentation significative uniquement pour le potassium. En revanche, la concentration en fer a légèrement diminué de 5%, celle en azote a baissé de 18% et le zinc a fortement chuté de 73,5%, cette dernière diminution étant hautement significative (Tab. 13). Dans le même contexte, l'ajout du fumier de cheval au substrat de culture a induit une augmentation importante de la teneur en potassium des feuilles qui a atteint des valeurs de 4 et 2 fois celles des feuilles témoins et des plantes cultivées sur le sol-fumier de mouton. Cette distinction serait attribuée à la richesse du fumier de cheval en potassium (Tab.5).

Tableau 13. Composition en certains éléments nutritifs des feuilles et des racines de plants de *Cycas revoluta* dans le sol amendé ou pas. Les valeurs sont moyennes \pm SD d'au moins douze répétitions indépendantes. Pour chaque paramètre, les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

		Azote (%)	Phosphore (%)	Sodium (%)	Potassium (%)	Fer (mg/Kg)	Cuivre (mg/Kg)	Zinc (mg/Kg)
Racine	Sol agricole	1,75 \pm 0,09 (a)	0,33 \pm 0,05 (a)	1,50 \pm 0,36 (a)	4,55 \pm 0,15 (cd)	11,56 \pm 0,21 (a)	46,33 \pm 2,08 (d)	338,66 \pm 9,08 (a)
	Sol+Fumier de cheval	1,44 \pm 0,09 (c)	0,36 \pm 0,08 (a)	1,95 \pm 0,26 (a)	11,42 \pm 1,11 (b)	10,99 \pm 0,38 (ab)	49,83 \pm 2,83 (d)	89,90 \pm 3,34 (d)
	Sol+Fumier de mouton	1,60 \pm 0,14 (ab)	0,43 \pm 0,08 (a)	4,03 \pm 0,77 (b)	15,02 \pm 2,18 (a)	11,15 \pm 0,52 (ab)	47,50 \pm 3,44 (d)	168,0 \pm 15,93 (c)
Feuille	Sol agricole	1,19 \pm 0,07 (d)	0,43 \pm 0,05 (a)	1,12 \pm 0,13 (a)	4,55 \pm 0,05 (cd)	7,92 \pm 0,72 (cd)	67,0 \pm 2,00 (bc)	282,50 \pm 4,5 (b)
	Sol+Fumier de cheval	1,01 \pm 0,11 (de)	0,38 \pm 0,09 (a)	1,40 \pm 0,20 (a)	10,50 \pm 1,21 (b)	8,12 \pm 0,59 (c)	85,00 \pm 3,60 (a)	166,33 \pm 18,55 (c)
	Sol+Fumier de mouton	1,77 \pm 0,18 (a)	0,35 \pm 0,05 (a)	2,31 \pm 0,10 (a)	2,68 \pm 0,08 (d)	7,02 \pm 0,37 (d)	61,00 \pm 1,82 (c)	245,50 \pm 24,49 (b)

Relativement à l'amendement en fumier de mouton, nous avons observé une accumulation des éléments nutritifs dans les racines. En effet, ces dernières ont concentré significativement le potassium et le sodium dont la teneur ainsi que celle du phosphore et du cuivre, a respectivement augmenté de 230%, 168,5%, 30%, et 3%. Toutefois, l'azote et le fer ont montré une réduction non significative de 8,5% et 3,5%, bien que la concentration en zinc ait été réduite de moitié, une baisse qui s'est avérée significative

Comme le montre le tableau 13, la présence du fumier de mouton dans le sol a augmenté la quantité d'azote dans les feuilles des plants de cycas par rapport au témoin et au sol ayant reçu le fumier de cheval. Cette amélioration n'est pas très considérable mais elle est significative d'autant plus que les plantes sujettes à ce traitement ont connu une croissance et un développement appréciable. Cependant, une augmentation intéressante et significative de la teneur en K dans les feuilles a été détectée avec l'ajout de fumier de cheval. De même, les teneurs des feuilles en chlorophylles (**a**, **b** et **a+b**) s'accroissent en association avec l'application du fumier de cheval ou de mouton mais il convient de noter que l'apport du fumier de mouton optimise les paramètres photosynthétiques. Ceci est corroboré par l'analyse statistique qui indique également un effet significatif de l'application du fumier de mouton.

La fertilisation organique affecte les concentrations et l'assimilation par les végétaux, de plusieurs macroéléments tels que l'azote, le potassium et le phosphore, indépendamment du système d'irrigation (Yang et al., 2004). L'augmentation de la concentration de K résultant de l'ajout de matière organique pourrait être attribuée à la concentration de ce macroélément dans les engrais organiques (tableau 1), comme indiqué précédemment pour *Zea mays* (Aziz et al., 2010) et *Brassica juncea* (Aziz et al., 2006).

A l'issue des résultats obtenus antérieurement, il s'est avéré que la croissance et le développement des plantes de *Cycas revoluta* sont influencés par l'apport des éléments minéraux. L'analyse de corrélation de Pearson (Fig. 38) a permis de déterminer la relation entre les paramètres morphologiques, biochimiques et physiologiques.

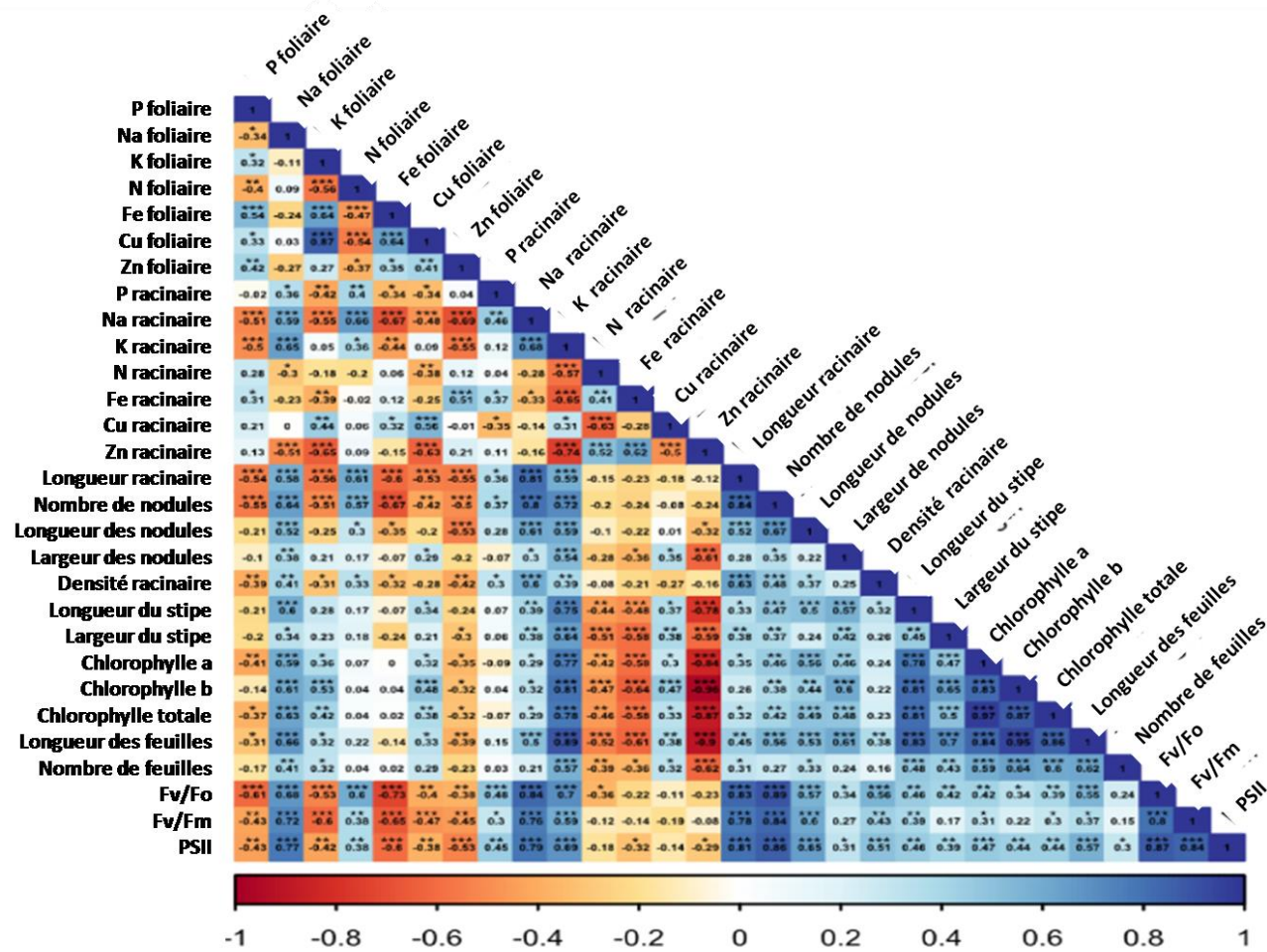


Figure 38. Corrélogramme montrant les corrélations entre les différents paramètres analysés. L'échelle en bas et les valeurs à l'intérieur des colonnes indiquent la valeur de corrélation de Pearson (>0 = corrélée positivement, <0 = corrélée négativement). L'intensité de la couleur bleu/rouge dans le graphique augmente avec le niveau de corrélation positive/négative.

L'indice de corrélation de Pearson r , renseigne sur l'intensité et la direction de la corrélation. Ainsi, une forte relation positive et significative existe entre la teneur en potassium des racines et le nombre de feuilles ($r = 0,89$); la teneur en chlorophylle **a** ($r = 0,77$), en chlorophylle **b** ($r = 0,81$) et en chlorophylle totale **a+b** ($r = 0,78$); la largeur du stipe ($r = 0,75$); le nombre de nodules au niveau des racines ($r = 0,72$), leur largeur ($r = 0,59$) et leur longueur ($r = 0,54$). Sur le même corrélogramme, nous remarquons que la quantité de sodium dans les racines, quelle que soit la nature du fumier utilisé, est également positivement corrélée aux attributs photosynthétiques, plus précisément avec F_v / F_0 ($r=0,84$), F_v / F_m ($r=0,76$) et PS_{II} ($r=0,79$) (Fig. 43). Il est intéressant de noter qu'il existe de fortes à très fortes corrélations négatives entre la quantité de zinc dans les racines et la largeur ($r = -0,59$), la longueur de la tige ($r = -0,78$), la longueur des feuilles ($r = -0,9$), la chlorophylle a ($r = -0,84$), la chlorophylle b ($r = -0,96$) et la teneur en chlorophylle totale ($r=-0,87$).

L'analyse en composantes principales (Principal Component Analysis ou PCA) a permis de déterminer les paramètres responsables de la variabilité observée. Cette analyse statistique permet de réduire la dimensionnalité des données tout en préservant au maximum leur variabilité. Ainsi, elle transforme un ensemble de variables interdépendantes en un nouvel ensemble de variables indépendantes, appelées composantes principales. La figure 39 montre les résultats obtenus. L'analyse en composantes principales a permis de visualiser la distribution des variables sur le plan bidimensionnel (Dim 1 et Dim 2). Les variables représentées dans ces deux dimensions expliquent 66,9% de la variabilité, avec 42,6 % et 24,3 % des variances prises en compte respectivement pour la première et la deuxième composante principale. La première composante principale compte plus d'attributs que la seconde. Il ressort également de cette analyse que, l'application du fumier de mouton affecte de manière significative la croissance des racines (longueur de la racine principale), le nombre de nodules, les attributs photosynthétiques (F_v/F_0 , PS_{II} , F_v/F_m) ainsi que la teneur en sodium au niveau racinaire, tandis qu'une grande variabilité a été observée dans la teneur en cuivre au niveau des feuilles et des racines suite à l'application du fumier de cheval.

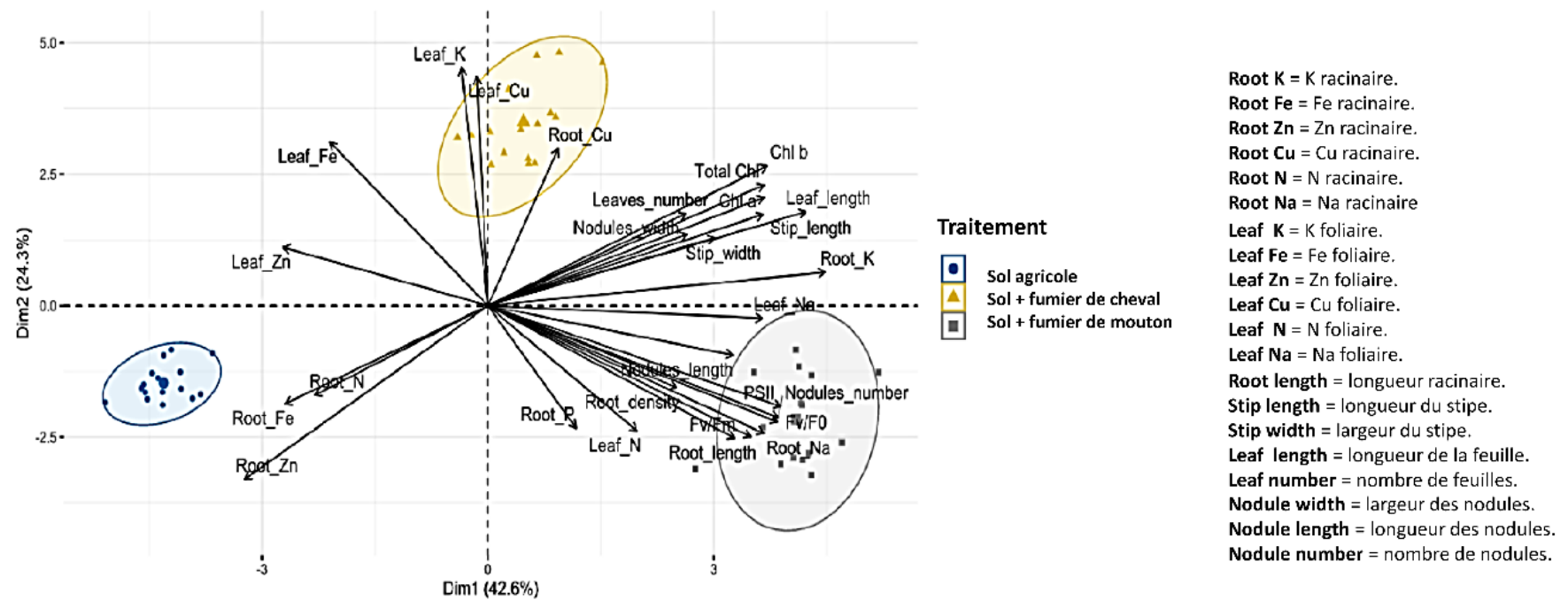


Figure 39. Analyse en composantes principales (ACP) des paramètres utilisés pour évaluer l'effet de l'application des différents amendements organiques sur la croissance du *Cycas revoluta*. Les observations sont représentées avec un symbole et une couleur propre pour chaque traitement appliqué (Témoin "Control", Fumier de cheval "Horse Manure", Fumier de mouton "Sheep Manure").

3. Microflore de *Cycas revoluta*

Les cycas forment des associations bénéfiques avec certains micro-organismes. En effet, ils ont la capacité d'établir des interactions symbiotiques avec des bactéries du sol notamment les bactéries endophytes et cyanobactéries. Ces associations sont essentielles pour la croissance des plantes, permettant des échanges bénéfiques tels que la fixation de l'azote et la promotion de la croissance de plantes.

3.1. Isolement et identification des cyanobactéries associées au *Cycas revoluta*

L'observation au microscope photonique et au grossissement x400 a montré que toutes les souches présentaient une structure particulière, en colonies agencées de manière précise, dites colonies filamenteuses ou trichomes filamenteux, regroupées dans une gaine mucilagineuse (Fig. 40). Nous avons noté dans certains cas, la formation de connexions entre les trichomes. L'ensemble de ces souches montraient une couleur bleu-verte caractéristique, due à leur teneur en phycocyanine, pigment responsable de la couleur bleu-verte caractéristique des cyanobactéries. Ce pigment confère à ces bactéries la capacité de photosynthèse oxygénique.

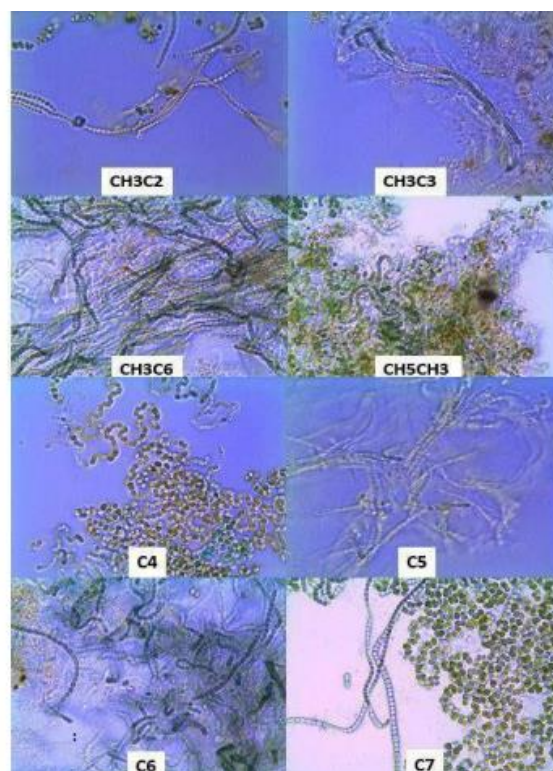


Figure 40. Observation microscopique des huit isolats CH3C2, CH3C3, CH3C6, CH5CH3, C4, C5, C6 et C7 isolés à partir des racines coralloïdes du *Cycas revoluta*. Les observations microscopiques ont été réalisées moyennant un microscope optique au grossissement (x400).

3.1.1. Caractérisation moléculaire des isolats de cyanobactéries

L'étude de la diversité génétique entre les 8 isolats issus de nodosités des racines coralloïdes de *Cycas revoluta* a été réalisée en utilisant les amorces REP pour étudier la variabilité intra-spécifique des souches.

3.1.1.1. Analyse de la diversité intra-spécifique par la rep-PCR

L'amplification des séquences répétitives de l'ADN génomique des souches avec les amorces REP nous a permis de détecter les variations génétiques au niveau chromosomique. Les résultats du dendrogramme obtenus en utilisant l'algorithme de classification UPGMA ont révélé une diversité minimale entre les isolats. En effet, le dendrogramme montre l'existence de quatre profils génétiques distincts, dont un particulièrement dominant chez la majorité des isolats (Fig. 41).

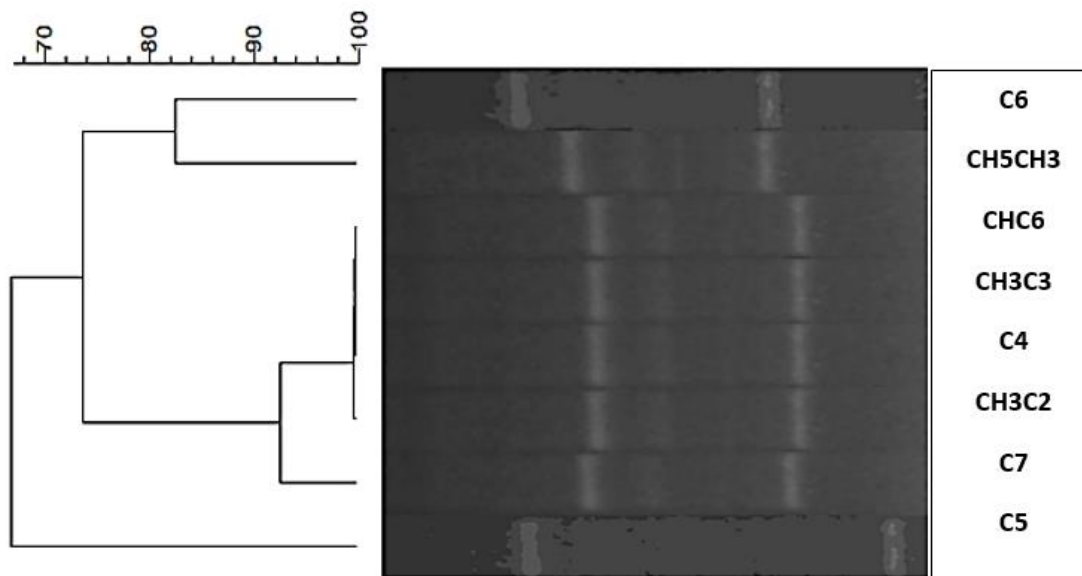


Figure 41. Dendrogramme (UPGMA) illustrant les relations génétiques résultant de l'analyse par Rep-PCR des huit souches des cyanobactéries isolées des racines coralloïdes du *Cycas revoluta*.

Sur la base des résultats de l'étude de la diversité intra-spécifique des souches de cyanobactéries par Rep-PCR, on peut classer les souches étudiées en quatre groupes (Tab. 14).

Tableau 14. Classification des souches cyanobactériennes selon la rep-PCR.

Groupes	Souches
Groupe 1	CH3C2, CH3C3, CH3C6, C4 et C7.
Groupe 2	CH5CH3
Groupe 3	C5
Groupe 4	C6

3.1.1.2. Amplification du gène ARNr 16S

Après l'étude de la diversité des souches par la rep-PCR, nous avons procédé à l'amplification de l'ARNr 16S des souches. En effet, toutes les souches présentent une bande d'environ 1500 pb (Fig. 42) qui correspond au gène 16S.

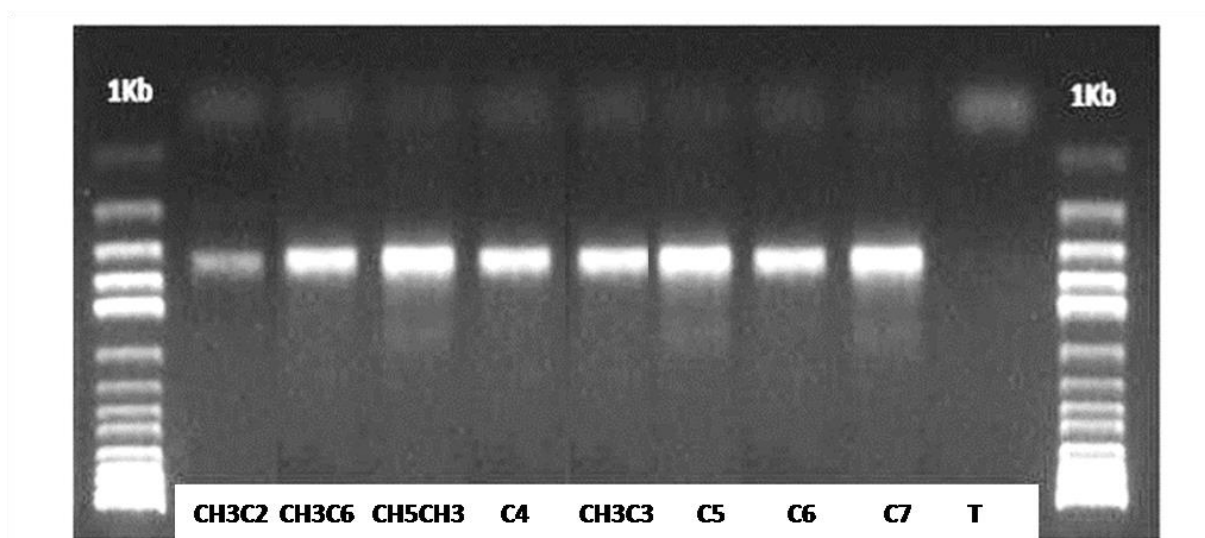


Figure 42. Electrophorèse des profils de l'ARNr 16S des souches étudiées. L'électrophorèse a été réalisée sur un gel d'agarose à 2%. Le marqueur de poids moléculaire de 1Kb a été utilisé pour la détermination de la taille des fragments amplifiés.

3.1.1.3. Séquençage du gène de l'ARNr 16S

L'analyse des séquences de l'ADN ribosomal 16S (ARNr) est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'étude de la diversité bactérienne et ce, grâce à ses domaines hautement conservés (Soe et *al.*, 2020).

L'analyse des séquences de l'ARNr 16S de toutes les souches a montré leur appartenance à l'ordre des *Nostocales*, famille des *Nostocacées*. Selon la base de données GenBank, Le BLASTN de la séquence d'ARNr 16S de la souche CH3C2 a montré une similitude de 99,39% aux espèces *Desmonostoc persicum* et *Desmonostoc lechangense*. Tandis que les 6 souches CH3C6, CH3C3, CH5CH3, C4, C5 et C7 présentent des pourcentages de similitude de 99,70%, 99,65%, 99,39%, 99,24%, 98,65% et 99,55% respectivement par rapport à l'espèce *D. persicum*, la souche C6 présente un pourcentage de similitude de 98,45% par rapport à l'espèce *D. lechangense*. L'arbre phylogénétique basé sur la méthode NJ comprend l'ensemble des séquences, en plus des séquences de références récupérées par BLASTN, ainsi que toutes les espèces du genre *Desmonostoc* décrites sur LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature). L'analyse a permis de regrouper nos souches dans le même cluster, fortement lié aux espèces du genre *Nostoc commun* isolées à partir de biofilm à la surface d'une roche siliceuse en Australie et *Nostoc edaphicum* isolée d'eau de mer superficielle en Pologne (Fig. 43).

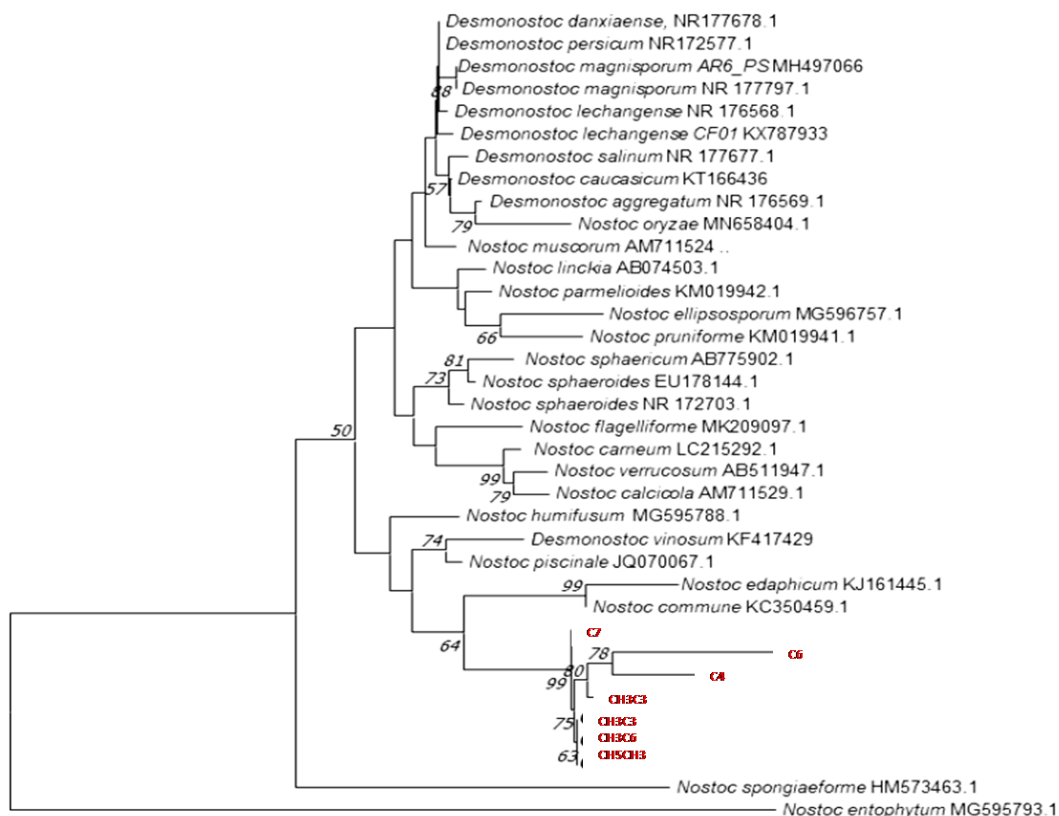


Figure 43. L'arbre phylogénétique NJ (Neighbor-Joining) basé sur les séquences de l'ARNr 16S (727pb) montrant la position des isolats étudiés par rapport aux espèces du genre *Nostoc* et *Desmonostoc*, avec le test boopstrap (1000 répliants).

3.1.2. Production des polysaccharides

Les polysaccharides (PS) sont des molécules de très haut poids moléculaire composées de plusieurs oses reliés les uns aux autres par des liaisons osidiques. Ces molécules d'origines diverses, sont présentes chez tous les organismes vivants : animaux, plantes supérieures incluant les macroalgues, les microalgues, les champignons et les bactéries. Les PS suscitent l'intérêt d'une grande communauté scientifique pour leurs propriétés fonctionnelles, que ce soit en tant qu'agents de texture ou plus récemment en tant qu'actifs biologique. Ces facultés leurs ont permis d'être exploités dans divers domaines industriels tels que l'agroalimentaire, l'industrie pharmaceutique et la cosmétique (Gaignard, 2019).

La production des polysaccharides chez les huit isolats varie entre 4,06g/L et 2,06g/L (Fig. 44). La plus forte teneur est observée chez la souche CH3C6 (4,06 g/L) suivie des souches CH5CH3, C5 et C6 qui montrent une production polysaccharidique de 4,01 g/L, 3g/L et de 3,53 g/L respectivement. Tandis que les souches CH3C2, CH3C3, C4 et C7 produisent une quantité inférieure à 2,06 g/L.

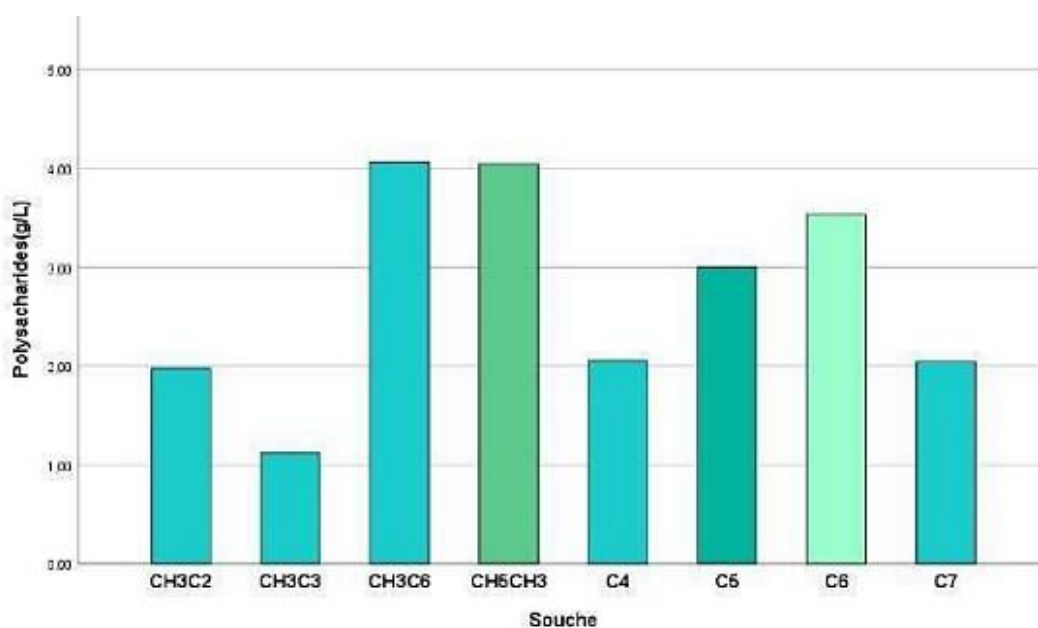


Figure 44. Production de polysaccharides de huit souches isolées de cyanobactéries. La production de polysaccharides a été estimée pour chaque souche de cyanobactéries en g/L.

Les cyanobactéries sont capables de produire des polysaccharides (PS), qui sont des polymères complexes jouant un rôle dans la protection et l'adhésion du micro-organisme. La production de ces molécules à haute valeur ajoutée est influencée par plusieurs facteurs, en particulier, la présence d'azote, la carence en phosphore, l'augmentation de la concentration en NaCl, la température, le flux d'air continu, l'intensité lumineuse et la présence de certains

produits chimiques tels que le glycoxylate, le glucose et le citrate (Pereira et al., 2009). La production des EPSs par le genre *Cyanothece* a atteint 1.3g/L/j lorsqu'elle est cultivée dans un milieu riche en boue marine. D'autres études ont rapporté des teneurs plus faibles en EPSs, de l'ordre de 30 mg/L/j et 290 mg/L/j produites par *Nostoc* sp. PCC8109 et *Arthrospira platensis* respectivement (Diogo Cruz et al., 2023 ; Cruz et al., 2020). Dans la présente étude, les quantités d'EPSs produites par les différentes souches de cyanobactéries isolées des racines de *Cycas* montrent une grande variabilité. Des teneurs élevées en EPSs sont enregistrées avec les souches CH3C6 et CH5CH3, montrant ainsi le potentiel de ces deux souches de cyanobactéries occupant les racines coralloïdes du *Cycas revoluta*.

3.2. Isolement et identification des bactéries endophytes associées au *Cycas revoluta*

3.2.1. Identification des souches bactériennes par séquençage

La quantification et l'analyse de l'ADN extrait des vingt souches par le Nanodrop montre que l'ADN extrait est de bonne qualité. Les rapports de la densité optique DO_{260} / DO_{280} et DO_{260} / DO_{230} donnent respectivement des valeurs comprises entre 1,8 - 2 et 2 - 2,2.

L'amplification du gène ribosomique de l'ADNr 16S et la migration sur gel a montré la présence d'une bande unique dont la taille a été comparée visuellement au marqueur de taille (2Kb) et a enregistré une valeur approximative de 1500pb, chez l'ensemble des vingt souches isolées (Fig. 45).

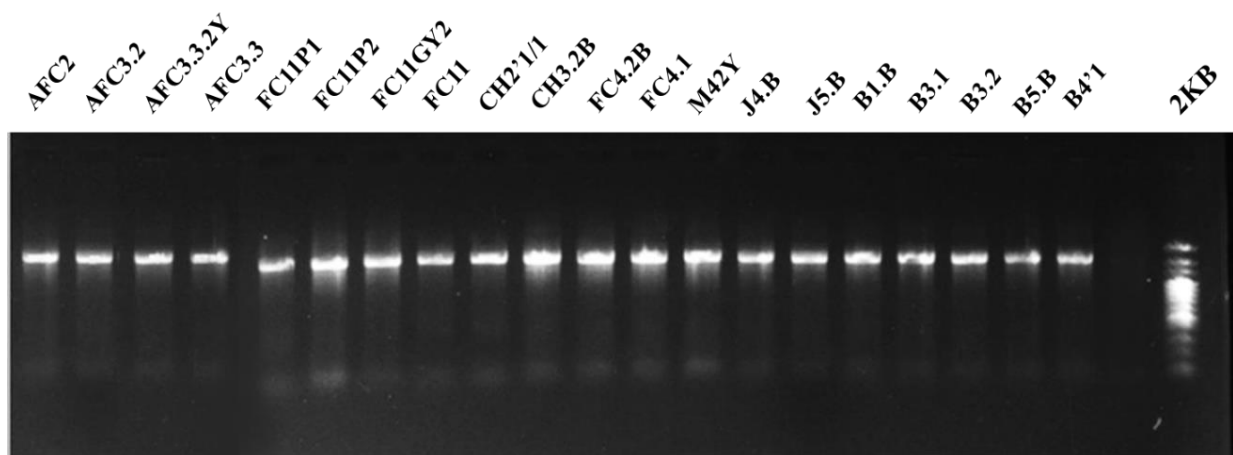


Figure 45. Electrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR obtenus par amplification du gène ADNr16S pour les vingt souches étudiées. La migration a été réalisée sur un gel d'agarose à 2%. Les bandes latérales (à droite) correspondent au marqueur de taille utilisé (2Kb).

L'identification taxonomique des isolats bactériens endophytes est déterminée en comparant la séquence du gène de l'ADNr 16S de chaque isolat avec différentes souches obtenues à partir de la base de données NCBI. La comparaison des séquences obtenues avec les séquences de référence répertoriées dans la base de données NCBI a permis la détermination de l'appartenance des 20 souches isolées aux genres *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Brucella*, *Cytobacillus* et *Peribacillus*, soulignant ainsi la grande diversité bactérienne associée au *Cycas revoluta* (Tab. 15).

Tableau 15. Identification moléculaire des vingt isolats étudiés par comparaison de la séquence de l'ADNr16S de chaque isolat avec les différentes souches répertoriées dans la base de données NCBI.

Code	Espèce	% de similitude	Numéro d'accension
LMR-C1	<i>Agrobacterium tumefasciens</i>	97.079%	PP218348
LMR-C4	<i>Pseudomonas sp.</i>	100%	PP229941
LMR-C5	<i>Bacillus sp.</i>	99.21%	PP229942
LMR-C6	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	100%	PP229943
LMR-C7	<i>Pseudomonas sp.</i>	100%	PP229944
LMR-C9	<i>Brucella sp</i>	100%	PP218349
LMR-C11	<i>Bacillus sp.</i>	100%	PP229945
LMR-C13	<i>Pseudomonas sp.</i>	100%	PP229946
LMR-C14	<i>Bacillus sp.</i>	98.02%	PP229947
LMR-C62	<i>Pantoea sp.</i>	100%	PP229948
LMR-C18	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	100%	PP229949
LMR-C20	<i>Bacillus sp.</i>	98.33%	PP229950
LMR-C29	<i>Cytobacillus sp.</i>	100%	PP229951
LMR-C36	<i>Peribacillus sp.</i>	97.98%	PP229952
LMR-C38	<i>Agrobacterium sp</i>	100%	PP229953
LMR-C39	<i>Enterobacter sp.</i>	98.29%	PP229954
LMR-C45	<i>Peribacillus sp.</i>	97.59%	PP229955
LMR-C47	<i>Paenibacillus sp.</i>	97.19%	PP229956
LMR-C48	<i>Peribacillus sp.</i>	97.26%	PP229957
LMR-C51	<i>Bacillus sp.</i>	97.88%	PP229958

3.2.2. Évaluation des activités PGP des bactéries isolées des racines de *Cycas revoluta*

3.2.2.1. Activités PGP en conditions normales

3.2.2.1.1. Synthèse d'auxine

La capacité des souches étudiées à synthétiser l'AIA est testée dans le milieu YEM additionné de tryptophane. Les résultats ont montré que le taux de synthèse d'AIA le plus élevé a été enregistré chez la souche *Pantoea sp.*(M42Y) et la souche *Bacillus sp.* (B32) avec les valeurs respectives de 48.3 µg/ml et 41,80 µg/ml. Les souches *Agrobacterium tumefaciens* (LMR-C1), *Bacillus sp.*(AFC33) et *Pseudomonas sp.*(AFC2) ont montré des valeurs moyennes de 15,03 µg/ml; 15,58 µg/ml et 19,55µg/ml respectivement. Par contre, les souches restantes ont produit une faible quantité d'AIA qui n'a pas dépassé 10µg/ml (Fig. 46).

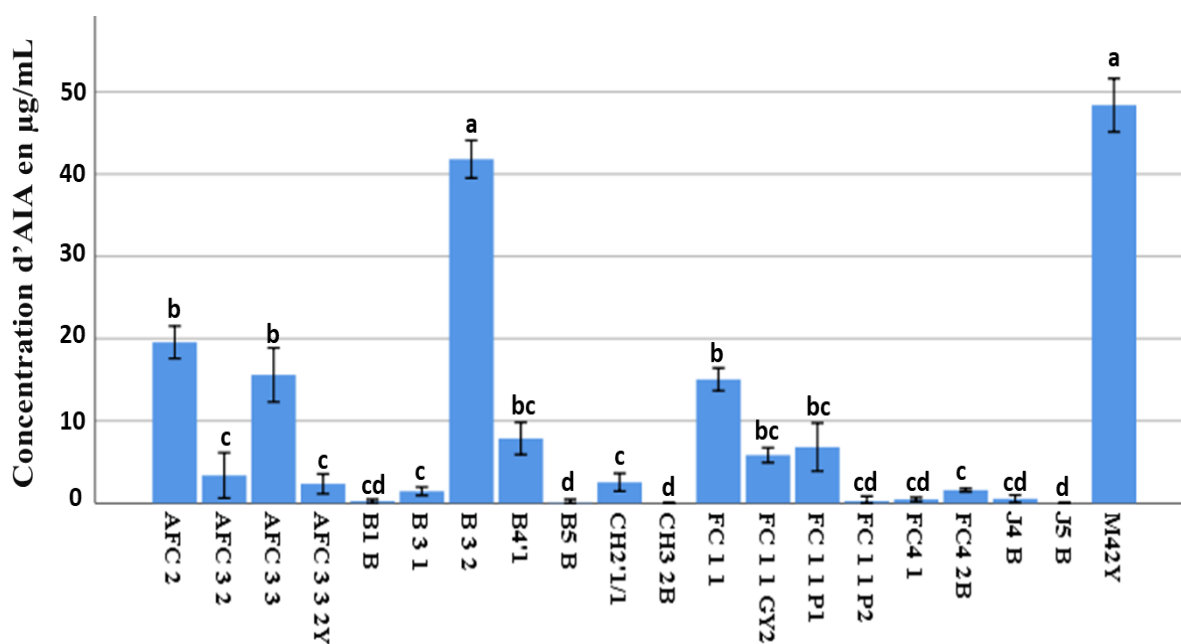


Figure 46. Production d'AIA par les vingt souches étudiées estimée en µg/ml. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches étudiées.

L'acide indole-3-acétique (AIA) joue un rôle capital dans la croissance et le développement des végétaux. Plusieurs micro-organismes associés aux plantes produisent l'AIA en utilisant le tryptophane comme précurseur. Cette production peut varier d'une bactérie à l'autre ainsi que chez les souches appartenant à la même espèce (Duca et al., 2014). Dans notre étude, le taux le plus élevé de production d'AIA a été enregistré par la souche *Pantoea sp.*(M42Y), soit 48,38µg/ml. Un résultat similaire a été avancé par Pang et al. (2022), montrant la capacité de cette souche à produire de l'AIA avec des valeurs comprises entre 52,48µg/ml et 156µg/ml.

Par ailleurs, la souche du genre *Bacillus sp.* (B32), a occupé le deuxième rang enregistrant une teneur en AIA de 41,80 µg/ml. Une étude réalisée par Wagi et Ahmed (2019) sur *B. cereus* et *B. subtilis* en présence de tryptophane a montré la capacité de ces isolats à produire l'AIA avec des valeurs de 35,8 et 36,6µg/ml respectivement. Une autre étude réalisée par Ahmed et Hasnain en 2010 a démontré que la souche *B. flexus* a été capable de produire l'AIA avec une concentration de 59µg/ml.

3.2.2.1.2. Production des sidérophores

Les résultats du test quantitatif de sidérophores effectué dans le milieu liquide Modi ont montré que la majorité des souches étudiées avaient la capacité de produire des sidérophores. Les souches *Bacillus sp.* (FC11P1), *Pseudomonas sp.*(FC11P2) et *Bacillus sp.*(AFC332Y) étaient les plus performantes, elles ont enregistré les pourcentages de production les plus élevés avec des valeurs respectives de 83,69%, 72,26% et 71,03%. Les souches restantes ont présenté un taux de production compris entre 20% et 60% alors que la production de sidérophores la plus faible a été observée chez les souches *Bacillus sp.*(AFC33) et *Peribacillus sp.* (B4'1) annonçant des taux respectifs de 0 et 0,26% (Fig. 47).

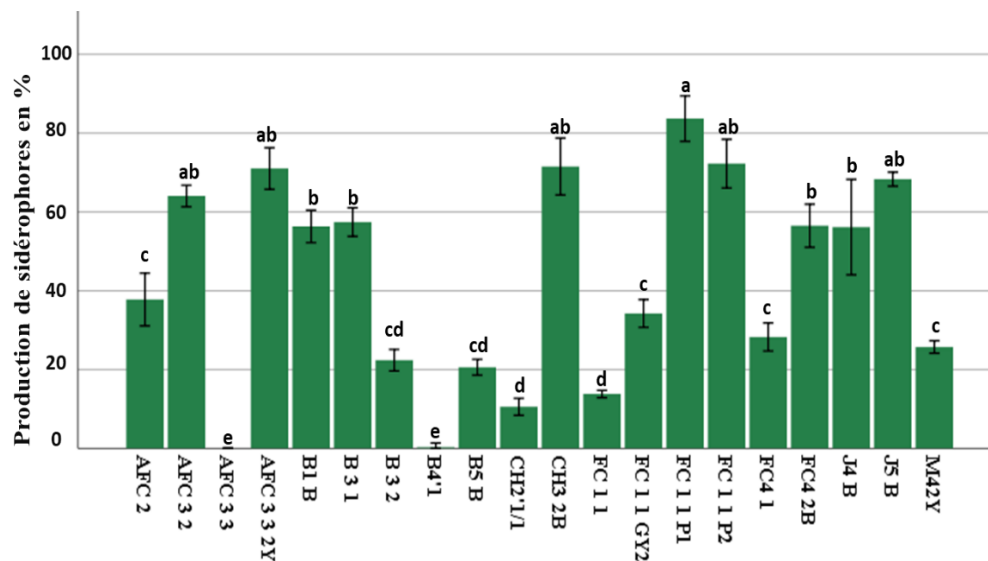


Figure 47. Pourcentage de production des sidérophores par les vingt souches étudiées. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches traitées.

Les sidérophores chélateurs de fer, sont excrétés par les micro-organismes notamment les bactéries et jouent un rôle important dans la promotion de croissance des plantes ainsi que dans la lutte biologique contre divers pathogènes (Sinha et Parli, 2020). Plusieurs études ont démontré que les bactéries du genre *Pseudomonas sp.* et *Bacillus sp.* sont parmi les meilleurs

producteurs de sidérophores. Dans notre étude, nous avons constaté que les souches *Pseudomonas sp.* (FC11P2) et *Bacillus sp.* (AFC332Y) révèlent la meilleure production de sidérophores par rapport à l'ensemble des souches étudiées. Nos résultats corroborent ceux de Ghazy et El-Nahrawy (2021) qui ont rapporté que les souches *P. koreensis* et *B. subtilis* ont la capacité de produire les sidérophores. La même confirmation a été démontrée chez *P. koreensis* par Gu et al. (2020).

3.2.2.1.3. Solubilisation de phosphate

Les vingt souches sont testées pour leur capacité à solubiliser le phosphate en milieu PVK liquide contenant la roche phosphatée innée comme seule source de phosphate. Cette capacité a été plus prononcée chez les souches *A. tumefasciens* (FC11), *Paenibacillus sp.* (FC11GY2) et *Bacillus sp.* (FC11P1) avec des valeurs respectives de 123,07µg/ml, 112,77µg/ml et 112,54µg/ml. Cependant, les souches *Pseudomonas sp.* (FC11P2), *Peribacillus sp.* (J4B) et *Brucella sp.* (CH32B) ont enregistré les valeurs les plus basses, soit 2,51µg/ml, 7,20µg/ml et 8,48µg/ml respectivement (Fig. 48).

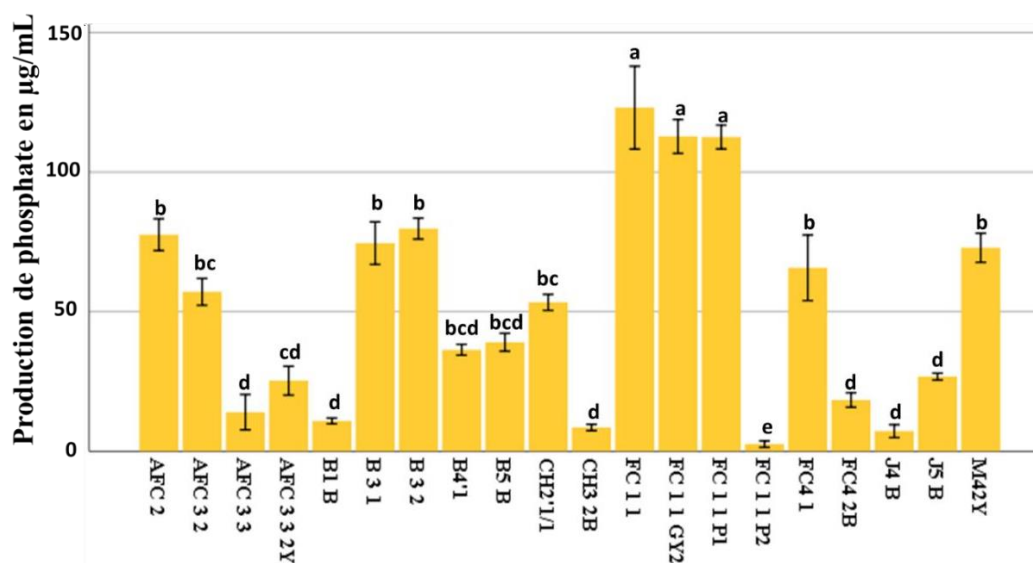


Figure 48. Quantité de phosphate solubilisée par les vingt souches étudiées en µg/ml. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches traitées.

Le phosphore (P) est l'un des éléments essentiels dans la nutrition des plantes. D'après Otieno et al. (2015), il existe une relation antagoniste entre le pH et la concentration en acides organiques produits par les PSB, l'augmentation de l'un induit la diminution de l'autre. En effet, une baisse de pH est due essentiellement à la production d'acides organiques par les PSB, ce qui entraîne une augmentation de la quantité de P libérée par les bactéries accompagnées par la production d'acide gluconique. Dans notre cas, la solubilisation

importante de phosphate inorganique enregistrée chez les souches *A. tumefaciens* (FC11), *Peribacillus sp.* (FC11GY2) et *Bacillus sp.* (FC11P1) a été accompagnée par une diminution du pH du milieu (Fig. 49) confirmant ainsi que ces souches ont solubilisé le phosphate à travers le mécanisme d'acidification par la sécrétion d'acides organiques.

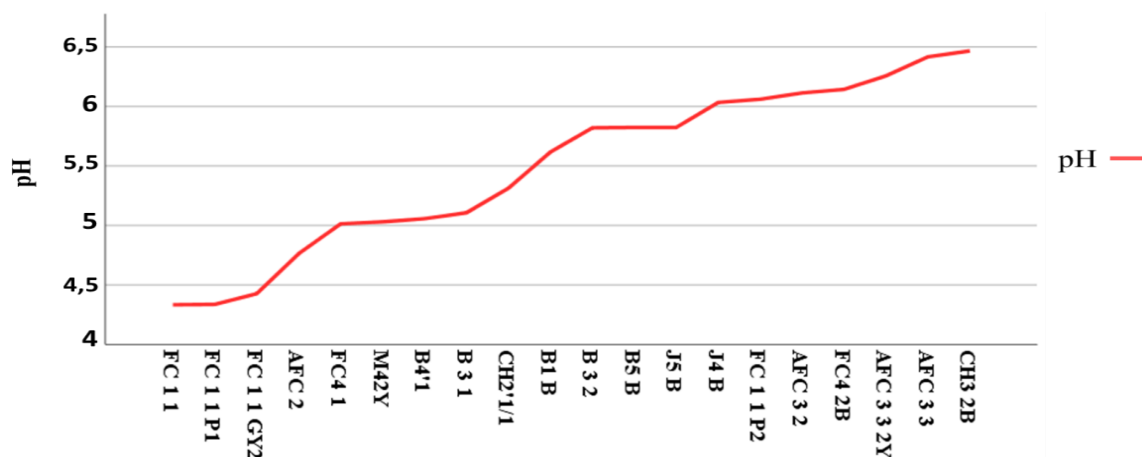


Figure 49. Déviation du pH liée à la quantité de phosphate solubilisé chez les vingt souches étudiées.

Le phosphore constitue un nutriment important pour la croissance des plantes, il intervient dans diverses activités vitales au développement (Ahmed et al., 2018). Les bactéries qui solubilisent le phosphate (PSB) rendent celui-ci disponible pour les plantes, ce qui favorise leur croissance (Chaudhary et al., 2020). Il a été également rapporté que parmi les PSB, les espèces appartenant aux genres *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* et *Pseudomonas*, sont connues pour leur capacité de solubiliser diverses formes de phosphates insolubles telles que le phosphate dicalcique, le phosphate tricalcique ou l'hydroxylapatite (De Boer et al., 2019) et cela par divers mécanismes, la production des acides organiques à faible poids moléculaire (Liu et al., 2020) s'avère la plus fréquente (Liu et al., 2020) notamment celle l'acide gluconique (Joshi et al., 2019).

3.2.2.2. Activités PGP en conditions de stress salin

En se basant sur les résultats du premier criblage, les six souches *Agrobacterium tumefaciens* (FC11), *Pseudomonas sp.* (AFC2), *Pantoea sp.* (M42Y), *Bacillus sp.* (B32), *Peribacillus sp.* et *Bacillus sp.* (FC11P1) ont présenté les meilleurs résultats parmi les vingt souches. Ces six souches ont été sélectionnées afin de tester leur performance pour les mêmes activités en conditions de stress salin sous les concentrations de 50 mM, de 100 mM et de 120 mM de NaCl.

3.2.2.2.1. Synthèse d'auxine

En conditions salines, la synthèse d'AIA a été déficiente à partir de 50mM chez les six souches. Cette diminution a été inversement proportionnelle à l'augmentation de la concentration en NaCl, en particulier chez la souche *A. tumefaciens* (FC11) où la production de l'AIA a été inhibée à 120mM. Cependant, la synthèse d'AIA a été stimulée chez la souche *P. brenneri* (AFC2) à partir de 100mM annonçant une faible augmentation en AIA avec une valeur de 15,69µg/ml et de 16,62µg/ml à 120 mM par rapport à la concentration de 50mM. Les meilleures valeurs de synthèse d'AIA sous stress ont été notées chez la souche *Pantoea sp.* (M42Y) en comparaison avec les autres souches, soient 35,35µg/ml à 50 mM et 29µg/ml à 100 mM et 120 mM (Fig. 50).

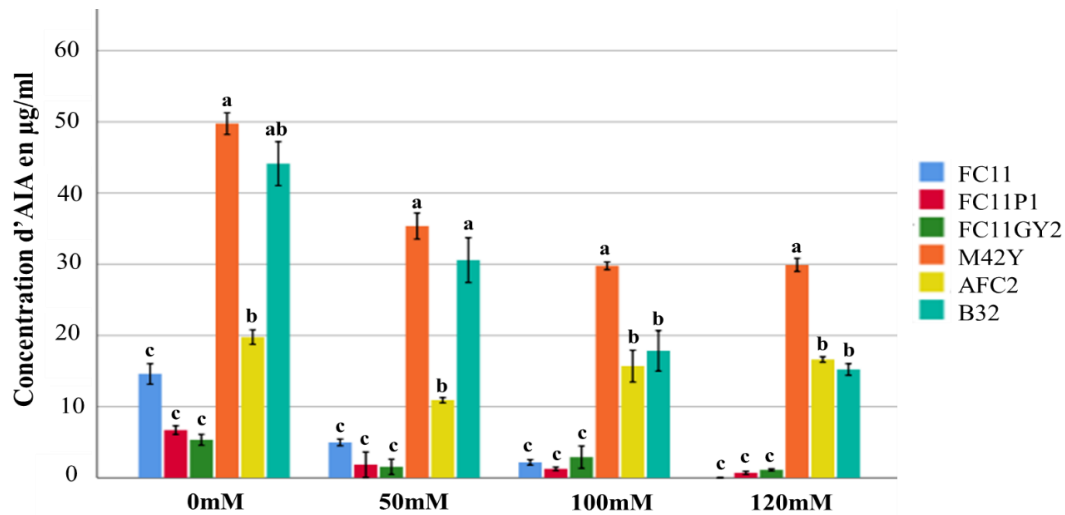


Figure 50. Production d'AIA par les six souches sélectionnées sous différentes concentrations de NaCl. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches pour la même concentration de NaCl (des couleurs différentes sont utilisées pour chacune des souches).

La présence d'un stress abiotique tel que le stress salin entrave la production d'AIA et provoque sa diminution (Apine et Jadhav, 2011). Ceci a été observé dans notre étude chez toutes les souches dès l'application de 50mM de NaCl sauf chez la souche *Pseudomonas sp.* dont la synthèse d'AIA a été stimulée à 100mM.

Ce résultat est en accord avec celui de Yousef (2018) qui a souligné l'effet négatif de l'accroissement des concentrations de NaCl sur le potentiel de *Bacillus subtilis* à produire l'AIA, celui-ci a significativement diminué avec l'augmentation des concentrations de NaCl. Le même résultat a été démontré également dans l'étude menée par Ansari et al. (2019) sur *Bacillus pumilus* et par Deshwal et Kumar (2013) sur des espèces de *Pseudomonas*. Chez la

souche *Pantoea agglomerans*, Cherif-Silini et al. (2019) ont rapporté une augmentation de la production d'AIA suite à l'application de 100 à 400mM de NaCl. Une observation similaire a été faite par Lebrazi et al. (2020) qui ont expliqué que l'aptitude de la souche *Pseudomonas sp.* à produire de l'AIA pourrait être due aux conditions de culture de la bactérie.

3.2.2.2. Production de sidérophores

Sous stress salin, les résultats présentés dans la figure 51 ont montré que la production de sidérophores chez les souches *Bacillus sp.* (B32), *A. tumefasciens* (FC11), *Peribacillus sp.* (FC11GY2) et *Pantoea sp.* (M42Y) n'a pas été significativement affectée en comparaison avec les conditions normales. La souche *Bacillus sp.* (FC11P1) a maintenu la meilleure production de sidérophores en affichant des valeurs modérées égales à 47,68% à 100mM et à 27,58% à 120mM, tandis que la souche *Pseudomonas sp.* (AFC2), a connu une baisse de production estimée à 25,43% sous 50mM et à 8,76% sous 120mM de NaCl.

Plusieurs souches bactériennes ont été étudiées pour leur capacité de produire des sidérophores, notamment celles qui appartiennent aux genres *Rhizobium*, *Pseudomonas* et *Bacillus* (Etesami et Glick, 2020). Ces bactéries peuvent représenter une alternative prometteuse aux engrais chimiques en raison de la lutte simultanée contre les effets du stress salin et l'amélioration de la disponibilité du fer pour les plantes dans les sols salins (Ferreira et al. 2019). Le fer joue un rôle important dans la vie de la plante surtout dans la biosynthèse et le maintien de la biogenèse de la chlorophylle et des chloroplastes. D'après Sultana et al. (2018), la production de sidérophores chez *Bacillus aryabhata* est affectée par le stress salin, elle diminue de 45% à 100mM et de 43% sous 200mM de NaCl.

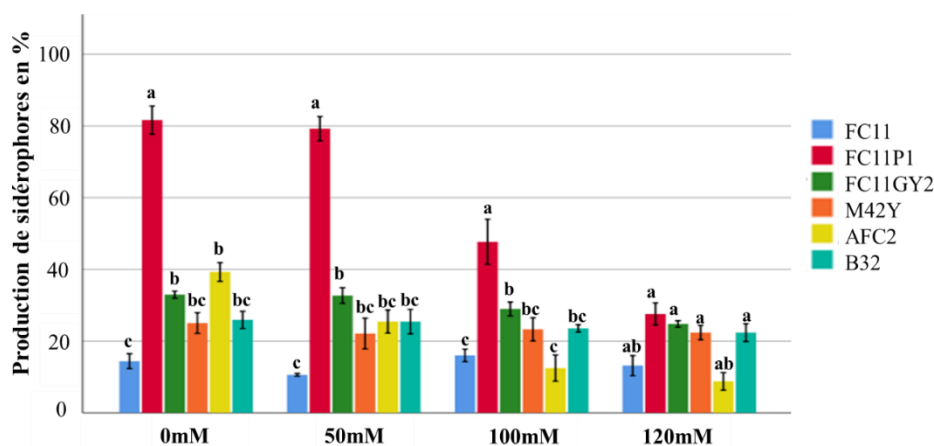


Figure 51. Production de sidérophores par les six souches sélectionnées sous différentes concentrations de NaCl. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches pour la même concentration de NaCl (des couleurs différentes sont utilisées pour chacune des souches).

3.2.2.2.3. Solubilisation de phosphate

Les résultats de ce test (Fig. 52) suggèrent que la solubilisation du phosphate chez les souches *Pantoea sp.* (M42Y), *Bacillus sp.* (FC11P1) et *Bacillus sp.* (B32) est stimulée à partir de 50mM avec des pourcentages d'amélioration de 135%, de 119,5% et de 115,5% respectivement, contrairement aux autres souches qui ont maintenu une production similaire au témoin. Chez *A. tumefasciens* (FC11) et *Peribacillus sp.* (FC11GY2), cette amélioration n'a été observée qu'à partir de 100mM avec une valeur maximale de 130µg/ml enregistrée chez *A.tumefasciens*(FC11). A 120mM, la solubilisation a diminué chez toutes les souches sauf chez les souches *Peribacillus sp* (FC11GY2) et *Pantoea sp.* (M42Y). Cette dernière a enregistré un taux maximal de 125,53µg/ml.

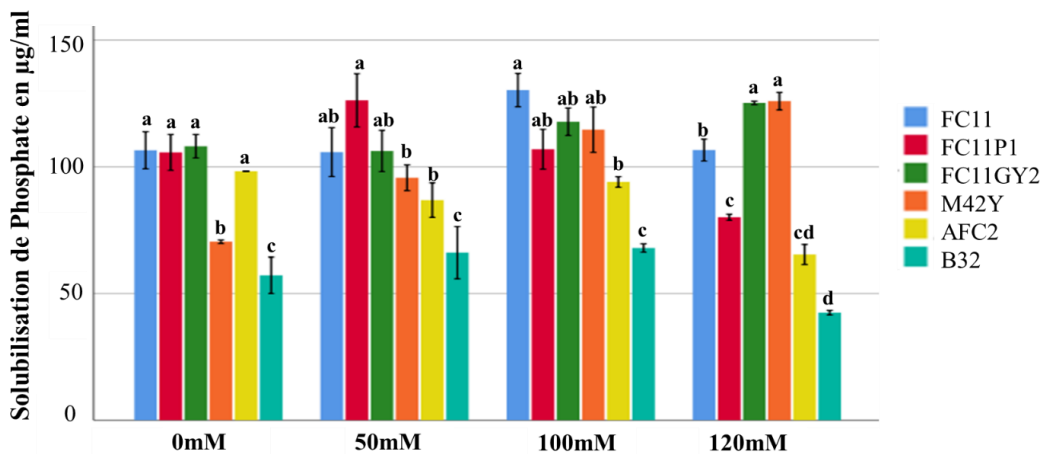


Figure 52. Solubilisation du phosphate inorganique par les six souches sélectionnées sous différentes concentrations de NaCl. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches pour la même concentration de NaCl (des couleurs différentes sont utilisées pour chacune des souches).

Nous avons constaté que la présence du sel avait stimulé la solubilisation du phosphate chez la majorité des souches. Nos résultats sont similaires à ceux de Gupta et *al.* (2015) qui ont rapporté que la présence de NaCl améliore la solubilisation du phosphate inorganique chez de nombreuses bactéries. Néanmoins, une concentration en sel supérieure à 34mM semble diminuer l'activité de solubilisation de ce composé selon l'étude menée par Xiao et *al.* (2011). Kadmiri et *al.* (2018) ont avancé que la solubilisation du phosphate inorganique est stimulée en conditions de stress salin à 200mM chez *Azospirillum brasilense* et *Pseudomonas fluorescens*. Plus tard, Priya et *al.* (2022) ont rapporté que les souches *Pantoea dispersa* et *Pseudomonas aeruginosa* ont été capables de solubiliser le phosphate sous stress salin jusqu'à 1 M de NaCl, cela a été accompagné d'une réduction de pH ce qui pourrait être dû à la libération d'acides organiques en tant que mécanisme de solubilisation du phosphore.

4. Effet conjugué du stress salin et de l'inoculation bactérienne sur la germination et la croissance de la tomate (*Solanum lycopersicum*)

4.1. Germination *in vitro* des graines de tomate

4.1.1. Cinétique et pourcentage de germination

La figure 53 illustre la cinétique de la germination des graines sous l'effet de concentrations croissantes de NaCl et en fonction des traitements bactériens. Elle présente une courbe sigmoïdale comportant trois phases distinctes. L'analyse de cette cinétique révèle généralement une première phase de latence, due à l'imbibition des graines, suivie d'une phase exponentielle caractérisée par une accélération de la germination, et enfin une troisième phase où l'on observe un plateau indiquant un arrêt de la germination.

En l'absence de sel, la germination a démarré très rapidement, la phase de latence n'a duré qu'un jour. La phase exponentielle a nécessité quant à elle, 11 jours pour atteindre le plateau où la germination s'est arrêtée après avoir atteint un taux de germination de 100% (Tab. 16). En revanche, les graines inoculées avec les souches *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ont présenté un comportement différent en termes de vitesse de germination par rapport au témoin : un taux maximal de germination (100%) a été atteint 5 jours après le semis, contrairement aux graines non inoculées qui ont exigé environ deux fois plus de temps pour germer entièrement. Ces résultats indiquent que l'inoculation bactérienne permet l'accélération du processus de germination des graines de tomate.

Par la suite, les graines de tomate sont soumises à des concentrations croissantes de NaCl : 100, 120 et 150 mM, combinées ou non à l'inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* Au fur et à mesure que la concentration en sel augmente, la courbe de germination est modifiée, montrant un étirement qui se traduit par un retard et un ralentissement de la vitesse de germination. Ainsi, pour les concentrations de 100 mM et 120 mM chez le témoin non inoculé, la germination a présenté respectivement un temps de latence de 2 jours et une phase exponentielle se prolongeant jusqu'au 13^{ème} jour. Le pourcentage de germination passe alors de 100% pour le témoin à 83,33% (100 mM) puis à 73,33% (120 mM).

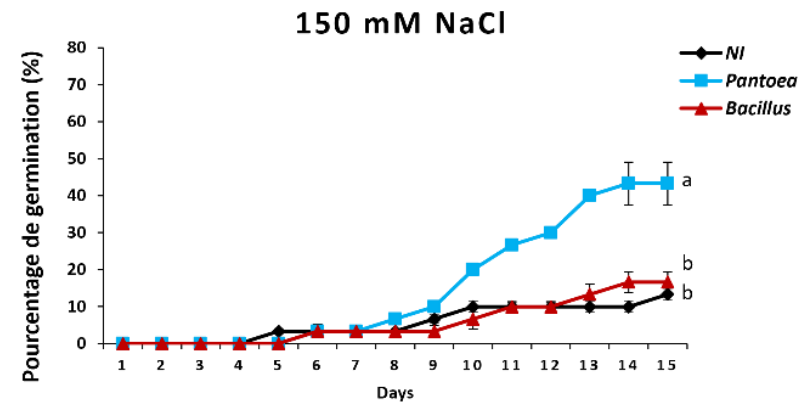
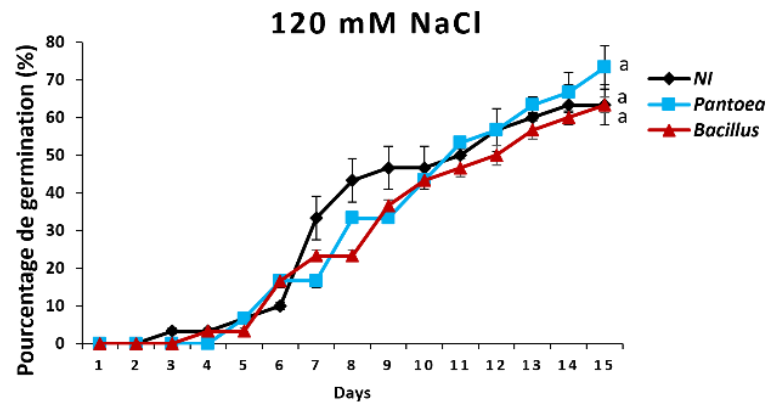
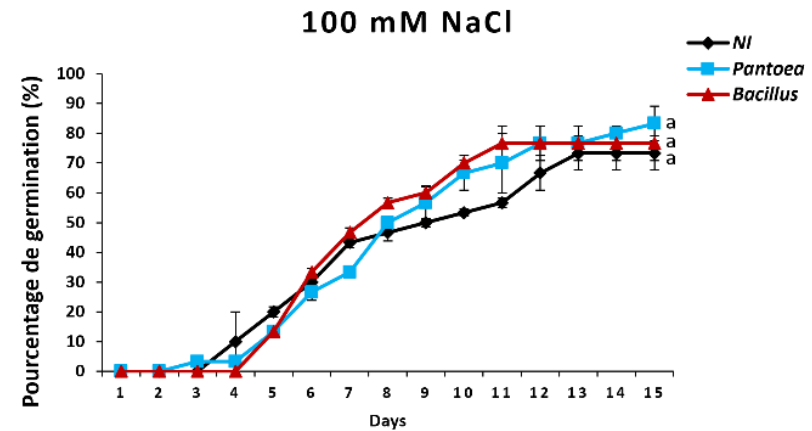
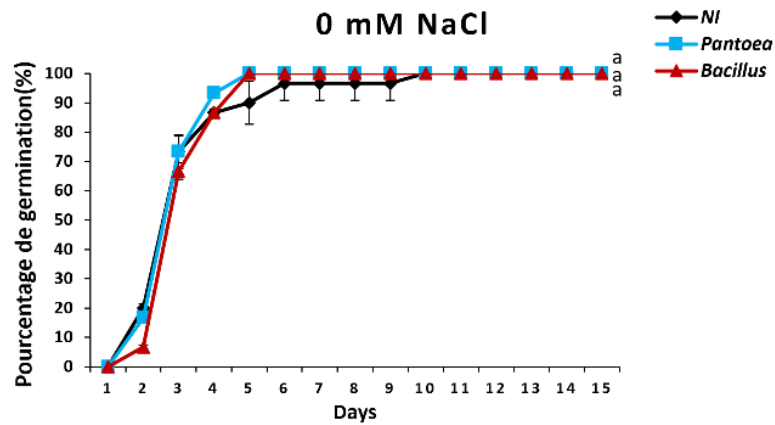


Figure 53. Cinétique de germination *in vitro* de graines de *Solanum lycopersicum* var Campbell inoculées ou pas avec la souche *Pantoea sp.* ou la souche *Bacillus sp.*, cultivées en présence de différentes concentrations de NaCl : 0mM, 100mM, 120mM et 150mM. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches pour la même concentration de NaCl (des couleurs différentes sont utilisées pour chacune des souches).

Tableau 16. Effet de l'inoculation bactérienne des graines de tomate (*Solanum lycopersicum* var Campbell 33) sur le pourcentage de germination (PG %), l'indice de germination (IG) et le temps moyen de germination (TMG) des graines soumises à 0 mM, 100 mM, 120 mM et 150 mM de NaCl. Les données représentent la moyenne de trois répétitions analysées par ANOVA (test Tukey). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$) entre les souches pour la même concentration de NaCl (des couleurs différentes sont utilisées pour chacune des souches).

		PG (%)	IG	TMG (jours)
Graines non inoculées	0 mM	100 ± 0,00 (a)	8,55 ± 0,46 (ab)	3,47 ± 0,46 (ab)
	100 mM	73,33 ± 5,78 (ab)	6,92 ± 0,96 (bc)	7,17 ± 0,07 (cde)
	120 mM	63,33 ± 5,77 (b)	6,13 ± 0,71 (c)	8,57 ± 0,49 (def)
	150 mM	13,33 ± 1,57 (d)	5,42 ± 0,59 (c)	10,67 ± 1,15 (f)
Inoculation par <i>Pantoea sp.</i>	0 mM	100 ± 0,00 (a)	9,00 ± 0,68 (ab)	3,17 ± 0,21 (a)
	100 mM	83,33 ± 78 (ab)	7,29 ± 0,37 (abc)	6,24 ± 0,93 (cde)
	120 mM	73,33 ± 5,77 (b)	6,38 ± 0,61 (c)	6,18 ± 0,71 (cd)
	150 mM	43,33 ± 5,77 (c)	5,42 ± 0,02 (c)	5,67 ± 1,88 (abc)
Inoculation par <i>Bacillus sp.</i>	0 mM	100 ± 0,00 (a)	9,17 ± 1,01 (a)	3,40 ± 0,26 (ab)
	100 mM	76,66 ± 5,58 (d)	7,21 ± 1,37 (abc)	5,83 ± 0,93 (cde)
	120 mM	63,33 ± 2,08 (bc)	5,82 ± 0,23 (c)	7,57 ± 0,76 (bc)
	150 mM	16,67 ± 2,78 (j)	5,44 ± 0,56 (c)	9,67 ± 1,05 (ef)

L'inoculation des graines avec les souches *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* a révélé des différences significatives ou non concernant le pourcentage de germination. A 100 mM, aucune différence significative n'a été observée par rapport au témoin. Les graines inoculées avec *Pantoea sp.* ont atteint un pourcentage maximal de 83,33% au 15^{ième} jour, tandis que seules 76,68% des graines traitées avec *Bacillus sp.* ont germé après 12 jours (Tab. 16). Sous la concentration de 120 mM, le processus de germination a démarré après 4 jours pour atteindre à une valeur de 73% au dernier jour du suivi (15^{ème} jour). Le pourcentage maximal de germination a été enregistré après 14 jours, avec une phase de latence de 6 jours. À 120 mM, le processus de germination a débuté après 3 et 4 jours en présence de *Bacillus sp.* et *Pantoea sp.* respectivement, pour atteindre les valeurs respectives de 63,33% et 73,33% au 15^{ième} jour.

En outre, il apparaît que la germination des graines de *S. lycopersicum* est très sensible à la concentration de 150 mM en NaCl. La durée de la phase de latence est fortement influencée par cette concentration élevée en sel, passant de 1 jour à 5 jours, tandis que la phase exponentielle est presque inexistante en raison du ralentissement de la germination induit par le stress salin. Le taux de germination a diminué alors, atteignant une valeur maximale de 13% au 15^{ème} jour. L'inoculation avec *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* n'avait pas d'effet positif sur

le démarrage de la germination par rapport au témoin ; au contraire, le temps de latence est de 6 jours. Cependant, le taux de germination a augmenté en présence de *Pantoea sp.*, atteignant un maximum de 43%. Le traitement des graines avec *Bacillus sp.* a montré un pourcentage de germination presque équivalent à celui du témoin, soit 16,67%.

Il est à noter que l'ajout de sel influence la capacité germinative des graines de tomate, en retardant l'enclenchement de la germination et en réduisant le taux de germination. Cette réduction est particulièrement prononcée et significative avec l'application de 120 mM et 150 mM de NaCl. Par exemple, nous avons noté une diminution 26,67%, 16,67% et 23,32% du pourcentage de germination respectivement pour les graines non inoculées, les graines inoculées avec *Bacillus sp.* et celles inoculées avec *Pantoea sp.* lorsqu'elles ont été cultivées en présence de 120 mM de NaCl. Une concentration plus élevée de NaCl, de 150 mM, conduit à une diminution du pourcentage de germination de 86,66%, 83,33% et 56,67% respectivement pour les graines non inoculées, les graines inoculées avec *Bacillus sp.* et celles inoculées avec *Pantoea sp.* (Tab. 16). Il convient toutefois de noter que l'inoculation des graines avec *Pantoea sp.* a abouti au pourcentage de germination le plus élevé par rapport au traitement avec *Bacillus sp.*

4.1.2. Indice de germination

L'indice de germination (IG) représente la vitesse de germination quotidienne moyenne de la composante vigoureuse d'un lot de graines, soit les graines qui germent entre le début de la courbe de germination et son point d'inflexion. Il indique si les semences germent rapidement et de manière synchronisée (Czabator, 1962).

Outre le pourcentage de germination, l'indice de germination a diminué avec l'augmentation des concentrations de NaCl dans tous les traitements appliqués, et a enregistré la plus haute valeur en l'absence de stress salin. L'inoculation des graines avec *Bacillus sp.* ou *Pantoea sp.* a donné, dans la plupart des cas, le plus haut IG par rapport aux graines non traitées. Cependant, ces différences restent statistiquement insignifiantes. Toutefois, il est à noter que la bio-activation des graines avec *Pantoea sp.* a donné le plus haut IG dans la plupart des conditions testées sauf à la concentration 150 mM de NaCl et en présence de *Bacillus sp.*, où l'IG était de 5,44 (Tab. 16).

4.1.3. Temps moyen de germination

Le temps moyen de germination (TMG) est une mesure permettant d'évaluer la rapidité de la germination, les valeurs plus basses indiquant une germination plus rapide (Hannachi et Van Labeke, 2018).

Comme le montre le tableau 15, le TMG est hautement affecté par l'application de stress salin, il a notablement augmenté avec l'augmentation des concentrations de NaCl, indépendamment du traitement bactérien appliqué. A 0mM, 100mM, 120mM, et 150mM, les graines inoculées ont enregistré un TMG respectif de 3,47jours \pm 0,46 ; 7,17jours \pm 0,07 ; 8,57jours \pm 0,49 et 10,67jours \pm 1,15. Cette dernière valeur étant la plus élevée de tous les traitements. En revanche, les valeurs les plus basses de 3,17 jours \pm 0,2 et 3,40 jours \pm 0,26 ont été enregistrées avec l'inoculation des graines avec *Pantoea sp.* et *Bacillus sp.*, respectivement, à 0Mm. Selon l'analyse statistique, cette légère baisse du temps moyen de germination des graines n'était pas significative. Par ailleurs, le TMG des graines inoculées soumises aux différentes concentrations en NaCl testées, a été relativement réduit par rapport à celui des graines stressées non inoculées, le plus faible TMG ayant été noté chez les graines traitées par *Pantoea sp.* à 150mM.

Le déclin de la germination des graines est l'un des effets les plus néfastes de la salinité excessive sur la croissance et le développement des plantes. Cette inhibition a été rapportée chez plusieurs espèces végétales, notamment la tomate (Abdel-Farid et *al.*, 2020 ; González-Grande et *al.*, 2020 ; Adilu et Gebre, 2021), le concombre (Chang et *al.*, 2010 ; Abdel-Farid et *al.*, 2020), la fève (Anaya et *al.*, 2018) et le haricot commun (Kaymakanova, 2009). Cette réduction de la germination a été attribuée à la toxicité osmotique ou ionique causée par la concentration élevée de sel affectant la capacité d'absorption d'eau pendant la germination des graines (Abdel-Farid et *al.*, 2020 ; Adilu et Gebre, 2021), et l'activité enzymatique conduisant à l'obstruction de la mobilisation des réserves des graines en raison de l'inhibition des activités des enzymes hydrolytiques clés (α -amylase, β -amylase et α -glucosidase) (Bouzroud et *al.*, 2023). Une des stratégies établies pour atténuer les effets négatifs du stress salin et augmenter la germination des graines et la croissance précoce des plantules repose sur l'utilisation de bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB). Dans le présent travail, l'inoculation avec les bactéries PGPB a considérablement amélioré les paramètres de germination des graines de tomate dans les conditions normales (0mM de NaCl) et avec des concentrations croissantes de NaCl, en considérant la souche *Pantoea sp.* comme étant la bactérie la plus

améliorative. Il convient de noter que l'inoculation des graines avec *Bacillus* sp. était également bénéfique pour la germination des graines dans des conditions de stress salin par rapport aux graines non traitées. Des travaux antérieurs ont souligné le potentiel des souches de *Bacillus* dans l'atténuation des effets du stress salin et l'amélioration de la germination des graines même avec l'augmentation des concentrations de sel (Chookietwattana et Maneewan, 2012 ; Hu, 2019). Par exemple, l'inoculation des graines de tomate avec *Bacillus licheniformis* a considérablement amélioré l'indice de germination et le taux de germination à différents niveaux de stress salin allant de 30 à 90 mM de NaCl, en utilisant l'ACC comme source d'azote (Chookietwattana et Maneewan, 2012). Chez le maïs, la germination des graines a été à peine affectée par l'application du stress salin. L'inhibition de la germination des graines peut être surmontée par l'application de *Bacillus subtilis* HS5B5 comme le montrent Song et al. (2023). En effet, il a été démontré que l'inoculation des graines avec cette souche a entraîné un meilleur taux et potentiel de germination, même dans des conditions de stress salin. Des améliorations significatives ont également été signalées dans les graines de *Phaseolus vulgaris* lorsqu'elles étaient traitées avec la souche de *Bacillus subtilis*, aussi bien en conditions normales que sous stress salin (Lastochkina et al., 2021). Les auteurs ont expliqué ces effets positifs par la capacité de cette souche à produire de l'AIA, une hormone végétale clé impliquée dans la régulation de la division cellulaire et de l'allongement, la prolifération et la différenciation des cellulaires des tissus végétaux, la dominance apicale et la modulation de l'architecture racinaire (Kaushal, 2019).

Par ailleurs, la germination des graines de *S. lycopersicum* a été conduite également sous l'action de deux souches bactériennes. L'analyse des données du tableau 15 a révélé que l'inoculation avec *Pantoea* sp. favorise la germination des graines de tomate dans les conditions normales et avec des concentrations accrues en sel, aussi bien en pourcentage de germination (PG), indice de germination (IG) et temps moyen de germination (TMG). Pourtant, aucune étude antérieure n'a rapporté d'effet bénéfique de l'inoculation des graines avec *Pantoea* sp. sur la capacité germinative des graines sous conditions de stress salin. Les effets de *Pantoea* sp. sur la croissance des plantes dans des conditions stressantes ont été principalement étudiés après l'établissement des plantules. Les activités de PGP des deux souches *Pantoea* sp. et *Bacillus* sp., principalement la production d'AIA, ont révélé le grand potentiel de *Pantoea* sp. à produire de grandes quantités d'AIA dans des conditions normales et de stress salin, suggérant que les effets bénéfiques de cette bactérie sur la germination peuvent être liés à la modulation du contenu en hormones végétales dans les graines.

4.2. Caractérisation des paramètres biométriques des plants de tomate (*Solanum lycopersicum* variété Campbell 33)

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'effet du stress salin et des bactéries endophytes sur la croissance de plants de tomate. Pour ce faire, la concentration 150mM de NaCl est choisie vu que nos résultats antérieurs ont montré que le potentiel germinatif des graines de tomate était plus sensible à cette concentration qu'aux concentrations 100mM et 120mM de NaCl. Des inoculations simples et doubles (co-inoculation) ont été établies par deux souches bactériennes : *Bacillus sp.* et *Pantoea sp.* Plusieurs paramètres morphologiques concernant la longueur de la partie aérienne, le nombre et la surface foliaire, le poids sec des parties aériennes, la longueur de la racine principale et le rapport parties aérienne/racines, ont été évalués.

4.2.1. Croissance des plantes

4.2.1.1. Hauteur de la plante

En absence de toute concentration saline (0mM), les tiges des plants de tomate se sont révélées robustes et bien érigées exprimant une hauteur moyenne égale à $69,15\text{cm} \pm 4,11$ alors que les plants cultivés en présence du sel ont manifesté une réduction de la longueur qui a atteint 21,72%. Ainsi, la concentration 150mM de NaCl affecte significativement la croissance végétative de la variété Campbell 33, réduisant l'allongement de la tige principale et le développement de rameaux (Fig. 54).

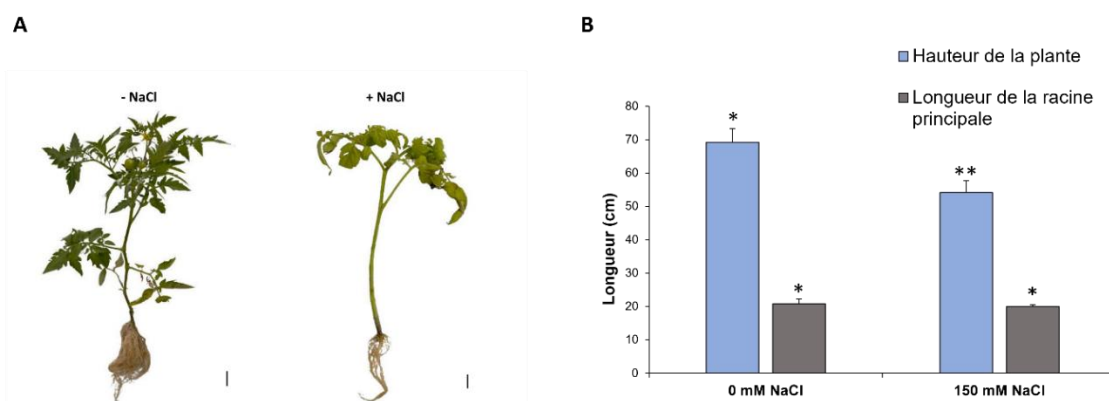


Figure 54. Hauteur moyenne des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. (A) photo montrant l'allure des plantes non stressées (- NaCl) et stressées (+ NaCl), (B) Hauteur de la plante ainsi que la longueur de la racine principale des plantes cultivées dans les conditions normales et stressantes. Barre, 2 cm. Pour chaque paramètre, l'astérisque montre une différence significative ($p < 0.05$) selon le test t de student.

La figure 55 montre que l'inoculation par les bactéries endophytes a agi en faveur de la croissance en hauteur des plants de tomate. En conditions normales, ces bactéries ont exprimé un potentiel de croissance élevé. La simple inoculation par *Pantoea sp.* ou par *Bacillus sp.* et la double inoculation ont amélioré significativement l'allongement de la tige. La taille de la plante a affiché un accroissement de 43,69% pour *Pantoea sp.*, 44,93% pour *Bacillus sp.* et 110,55% pour l'association des deux souches (Fig. 61). Dans ce cas, la co-inoculation était plus performante que la souche *Pantoea sp.* seule ou la souche *Bacillus sp.* seule.

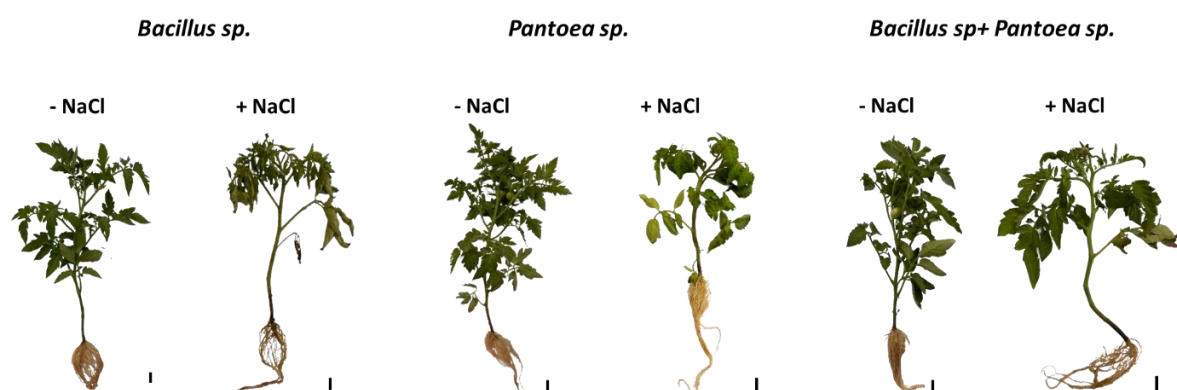


Figure 55. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la croissance des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Barre = 2 cm.

En présence de 150 mM de NaCl (Fig. 56), l'impact de l'inoculation s'est manifesté par une hausse significative de la hauteur de la plante à tous les types de l'inoculation. Nous avons remarqué sous cette concentration de sel, la co-inoculation était plus efficace (66,08%), que la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou par *Bacillus sp.* (environ 24,62%).

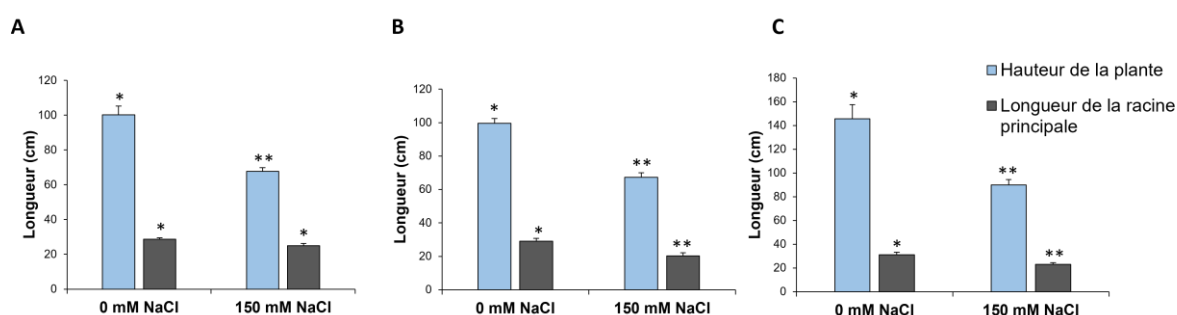


Figure 56. Effet de la simple inoculation par (A) *Pantoea sp.* ou (B) *Bacillus sp.* ou (C) la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la hauteur moyenne et la longueur de la racine principale des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Pour chaque paramètre, l'astérisque montre une différence significative ($p < 0.05$) selon le test t de student.

La quantité de sel que les plants peuvent supporter sans grand dommage varie en fonction de l'âge, la famille, le genre, l'espèce et aussi les variétés (Levigneron et al., 1995). Diverses études faites sur la tomate ont montré que celle-ci répond différemment au stress salin selon la variété et la quantité de sel qui lui est imposée. Ould Mohamdi et al. (2011) ont rapporté qu'en présence de 130mM de NaCl la hauteur de la tige des plantes de tomate var Campbell 33, connaît une réduction de 39%. Les mêmes auteurs ont suggéré que la croissance de la partie aérienne et racinaire de la variété Mongal est sévèrement touchée à partir de 50mM de NaCl. Abbad et al. (2019) ont testé l'effet d'une concentration de 30,65 mM sur la croissance des variétés Marmande et Saint-Pierre, ils ont constaté un taux de réduction par rapport au témoin de 75% et de 14% respectivement. Une étude faite par Naceur et al. (2001) a montré que la croissance du blé est perturbée par le stress salin à partir d'une concentration modérée de 292 mM. Des modifications similaires du potentiel de croissance ont été décrites chez la luzerne. L'addition de 150mM de NaCl à l'eau d'irrigation mène à une réduction importante de la croissance (Mezni et al., 2012; Ben Nja, 2014). La réduction de la croissance aérienne peut être expliquée par des hausses des taux de certains régulateurs de croissance, à savoir l'acide abscissique et les cytokinines, induites par le sel (Kuiper et al., 1990). Par ailleurs, Silva et al. (2003) déclarent que la concentration de 75 mM de NaCl affecte négativement la croissance de *Vigna unguiculata*.

Ayaz et al. (2022) ont rapporté que l'inoculation du blé par *Bacillus sp.* augmente de manière significative la longueur de la partie aérienne des plantes inoculées par rapport aux plantes témoins. Ils ont mentionné que les souches halophiles (NMCN1 et LLCG23) ont joué un rôle primordial dans l'amélioration de la croissance du blé grâce à l'inoculation des graines dans des conditions salines. L'analyse du mode d'action de ces souches bactériennes a révélé leur capacité à synthétiser l'auxine. L'une des fonctions principales de l'auxine est de stimuler l'élongation cellulaire. L'auxine favorise l'expansion des cellules végétales en assouplissant la paroi cellulaire, ce qui permet aux cellules de s'étirer et de s'allonger. Cela se traduit par une croissance accrue de la tige, des feuilles et d'autres parties aériennes de la plante (Saini et al., 2013). Notre souche *Bacillus sp.* a montré dans nos travaux antérieurs, une capacité accrue de la synthèse d'auxine dans les conditions normales et salines, ce qui peut expliquer l'augmentation de la longueur de la partie aérienne des plantes inoculés par rapport aux plantes témoins NI.

Des expérimentations menées par Cherif (2018) sur la croissance du blé dur en conditions contrôlées et sous concentration saline ne dépassant pas 200mM, montrent que l'inoculation des graines par *Bacillus sp.* et/ou par *Pantoea .agglomerans* confère une diminution de la sensibilité vis-à-vis du sel. Les deux souches améliorent significativement la croissance.

4.2.1.2. Longueur de la racine principale

En ce qui concerne le système racinaire, nous avons mesuré la longueur moyenne de la racine principale et nous avons fait une estimation visuelle de la densité racinaire. Le tableau 17 permet d'observer que le stress salin n'a pas d'effet significatif sur la longueur de la racine principale par rapport aux plantes témoins. En revanche, tous les traitements bactériens appliqués à 0mM de NaCl ont eu un impact positif et significatif d'après l'analyse de la variance, sur l'allongement de la racine principale. A 150mM, l'inoculation par *Pantoea sp.* provoque une augmentation négligeable de 0,99% alors que celle enregistrée par la co-inoculation et par la souche *Bacillus sp.* équivaut 13,39% et 24,72% respectivement. Ainsi, le traitement par la souche *Bacillus sp.* a entraîné l'allongement le plus intéressant de la racine principale.

Tableau 17. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la longueur de la racine principale des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les valeurs représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

	Plantes non inoculées (NI)	Inoculation avec <i>Pantoea sp.</i>	Inoculation avec <i>Bacillus sp.</i>	Double inoculation
0 mM NaCl	20.82 \pm 1.46 (c)	29.07 \pm 1.74 (a)	28.66 \pm 0.87 (a)	31.11 \pm 2.12 (a)
150 mM NaCl	20.02 \pm 0.57 (c)	20.22 \pm 1.92 (c)	24.97 \pm 1.29 (b)	23.01 \pm 1.62 (b)

En outre, les traitements bactériens sont plus performants en conditions normales qu'en conditions de stress. Les plantes inoculées font l'objet d'un allongement notable de la racine principale comparativement aux plantes témoins non inoculées (NI). L'augmentation relative à la co-inoculation est égale à 49,42, celle de *Pantoea sp.* est de 39,62% et celle de *Bacillus sp.* est de 37,60%. L'analyse de la variance suggère que l'application bactérienne améliore significativement la longueur de la racine principale. Par ailleurs, la quantité de racines élaborées par les plants témoins-inoculés est très appréciable. Effectivement, l'inoculation par les bactéries endophytes stimule le développement racinaire dans les trois éventualités

(*Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou l'association des deux).

La salinité agit en augmentant la pression osmotique du milieu, ce qui empêche l'absorption en eau par le système racinaire (Marshner, 1995, Navarro et al. 2002) ayant pour conséquence, une réduction de la croissance racinaire. Xiong et Zhu (2002) considèrent que la réduction de la croissance des racines est une capacité adaptative nécessaire à la survie d'une plante exposée à un stress abiotique. Hamrouni et al. (2011) ont signalé que la sensibilité au sel touche plus la partie racinaire que la partie aérienne. La plante s'adapte au stress salin en réduisant en premier lieu son système racinaire préservant ainsi la partie aérienne afin de maintenir et d'assurer la photosynthèse.

Des études portant sur *Solanum lycopersicum* ont mis en évidence le fait que celle-ci est sensible à la salinité et que la biomasse aérienne et racinaire est dégradée (Martinez et al., 2012 ; Parvin et al., 2019). Samb et al. (2020) ont montré que la concentration en sel diminue la longueur des racines chez *Anacardium occidentale* L. Les résultats de l'étude de Mayak et al. (2004) ont révélé de manière concluante que l'inoculation de la tomate cv. F 144 par la souche *Achromobacter* améliore de manière significative le poids frais racinaire des plantes inoculées par rapport aux plantes témoins sous conditions de stress salin (175mM). Cette augmentation était de l'ordre de 60,51%. Ces auteurs ont également observé que la concentration de l'éthylène a été réduite chez les plantes après l'inoculation suggérant que la présence de ces bactéries, qui sont dotées de l'enzyme ACC désaminase offre une perspective nouvelle et prometteuse. En dégradant l'ACC, ces bactéries réduisent la production d'éthylène, permettant ainsi aux plantes de mieux tolérer le stress salin en évitant les effets néfastes de l'excès d'éthylène. Il se pourrait que nos bactéries atténuent les effets du stress salin par ce mécanisme. Une quantification de l'activité ACC désaminase reste cruciale pour confirmer cette hypothèse.

4.2.2. Nombre de feuilles

Relativement au développement des feuilles, nous constatons que la concentration saline de 150mM a un effet délétère sur la multiplication de feuilles. Le nombre moyen de feuilles enregistré par le témoin est de $8,62 \pm 0,51$ alors qu'en condition saline il chute à $5,37 \pm 0,51$. La réduction est significative atteignant 37,70% (Fig. 57).

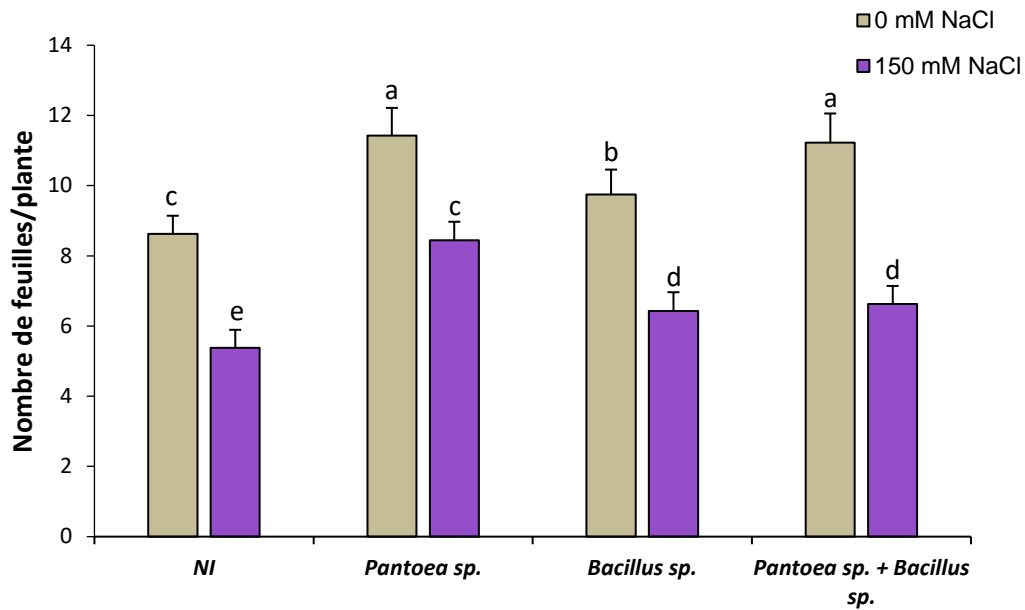


Figure 57. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le nombre de feuilles par pied des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

Les résultats obtenus par Bacha et al. (2015) ont montré que le développement des feuilles chez la tomate variété Microtom, est largement affecté par la salinité à la concentration de 150mM en comparaison avec le traitement de contrôle. Faye et al. (2021) ont avancé dans leurs travaux sur la croissance de trois espèces (*Casuarina equisetifolia* L., *Gossypium hirsutum* L. et *Jatropha curcas* L.) que le nombre de feuilles déclinait avec l'installation du stress salin.

Par ailleurs, l'application bactérienne a un impact appréciable et significatif sur la foliation en conditions normale et saline. L'efficacité du traitement microbien dépend de la nature de l'inoculation. En effet, la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou la combinaison de celle-ci avec *Bacillus sp.* ont entraîné chez les plantes témoins, l'apparition du nombre le plus élevé de feuilles, $11,42 \pm 0,52$ et $11,22 \pm 0,51$ respectivement suivi de l'inoculation simple par *Bacillus sp.*, $9,75 \pm 0,83$ soit une augmentation respective de 32,51%, 30,11% et 13,04%. A 150mM, l'augmentation du nombre de feuilles est moins prononcée pourtant l'accroissement est significatif pour les trois types d'inoculation. Le traitement par la souche *Pantoea sp.* a induit une croissance foliaire notable exprimant un développement moyen de 8,44 feuilles \pm 0,52 quoique, la double inoculation et la simple inoculation par *Bacillus sp.* produisent un nombre moyen de feuilles équivalent à $6,62 \pm 0,51$ et $6,42 \pm 0,53$ respectivement.

4.2.3. Surface foliaire

La surface foliaire est mesurée à partir de feuilles jeunes issues des plantes cultivées dans les différentes conditions. Les plantes témoins ayant subi une simple inoculation par *Pantoea sp.* ou par *Bacillus sp.* ne présentent pas de différence notable en terme de surface foliaire, comme le montre la figure 58. Au contraire, les résultats ont révélé que la co-inoculation a entraîné une amélioration significative de la surface foliaire par rapport aux plantes témoins. Cette augmentation est estimée à 32,25%.

En réponse au stress salin (Fig. 58), on observe que la présence de sel provoque une diminution de la surface foliaire de 45,54%. Par ailleurs, une différence de coloration des limbes foliaires est mise en évidence entre le témoin et les plantes stressées (Fig. 59). En effet, sous stress salin, les folioles sont de couleur vert pale soulignant un jaunissement accompagné d'une chlorose.

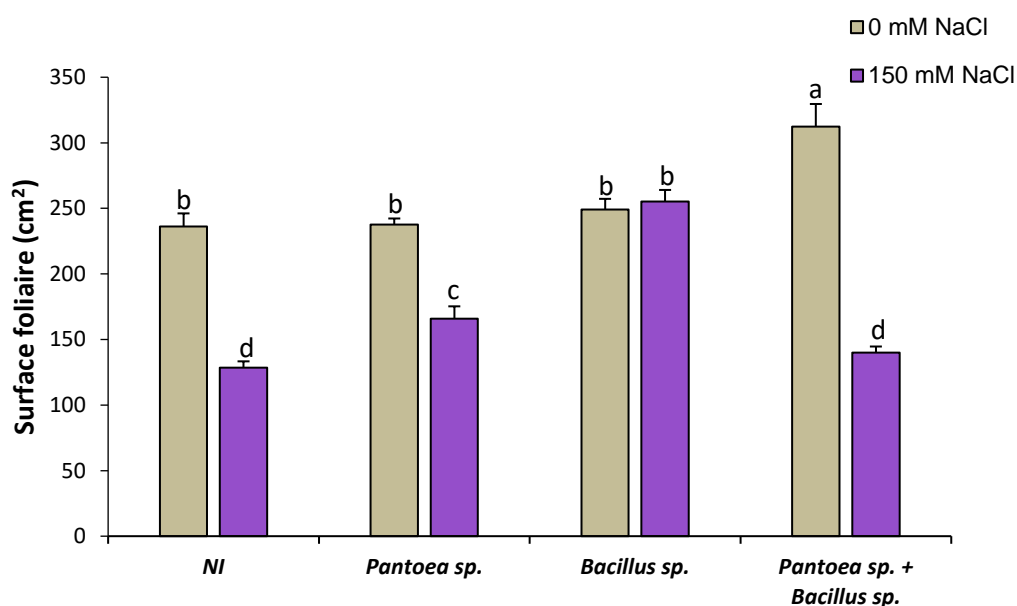


Figure 58. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la surface foliaire des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

Cette diminution de la surface foliaire chez la tomate a été signalée par Mohamdi *et al.* (2011). Dans leurs travaux sur les variétés Mongal et Campbell 33, les chercheurs ont montré que les deux variétés étaient sensibles à la salinité et réduisaient respectivement leur surface foliaire à partir des concentrations 85mM et 130mM de NaCl. Des travaux similaires ont été menés sur *Phaseolus vulgaris* variété Djedida, chez laquelle une diminution de 66% de la

surface foliaire a été détectée à 100mM de sel, une par rapport au témoin (Kouadria et al., 2020). Dans une autre étude faite chez *Jatropha curcas*, Patel et al. (2010) ont rapporté que l'expansion foliaire est significativement réduite par la concentration croissante de sel dans le sol. Dogan et al. (2012) ont aussi constaté que les taux la croissance des feuilles diminuent d'un taux de 88,45% chez *Gossypium hirsutum* L., en présence du sel.

Toutefois, tous les traitements, à savoir l'inoculation par *Pantoea sp.* ou par *Bacillus sp.* et la co-inoculation ont entraîné une amélioration de la surface foliaire par rapport aux plantes témoins cultivées en conditions de stress. Cette augmentation est de 8,81% (non significative) pour les plantes co-inoculées, de 29,05% (significative) pour les plantes inoculées avec *Pantoea sp.* et enfin de 98,41% (significative) pour les plantes inoculées avec *Bacillus sp.*

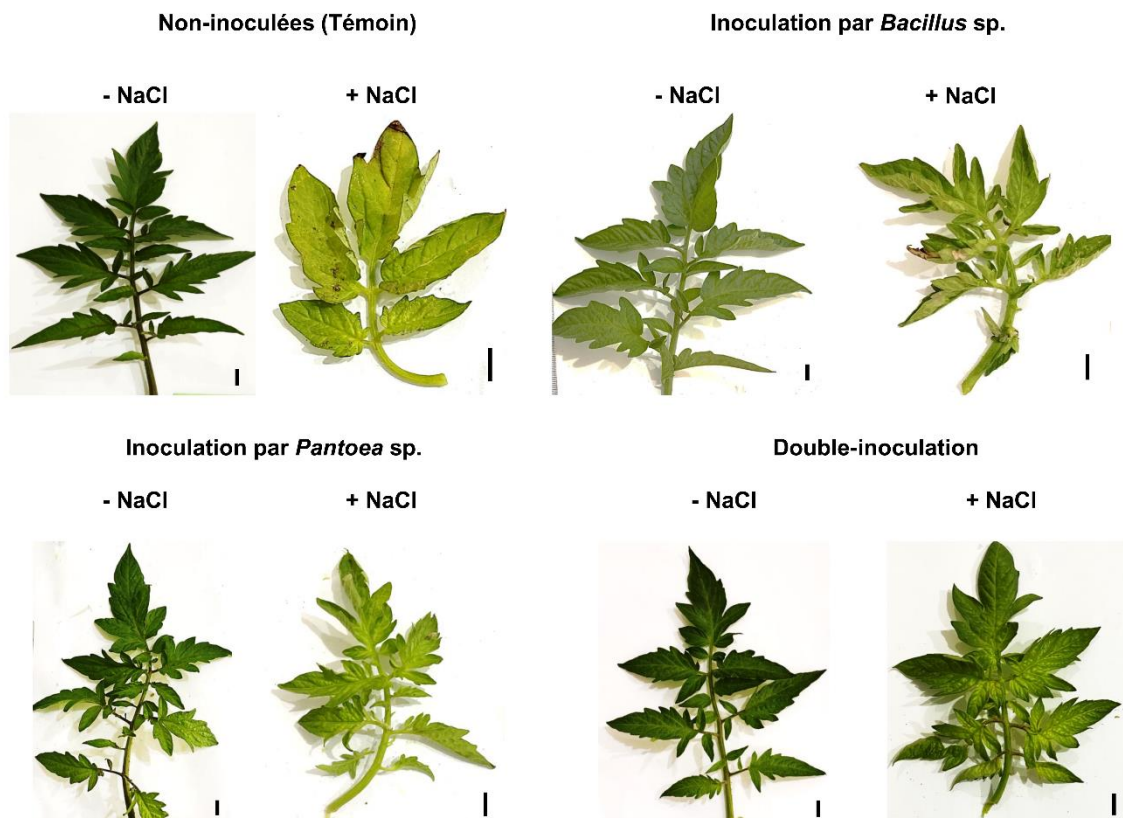


Figure 59. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le développement des feuilles des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Barre = 1cm.

Environ 80 % de la réduction de la croissance à fortes concentrations en sel peut être attribuée à la réduction de la surface foliaire (Marcelis et Hooijdonk,1999). La salinité diminue la croissance des glycophytes en modifiant aussi l'équilibre hydrique et ionique au niveau des tissus (Greenway et Munns, 1980). Au niveau des feuilles, ce phénomène est associé à une diminution de la turgescence suite à une baisse du gradient de potentiel hydrique entre la plante et le milieu (Levigneron et *al.*, 1995).

L'effet des endophytes sur l'expansion de la surface foliaire a été examiné par plusieurs auteurs. Patani et *al.* (2023) ont signalé que l'inoculation de la tomate par *Bacillus sp.* augmente la surface foliaire de manière significative aussi bien dans les conditions normales que dans les conditions de stress (400mM NaCl), avec des taux respectifs de 26,07% et 26,01%. L'analyse du mode d'action des bactéries a révélé leur capacité à produire des sidérophores qui favorisent l'absorption du fer, essentiel à la croissance des plantes (James et *al.*,2023). De plus, les bactéries ont montré une solubilisation accrue du phosphate, améliorant ainsi la disponibilité des nutriments essentiels. Les deux bactéries testées ont la capacité de solubiliser le phosphate et de produire des sidérophores comme cela a été montré par antérieurement. Ces activités PGP ont été observées à la fois en conditions normales et de stress, ce qui peut expliquer l'effet bénéfique de ces deux bactéries sur le développement foliaire chez la tomate.

4.2.4. Poids sec de la partie aérienne

Nous avons estimé le poids sec de la partie aérienne en fonction du traitement appliqué. Il ressort de la figure 65 que la concentration saline de 150mM diminue le poids sec de la partie aérienne de 24,25% du témoin. Toutefois, cet effet négatif du stress salin n'est pas significatif (Fig. 60). Une étude sur le blé et l'orge a montré que le stress salin engendre une diminution importante du poids sec de la partie aérienne, chez les deux espèces (Dahmani et *al.*, 2023). Bouchoukh en 2010, a observé que la salinité induite chez *Atriplex nummulari* provoquait une régression très marquée du poids sec des organes photosynthétiques.

L'inoculation par *Pantoea sp.*, *Bacillus sp.* et la co-inoculation fait ressortir un effet positif sur la masse sèche de la partie aérienne, en présence et en absence du sel. En effet, chez le témoin, le traitement avec *Bacillus sp.* et la co-inoculation ont conduit à une augmentation significative du poids sec de la partie aérienne, respective de 34,50% et de 67,66%. Cependant, l'inoculation par *Pantoea sp.* induit une amélioration non significative du poids sec de 13,18%.

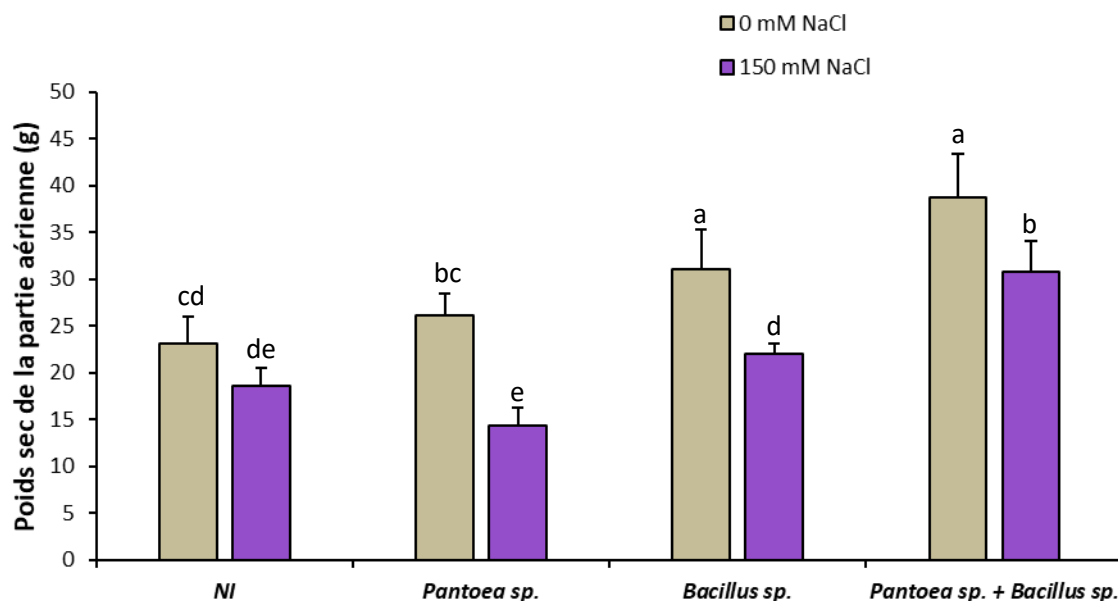


Figure 60. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le poids sec de la partie aérienne des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

Par ailleurs, en condition de stress, les résultats obtenus indiquent de manière évidente que la masse sèche de la partie aérienne est améliorée de 1,6 et de 1,2 fois par rapport à la masse des plantes témoins (stressées et non inoculées) suite à une simple inoculation par *Bacillus sp.* et une double inoculation par *Bacillus sp.* et par *Pantoea sp.* (Fig. 60). Cependant, le traitement par *Pantoea sp.* dans ces conditions entraîne une réduction non significative de 0,8 fois, soit un taux de 22,67%.

4.2.5. Poids sec des racines

Il ressort de la figure 61 que la biomasse racinaire sèche diminue avec l'installation du stress salin. Le témoin enregistre une biomasse plus importante avec $12,21 \pm 1,21$ g contre $8,96 \pm 0,36$ g en conditions saline, pourtant cette différence est non significative.

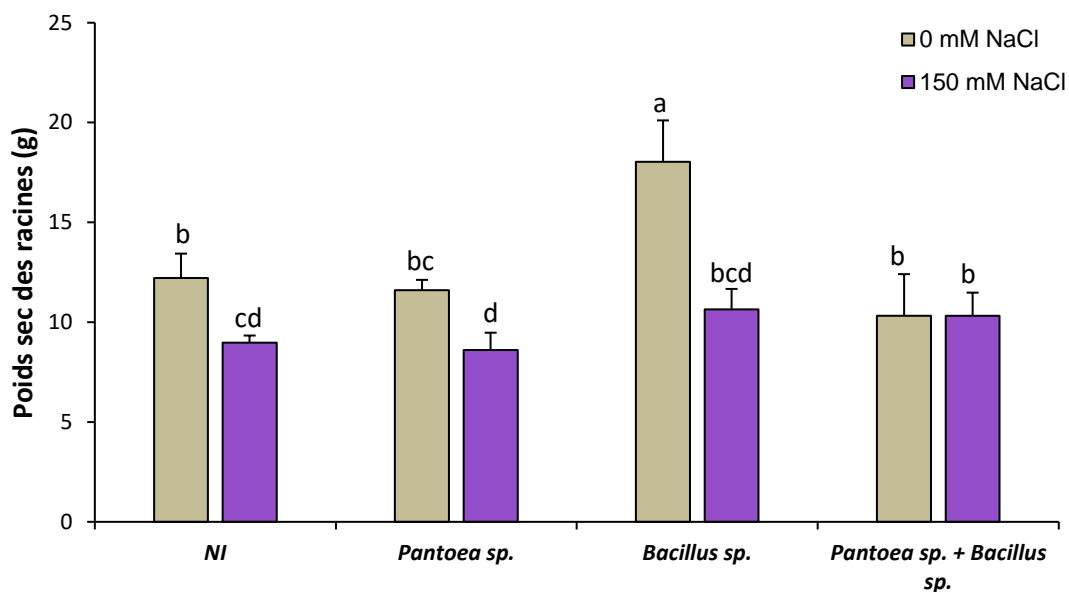


Figure 61. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le poids sec de la partie racinaire des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

Sur le plan cellulaire, la diminution de la matière sèche est due à une baisse du nombre de divisions cellulaires (Benamar, 2009). Une étude sur la plante de piment (*Capsicum annuum* L.) a montré que la biomasse sèche des feuilles et des racines est sévèrement affectée par la salinité à partir de 50 mM NaCl (Thouraya et al., 2013). Le traitement bactérien n'affecte pas d'une manière importante le poids sec en conditions normales à l'exception de l'inoculation des plantes par *Bacillus sp.* engendrant une augmentation significative de ce paramètre par rapport au témoin. Cette augmentation est de l'ordre de 47,66%.

En réponse au stress salin, la mesure de la biomasse sèche de la partie racinaire a démontré que l'inoculation (simple ou double) des plants de tomate n'a pas eu un impact significatif sur le poids sec. Aucune différence significative n'est en effet détectée entre les plantes témoins (non-inoculées) et celles inoculées soit par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou par les deux bactéries. Cependant, nous observons également que l'inoculation simple avec *Pantoea sp.* a conduit à une très légère réduction (4,01%) du poids sec racinaire par rapport aux plantes témoins NI. A l'opposé, la co-inoculation et la simple inoculation par *Bacillus sp.* provoquent une légère hausse de la biomasse sèche qui est de 15,06% et de 18,75% respectivement.

4.2.6. Ratio partie aérienne / racines

Le rapport de biomasse est un paramètre important pour la simulation de l'effet de la salinité sur le végétal (Karoun et al., 2017). Les résultats de la figure 62 montrent que la salinité réduit le ratio partie aérienne/racines. Les plantes témoins enregistrent une valeur de $1,89 \pm 0,22$ contre une valeur de $2,01 \pm 0,31$ chez les plantes soumises à la concentration saline de 150mM. L'analyse de la variance a montré que cette diminution est non significative par rapport au témoin. Ce fait pourrait être expliqué par la réduction du poids sec des feuilles des plantes soumises au stress salin, qui n'était pas significative en comparaison avec le témoin. Une étude menée sur *Solanum lycopersicum* L. a indiqué que le rapport partie aérienne/racines chute à 1,2 chez les plants soumis à une salinité de 150mM alors que ce rapport était de 2,1 pour les plantes témoins (Benazzouk et al., 2018).

Les plantes témoins (0mM de NaCl) ont manifesté une amplification prononcée du ratio par la double inoculation ($4,43 \pm 0,24$), moins importante par la simple inoculation par *Pantoea sp.* ($2,30 \pm 0,18$) voire légèrement réduite par *Bacillus sp.* ($1,73 \pm 0,26$). En contrepartie, à 150mM de NaCl, l'inoculation par *Pantoea sp.* a induit une baisse minime ($1,60 \pm 0,18$) du rapport partie aérienne/racines, une baisse non significative de 20,39%. En outre, la valeur la plus élevée ($3,38 \pm 0,29$) a été enregistrée avec la co-inoculation suivie de la simple inoculation par *Bacillus sp.* ($1,92 \pm 0,24$).

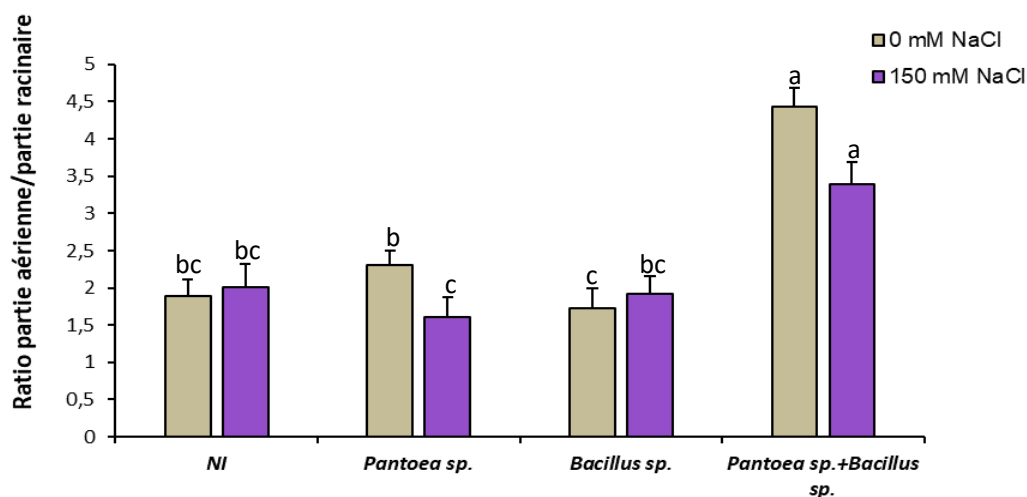


Figure 62. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le ratio partie aérienne/partie racinaire des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

4.3. Caractérisation des paramètres physiologiques et biochimiques de la tomate

4.3.1. Sucres solubles

Les sucres solubles sont des substances importantes d'ajustement osmotique dans les cellules végétales. Leur accumulation est considérée comme indicateur de résistance à la salinité (Munns et al., 2006). Cette faculté a été rapportée dans beaucoup d'études (Muscolo et al., 2003 ; Morant-Manceau et al., 2004 et Navarro et al., 2006).

La figure 63 montre que la teneur moyenne en sucres solubles devient plus importante dans les feuilles lorsque la concentration saline passe de 0mM à 150mM de NaCl. En effet, nous constatons que la teneur moyenne en sucres solubles est de $0,16 \pm 0,02$ mg/g MF chez les plantes témoins. Cette teneur augmente chez les plantes soumises à la concentration 150mM manifestant une valeur égale à $2,42 \pm 0,42$ (mg/g MF).

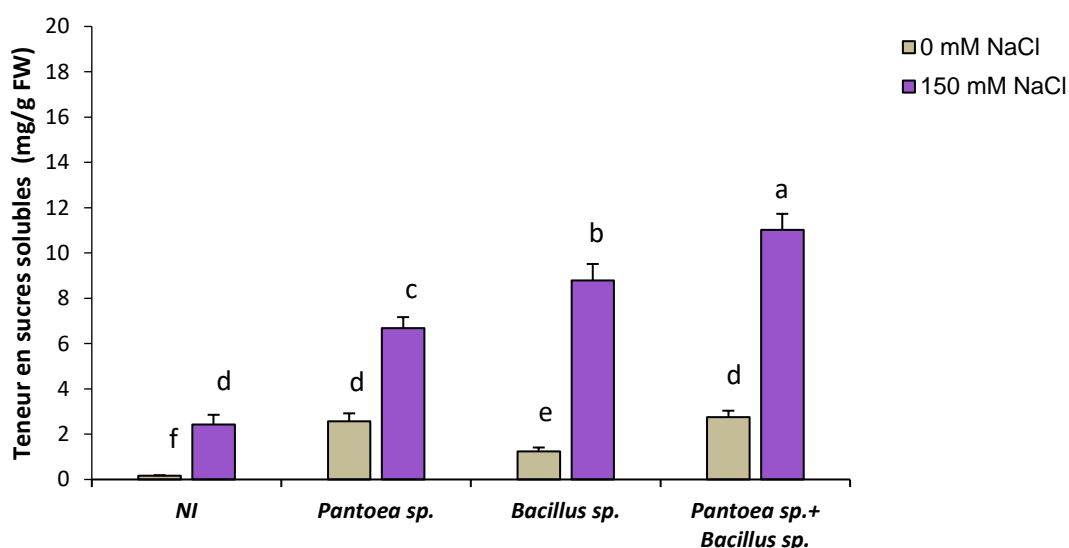


Figure 63. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la teneur en sucres solubles des feuilles des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

Les niveaux de sucres solubles évoluent de la même manière dans les plantes traitées par les PGPB (simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou double inoculation). Les teneurs augmentent mais varient selon la nature de l'inoculation bactérienne. A 0mM, la teneur la plus faible est notée chez les plantes inoculées par *Bacillus sp.* ($1,23 \pm 0,17$ mg/g MF), celle-ci devient importante chez les plantes traitées par *Pantoea sp.* ou les deux souches

combinées pour atteindre une valeur respective de $2,57 \pm 0,34$ mg/g MF et $2,75 \pm 0,27$ mg/g MF. Sous la concentration saline de 150mM, la teneur en sucres est de $6,68 \pm 0,48$ mg/g MF en présence de *Pantoea sp.* qui devient encore plus prononcée suite aux traitements bactériens par *Bacillus sp.* et la double inoculation avec une valeur de $8,78 \pm 0,72$ mg/g MF et de $11,02 \pm 0,70$ mg/g MF.

Le dosage des sucres solubles met en évidence de fortes différences dans leur accumulation entre les plantes témoins NI (0mM) et les plantes stressées NI, entre celles-ci et les plantes stressées et inoculées et entre les plantes témoins NI et les plantes inoculées. Cette variabilité entre les différents traitements est confirmée par l'analyse de la variance ($P < 0.05$) comme étant une variabilité significative.

Les sucres solubles contribuent à la préservation des molécules biologiques et des membranes (Bohnert et Sheveleva 1998 ; Li et Jiang, 2017). Dans notre étude, le contenu en sucres solubles au niveau foliaire a augmenté de manière significative avec l'application du stress salin. Nos résultats sont conformes à ceux de Hajihashemi et al. (2006) ; Pattanagul et Thitisaksakul (2008) ; Gandonou et al. (2011) ; Bouzroud et al. (2020) et El Mamoun et al. (2023). D'après un certain nombre d'auteurs, un changement d'activités enzymatiques en relation avec le métabolisme glucidique serait à l'origine de cette accumulation des sucres solubles dans les feuilles. Ainsi, Udomchalothorn et al. (2009) observent chez les plantes de riz soumises à un stress salin une diminution de l'activité du fructose 2-6- biphosphate (F26BP), conduisant à une accumulation de sucres et contribuant ainsi à l'augmentation de la tolérance au sel chez certaines variétés en augmentant l'osmolarité interne des cellules et les réserves disponibles en carbone. Plus intéressant encore, l'application bactérienne a entraîné une forte accumulation de sucres solubles dans des conditions normales et de stress salin. Cette constatation a déjà été mise en évidence dans plusieurs études (Singh et Jha, 2016 ; Li et Jiang, 2017 ; Shultana et al., 2020b). Ainsi, l'augmentation des sucres solubles en présence de *Bacillus sp.* et de *Pantoea sp.* seuls ou en combinaison pourrait constituer un mécanisme adaptatif pour maintenir le potentiel osmotique en présence de concentrations toxiques de NaCl. Des travaux sur la culture de l'orge sous stress salin (5g/l, 10g/l de NaCl) ont montré que la teneur en sucres solubles totaux augmentait. L'inoculation bactérienne par *Bradyrhizobium sp.* (Lotus) a significativement amélioré le taux des sucres en guise de protéger et d'assurer la survie des plants d'orge sous stress salin (Bouchenak et al., 2019). D'autres études faites sur le blé ont signalé que l'inoculation par *Bacillus subtilis* et *Arthrobacter sp.* (Upadhyay et al., 2012) et par *Klebsiella sp.* (Sagar et al., 2016) augmentait

la teneur en sucres solubles totaux en cas de stress salin. Ainsi, les fortes teneurs en sucres solubles enregistrées suite à la simple ou à la double inoculation des plantes cultivées en présence de NaCl laissent suggérer une meilleure tolérance de ces plantes vis-à-vis du stress salin.

4.3.2. Teneur en chlorophylles

4.3.2.1. Teneur en chlorophylle a

Le taux de chlorophylle **a** est affecté lors de l'application du stress salin. En effet, la teneur connaît une réduction hautement significative de l'ordre de 50%, le taux de chlorophylle **a** passe de $114,77 \pm 10,7$ mg/g MF (plantes cultivées à 0mM de NaCl) à $57,63 \pm 1,41$ mg/g MF (Fig. 64). Ces résultats sont conformes à ceux observés par Cengiz *et al.* (2009) sur *Capsicum annum* et par Kaya *et al.* (2001) sur *Solanum lycopersicum*. Selon Grattan et Grieve (1994), le sel a un effet antagoniste sur l'assimilation de l'azote (N), élément essentiel de la structure de la molécule de chlorophylle.

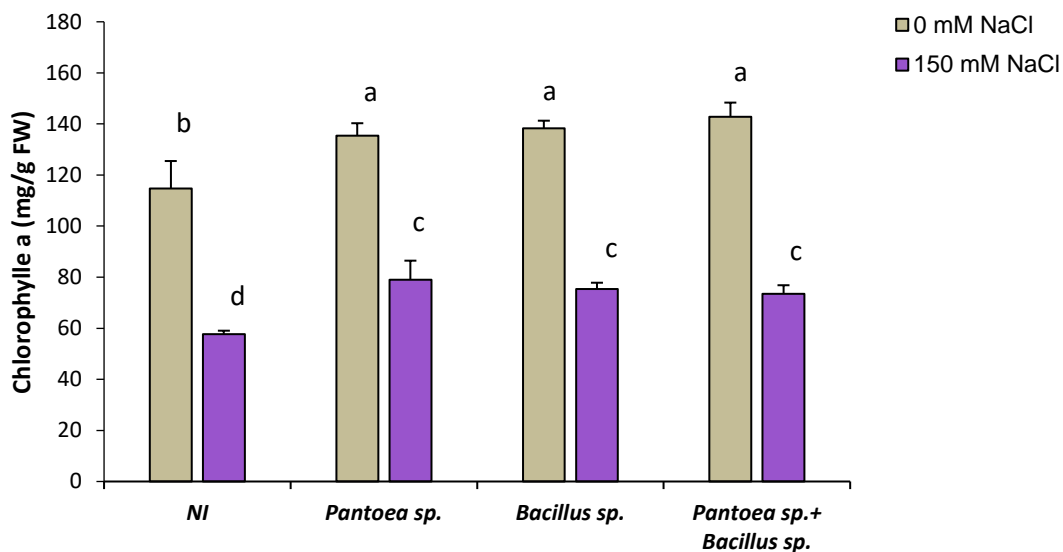


Figure 64. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la teneur en chlorophylle **a** des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

Les résultats concernant la teneur en chlorophylle **a** dans des conditions normales montrent clairement que l'inoculation simple par *Pantoea sp.* ou par *Bacillus sp.*, ainsi que la co-inoculation a induit une augmentation significative de la teneur en chlorophylle **a** par rapport aux plantes témoins NI. Cette augmentation est de l'ordre de 18,01% pour *Pantoea sp.*, de

20,63% pour *Bacillus sp.* et de 24,42% pour la co-inoculation (figure 69). L'analyse de la variance a révélé l'effet significatif de l'inoculation bactérienne sur le taux de la chlorophylle **a** indépendamment du type d'inoculation, chez les plantes témoins (0mM). La teneur la plus haute ($142,80 \pm 5,55$ mg/g MF) est obtenue avec la double inoculation. Une augmentation significative de la teneur en chlorophylle **a** par rapport au témoin est également signalée chez les plantes soumises à 150mM de NaCl et inoculées par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou les deux combinées. Le traitement avec *Pantoea sp.* affiche la teneur la plus élevée soit $78,96 \pm 7,50$ mg/g MF (Fig. 69) contre $57,63 \pm 1,41$ mg/g MF.

Dans une étude menée par Ali et al. (2017) sur le maïs, les auteurs ont révélé que l'inoculation des plantes par *Bacillus sp.* favorisait de manière significative la production de la chlorophylle **a**, ce qui suggère une meilleure capacité photosynthétique chez les plants inoculés et donc une croissance plus vigoureuse et une production accrue de biomasse. L'analyse du mode d'action des bactéries a montré qu'elles étaient capables de produire des sidérophores, des molécules qui chélatent le fer et facilitent son absorption par les racines des plantes, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la chlorophylle **a** (Figueiredo et al., 2010) dont la biosynthèse dépend, entre autres, de cet oligoélément (Balakrishnan et al., 2000). De plus, ces bactéries ont démontré une capacité à solubiliser le phosphate, augmentant ainsi la disponibilité de cet élément crucial pour la croissance des plantes (Martinez et al., 2018).

Par ailleurs, l'inoculation des plants de tomate cv Interland F1 soumis à un stress salin (50mM de NaCl) avec *Bacillus sp.* a révélé des résultats contradictoires aux nôtres (Yilmaz et al., 2020). En effet, ces chercheurs ont constaté que l'inoculation par *Bacillus sp.* diminuait le taux en chlorophylle **a** de 9,13%. Ces résultats soulèvent des questions sur l'efficacité de ces bactéries spécifiques dans le contexte du stress salin et suggèrent que d'autres stratégies d'inoculation ou combinaisons de bactéries pourraient être nécessaires pour améliorer la réponse des plantes de tomate aux conditions stressantes du sol salin. Des recherches supplémentaires sont essentielles pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces observations et pour développer des approches plus efficaces en vue d'améliorer la tolérance des cultures de tomate au stress salin.

4.3.2.2. Teneur en chlorophylle b

La figure 65 illustre le résultat des teneurs en chlorophylle **b**, des plants de la variété Campbell 33 cultivées en conditions normales et de stress salin. Nous avons constaté que le sel (150mM) réduisait la teneur en chlorophylle **b** de 34,25% en comparaison avec les plantes

témoins. La mono-inoculation des plantes témoins par *Pantoea sp.* ou par *Bacillus sp.* engendre une diminution des teneurs en chlorophylle **b**. L'inoculation par *Bacillus sp.* a provoqué une réduction de 13,47 %, tandis que l'application de *Pantoea sp.* a entraîné une baisse moindre de l'ordre de 5,65 %. Néanmoins, la co-inoculation a montré plutôt un effet positif par rapport à la simple inoculation, soit une augmentation de 35,29% chez les plantes témoin NI (Fig. 70).

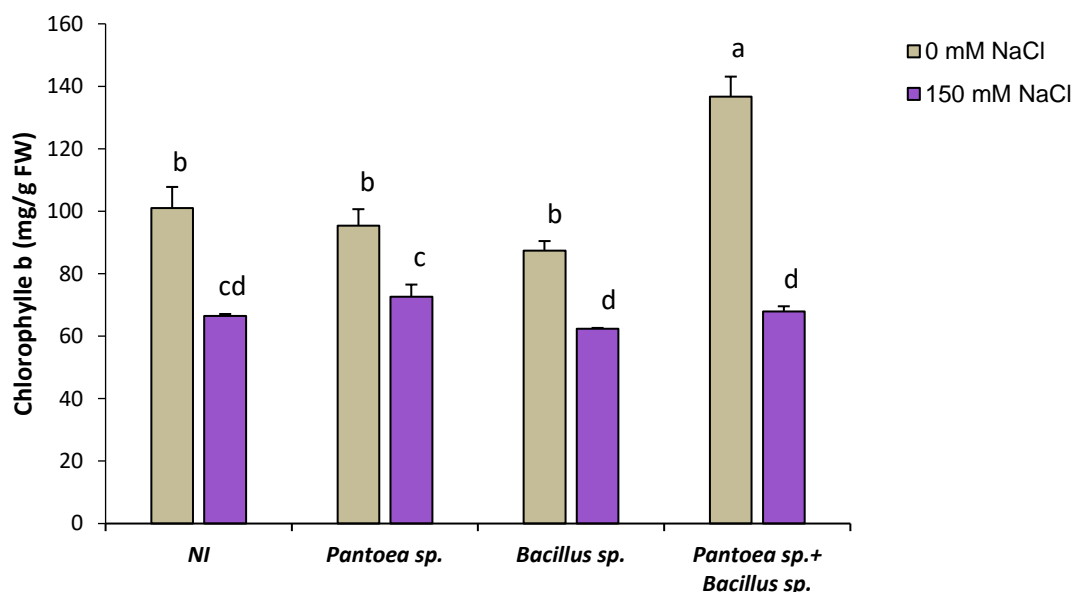


Figure 65. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la teneur en chlorophylle **b** des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

Ali et *al.* (2017) ont examiné les effets de l'inoculation par *Bacillus sp.* sur la croissance de plants de tomate en conditions normales et ont rapporté que l'inoculation de cette bactérie augmentait la teneur en chlorophylle **b** de 75% ce qui n'est pas compatible avec nos résultats. Cependant, en conditions de salinité, les traitements n'ont pas démontré d'effet significatif sur la teneur en chlorophylle **b** chez les plantes de tomate. Plus spécifiquement, l'inoculation par *Pantoea sp.* et la double inoculation avaient entraîné une augmentation de la teneur respective de 9,34% et de 2,19% alors que le traitement des plantes par *Bacillus sp.* avait provoqué une diminution de 6,15%, par rapport aux plantes témoins stressées. Les résultats d'une étude menée par Yilmaz et *al.* (2020) ont montré que l'inoculation de la tomate cv Interland F1 avec *Bacillus sp.* sous un stress salin (50 mM) n'impactait pas la teneur en chlorophylle **b**, au contraire, elle a induit une réduction de l'ordre de 10,67%. Une étude faite sur le blé a signalé

que la mono-inoculation par *Pantoea agglomerans* ou *Bacillus cereus* améliorerait la teneur en chlorophylle **b**, en conditions de stress salin (Cherif, 2018).

4.3.2.3. Teneur en chlorophylle totale

Quant à la chlorophylle totale (**a+b**), nous remarquons que les plantes témoins (0mM de NaCl) enregistrent une teneur égale à $206,96 \pm 9,5$ mg/g MF tandis que cette teneur en chlorophylle totale diminue presque de moitié chez les plantes soumises à 150mM de NaCl (Fig. 66). Nous en déduisons que la salinité affecte sévèrement le taux de chlorophylle totale. Ces faits sont comparables à ceux observés chez le blé tendre chez qui le stress salin a engendré une chute brutale de la teneur en chlorophylle totale (Moustaine et al., 2019).

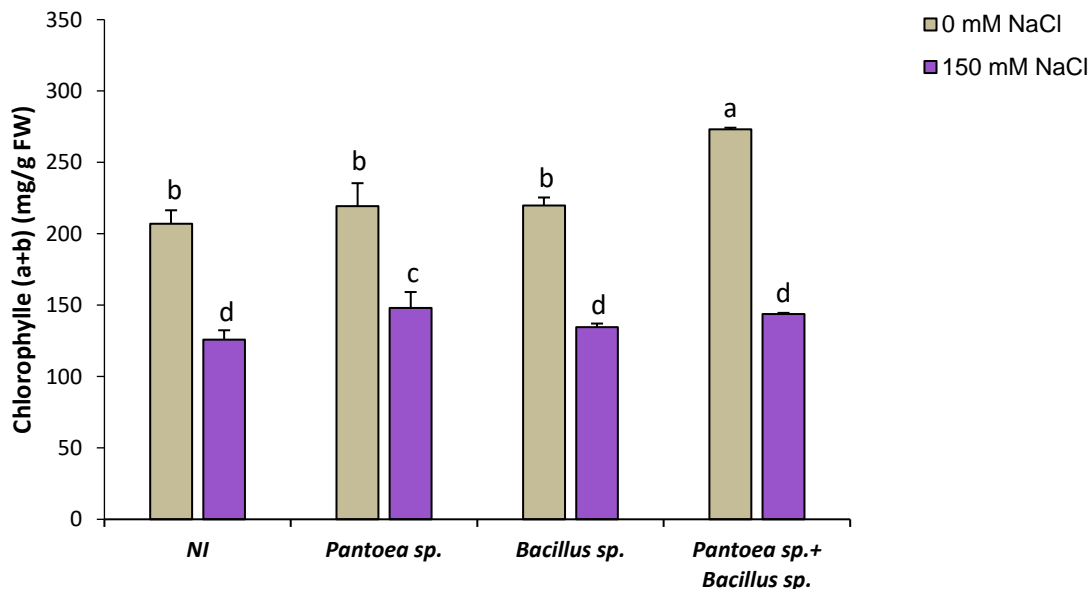


Figure 66. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la teneur en chlorophylle (a+b) des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

D'un autre côté, la figure 66 illustre les résultats relatifs aux teneurs en chlorophylle totale enregistrées par les plantes inoculées non soumises au stress salin. La simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* et la co-inoculation ne montrent pas un effet positif, les deux bactéries endophytes améliorent légèrement la teneur en chlorophylle totale (6%) pendant que, la co-inoculation marque une hausse équivalente à 31,98%. Cependant, selon l'analyse de la variance, l'élévation des teneurs en chlorophylle totale n'est significative que par la double inoculation. En présence de stress salin, la simple inoculation par *Bacillus sp.* et la co-inoculation engendrent une augmentation non significative de la teneur en chlorophylle totale

chez les plantes inoculées, soit 6,84% et 14,25% respectivement par rapport aux plantes témoins (figure 66) alors que le traitement par *Pantoea sp.* induit une hausse significative équivalente à 17,67%.

Des expériences en pot ont été menées par Kumar et ses collaborateurs (2016) sur du riz (variété CSR46) à différentes concentrations de NaCl (0, 50, 100, 200 et 300 mM) avec et sans inoculation par la souche *Bacillus pumilus*.JPVS11. Des concentrations élevées de NaCl ont eu des effets néfastes sur la teneur en chlorophylle totale chez les plantes non inoculées. Toutefois, après inoculation, le taux de chlorophylle totale a été amélioré, la croissance du riz a été plus performante par rapport à celle du riz non inoculé dans des conditions similaires de salinité.

D'une manière générale, la teneur en chlorophylle peut être influencée par l'âge et la position des feuilles, ainsi que par des facteurs environnementaux tels que la lumière, la température et la disponibilité en eau (Hikosaka et al., 2006). Slama rapporte en 2004 que l'effet de NaCl sur la photosynthèse s'exerce par une baisse de la teneur en chlorophylle, et une diminution de la surface foliaire. Levitt (1980) explique la dégradation de la chlorophylle foliaire sous l'effet du stress salin par la destruction des pigments chlorophylliens et l'instabilité du complexe pigmentaire protéique due à un excès d'ions Na⁺ et Cl⁻. Cet excès entraîne un déséquilibre ionique intracellulaire et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, conduisant à des lésions membranaires et à une restriction de la photosynthèse (He et al., 2020). De plus, diverses études ont rapporté que la salinité réduit la teneur des pigments chlorophylliens chez plusieurs espèces, comme c'est le cas chez le tournesol (El Midaoui et al., 2007), la luzerne (Ibriz et al., 2007), l'orge (Cheikh et al., 2008), le haricot (Taïbi et al., 2016) et l'olivier (Ben Abdellah et al., 2018).

4.3.3. Teneur en anthocyanes

Les anthocyanes sont des métabolites secondaires (pigments) responsables de la coloration rouge, bleue ou violette que l'on trouve dans de nombreux organes végétaux, notamment les feuilles, les fleurs et les fruits (Tanaka et al., 2008). Au niveau cellulaire, les anthocyanes sont biosynthétisées à la face externe du réticulum endoplasmique (RE), puis transportées et accumulées dans la vacuole. Leur production est étroitement régulée par divers facteurs environnementaux, notamment les stress biotiques (infections fongiques ou bactériennes) et abiotiques (stress hydrique, salin, thermique, etc.).

La figure 67 illustre la variation de la teneur en anthocyanes chez les plants de tomate soumis au stress salin avec ou sans inoculation par *Pantoea sp.* ou par *Bacillus sp.* ou par l'association des deux souches. A 0mM, la teneur en anthocyanes chez les plants non inoculés (NI) est faible), tandis qu'elle augmente significativement suite à une inoculation par *Pantoea sp.* 0,11 Abs/mg MF, par *Bacillus sp.* 0,09 Abs/mg MF et par la double inoculation 0,22 Abs/mg MF. Autrement dit, en l'absence du stress salin la teneur en anthocyanes s'est élevée de 175% (*Pantoea sp.*), de 125% (*Bacillus sp.*) et de 450% (double inoculation), même en l'absence de stress salin.

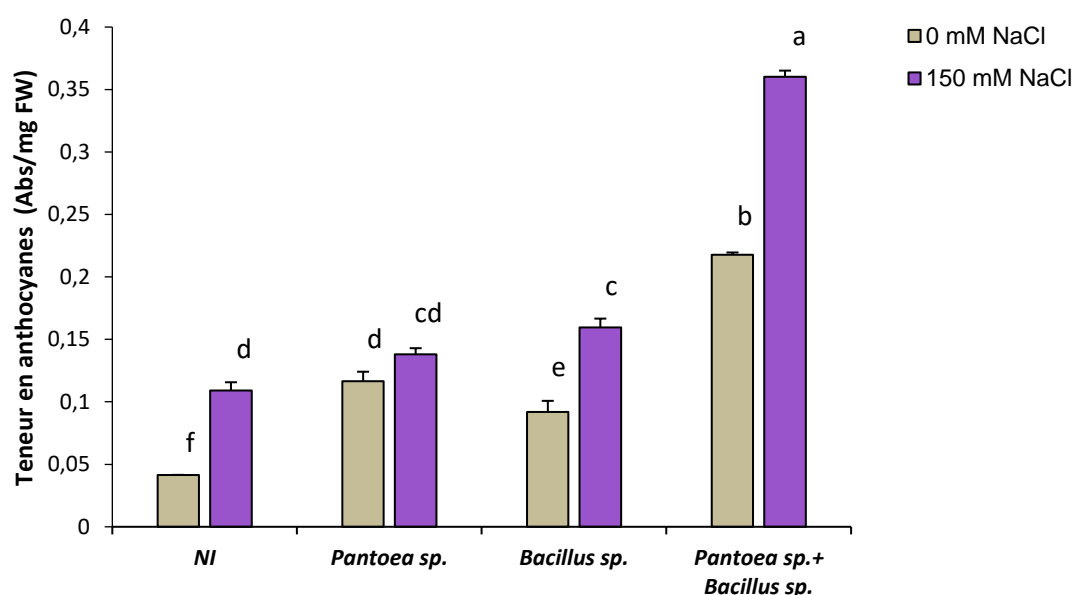


Figure 67. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la teneur en anthocyanes des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

En présence d'une concentration de 150 mM de NaCl et en l'absence de toute inoculation, la production d'anthocyanes est très élevée, elle atteint une valeur de $0,10 \pm 0,006$ Abs/mg MF, voire une hausse de 143,9% par rapport au témoin. Cette élévation significative est encore plus accentuée suite à une inoculation par les bactéries endophytes. Effectivement, la simple inoculation par *Pantoea sp.* déclenche une production de $0,13 \pm 0,005$ Abs/mg MF, *Bacillus sp.* encore plus, $0,15 \pm 0,007$ Abs/mg MF et enfin la double inoculation a été plus performante réalisant une production accrue de pigments anthocyaniques, $0,36 \pm 0,005$ Abs/mg MF, soit une augmentation de 260%.

Au terme de cette étude, nous relevons des teneurs accrues en anthocyanes au niveau des feuilles et ce dans toutes les conditions de culture. Ces pigments jouent un rôle important dans la protection des plantes contre les agressions biotiques et abiotiques. Cette protection se manifeste par l'absorption des rayons UV afin de préserver l'ADN et les protéines cellulaires. En effet, comme tous les phénols, les anthocyanosides et leurs aglycones possèdent des groupes hydroxyles phénoliques, Ar-OH, capables de fournir aux radicaux libres des protons afin de les neutraliser, permettant ainsi d'atténuer les dommages photo-oxydatifs (Gould, 2004 ; Jabnourne, 2008 et Garriga et *al.*, 2014). Des études antérieures ont montré que la teneur en anthocyanes augmente en réponse à l'excès de sel (Piao et *al.*, 2001 ; Eryilmaz, 2006 ; Daneshmand et *al.*, 2010 ; Garriga et *al.*, 2014).

L'inoculation bactérienne pourrait être considérée comme une menace biotique, ce qui expliquerait les quantités élevées enregistrées en l'absence de stress. Toutefois, ces quantités sont encore plus élevées en réponse à l'application du stress salin. Nos résultats corroborent ceux de Hanif et *al.* (2014) qui ont montré qu'en absence de stress salin, le taux des anthocyanes augmentait de manière significative chez les plantes de tomate inoculées par *Bacillus sp.* par rapport aux plantes témoins. Plus tard, Trinh et *al.* (2018) ont justifié l'augmentation de la teneur de ces pigments par la stimulation des voies de biosynthèse entraînant leur accumulation chez les plantes. En effet, ils ont montré à travers l'analyse de la qRT-PCR, une sur-expression des gènes clés impliqués dans la biosynthèse des anthocyanes à savoir F3'H, DFR, et PAP1. Ainsi, il semblerait que la plante perçoit les PGPR comme une menace et réagit en augmentant la quantité d'anthocyanes qu'elle produit.

4.3.4. Teneur relative en eau des feuilles

Afin d'évaluer l'état hydrique des plantes de la variété Campbell 33, nous avons suivi les variations de la teneur relative en eau (TRE ou RWC) des feuilles du même rang (généralement 5^{ème} feuille), récoltées après 6 semaines de croissance et semaine 3 de stress.

Selon la figure 68, les plants de tomate subissant un stress salin (150mM) connaissent une déperdition intense de la TRE foliaire. Dans ce sens, la TRE qui était de 68,42% à 0mM et de 42,88 % à 150mM, enregistrant ainsi une perte en eau de 37%. En revanche, une augmentation de la TRE est observée après une inoculation bactérienne. Celle-ci par *Pantoea sp.* fait augmenter la TRE à 71,84 %, soit une amélioration de 4,99% par rapport au témoin et celle par *Bacillus sp.* suscite une perte de la TRE de 3,85%. Dans les deux situations, la variation de la teneur relative en eau n'est pas significative selon l'analyse de la variance.

Inversement, les plantes soumises à la co-inoculation montrent une capacité de rétention d'eau foliaire très appréciable. En effet, la TRE est de 80,10%, correspondant à une augmentation de 17,07% par rapport aux plants témoins. D'après ces résultats, il semble que la co-inoculation par *Pantoea sp.* et par *Bacillus sp.* est efficace pour restaurer la teneur relative en eau des feuilles de la variété Campbell 33.

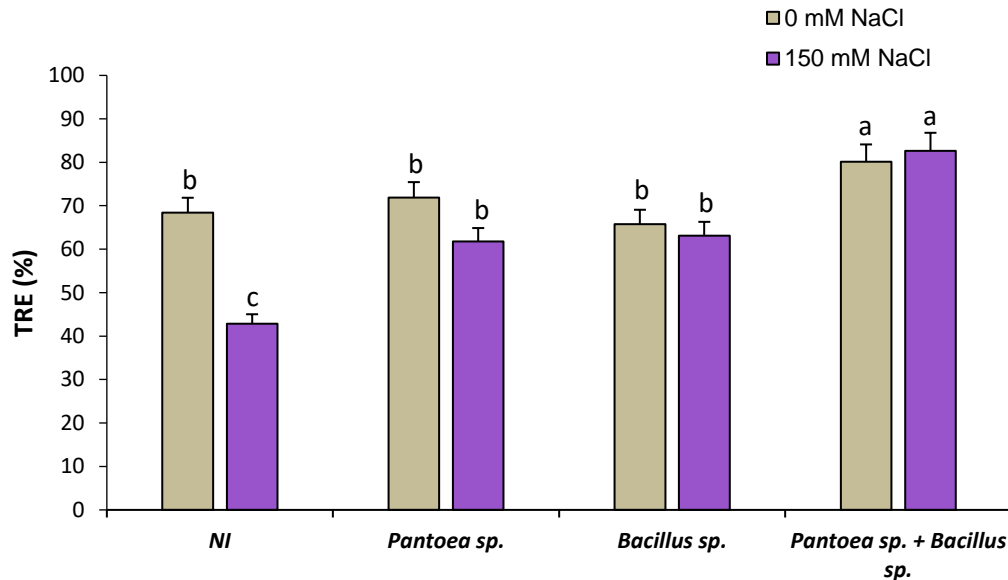


Figure 68. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur la teneur relative en eau foliaire (TRE) des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

En condition de stress, le test de Tukey a fait apparaître des différences significatives entre les teneurs relatives en eau des feuilles chez les plantes témoins en comparaison avec les plantes inoculées. Tous les traitements bactériens ont un impact positif sur la TRE qui connaît une élévation de 44,05%, 47,22% et 92,74% respectivement par *Pantoea sp.*, *Bacillus sp.* et par la double inoculation. Ce dernier traitement a fait augmenter la TRE de plus de 50% par rapport aux plantes stressées NI.

Plusieurs études ont mentionné l'impact négatif du stress salin sur les paramètres physiologiques des plantes et leur croissance globale (Yildirim et al. 2008 ; Yasin et al. 2018 ; Khalifa et al. 2021 ; Kumar et al. 2021 ; Khan et al. 2022). L'évaluation du potentiel hydrique d'un végétal se fait par la mesure de la teneur relative en eau des feuilles, il diminue par l'installation d'un stress salin. Effectivement, rappelons que les teneurs relatives en eau enregistrées sont de 68,42% et de 42,88% pour 0mM et pour 150mM respectivement. Afin de contourner le manque d'eau dans les tissus, l'absorption hydrique est maintenue même si elle

est basse, pour pouvoir diluer les sels qui s'infiltrent à l'intérieur de la plante. Nos observations rejoignent celles de plusieurs auteurs selon lesquels la salinité engendre des fluctuations au niveau de l'état hydrique du végétal (Hasegawa, 2000 et Fricke, 2002) et diminue la teneur relative en eau des feuilles (Albouchi, 2003). La réduction du statut hydrique est liée à un mécanisme d'ajustement osmotique qui permet de conserver le déplacement de l'eau vers les feuilles et d'assurer en conséquence leur turgescence (Morgan, 1983). Des travaux sur l'impact du stress salin sur le potentiel hydrique de plusieurs espèces ont montré que plus la concentration en sel du milieu s'intensifie plus la teneur relative en eau est réduite, c'est le cas de *Casuarina glauca* (Mefti et al., 2000 et Albouchi, 2003), de la luzerne (Ykhlef, 2001) et du blé (Adjab, 2002).

L'augmentation de la TRE dans des conditions de stress salin après application de souches bactériennes a été rapportée précédemment dans divers travaux, notamment ceux de Arora et al. (2011), de Cedeño-García et al. (2018), de Ansari et al. (2019) et de Shultana et al. (2020a). Les bactéries PGPR synthétisent en conditions de stress abiotiques des osmoprotecteurs afin d'assurer la survie de la plante et soutenir l'équilibre ionique par le biais du transporteur Na^+/K^+ en maintenant le potentiel hydrique (Liu et al., 2017b). Ansari et al. (2019) ont corrélé l'augmentation de l'absorption d'eau à celle de l'allongement des racines observé chez des plantes inoculées comparativement aux plantes non inoculées. Il semblerait que l'inoculation bactérienne ait favorisé le développement du système racinaire, augmentant ainsi l'absorption d'eau et la teneur relative en eau des feuilles.

4.4. Evaluation de certains paramètres liés à la productivité des plantes de tomate

4.4.1. Nombre de fruits par plante

Le comptage de ce paramètre est réalisé au niveau de chaque plante et par traitement. Les résultats relatifs au nombre de fruits produits par plante sont représentés dans la figure 74.

La salinité induit une réduction du nombre de fruits qui passe d'une moyenne de 3,42 fruits chez le témoin (0mM) à 2 à 150mM de NaCl. Le sel a donc réduit la production de fruits mais les résultats statistiques montrent une influence non significative pour la contrainte saline.

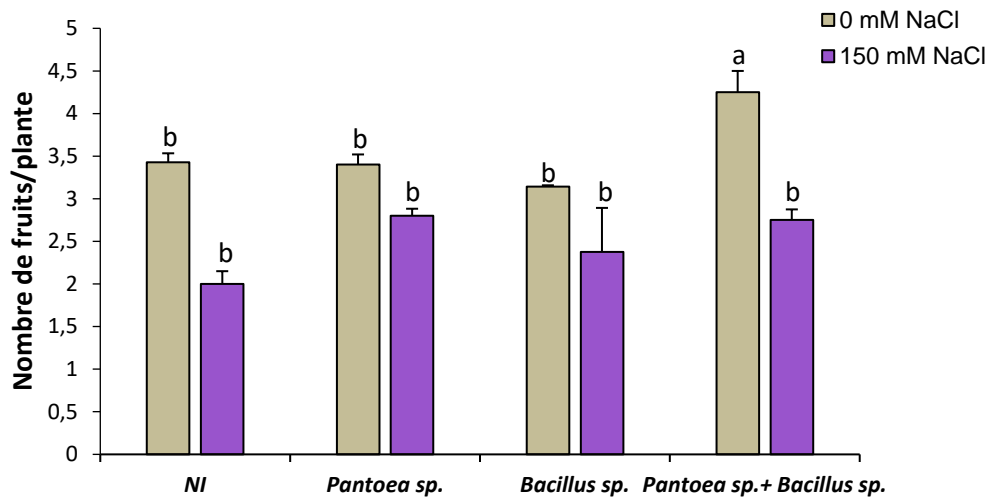


Figure 69. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le nombre de fruits/plante des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

Par ailleurs, la réponse des plantes aux traitements bactériens est variable. De ce fait, en absence de sel (0mM), l'inoculation n'est bénéfique que par la combinaison des deux souches qui engendre une augmentation significative de 24,26%. La significativité de ce résultat pourrait être expliquée par une interaction positive entre la variété Campbell 33 et l'association des deux bactéries.

En condition saline, la mono-inoculation par *Pantoea sp.* a enregistré le nombre moyen le plus élevé qui est de 2,8 fruits, celle par *Bacillus sp.* a donné une moyenne égale à 2,37 fruits et enfin la double inoculation a affiché une moyenne de 2,75 fruits, cependant l'analyse de la variance montre que cette hausse est non significative par rapport au nombre moyen de fruits produits par les plants témoins NI.

Lors de cette étude, nous avons constaté que les plants de tomate sont plus rentables en fruits quand ils sont sous un traitement bactérien que s'ils ne l'étaient pas. La présence de souches bactériennes seules ou en combinaison dans le substrat de culture a provoqué une augmentation du nombre de fruits chez les plantes inoculées à 150mM comparativement aux plantes témoins même si cette augmentation n'est pas significative. Nos résultats corroborent ceux de Nakahara et *al.* (2022) qui ont mis en évidence l'existence d'une corrélation positive entre l'inoculation bactérienne et le nombre de fruits, puisque la réduction du nombre de fruits induite par le sel a été atténuée par l'inoculation bactérienne, entraînant un rendement plus élevé dans des conditions de croissance défavorables. Cet effet positif et stimulateur coïncide avec l'élaboration importante d'une biomasse racinaire chez les plantes stressées et inoculé.

4.4.2. Poids frais des fruits par plante

Le poids frais des fruits par plante est obtenu par la pesée de chaque fruit au moment de la récolte. Les résultats sont présentés dans la figure 70. L'analyse de la variance a montré une différence significative des moyennes pesées entre les plantes témoins et les plantes stressées sachant que les plantes à 0mM ont donné des fruits d'un calibre supérieur à celui des fruits obtenus à 150mM, enregistrant une masse de $30,99\text{g} \pm 1,40$ contre $18,53\text{g} \pm 2,17$.

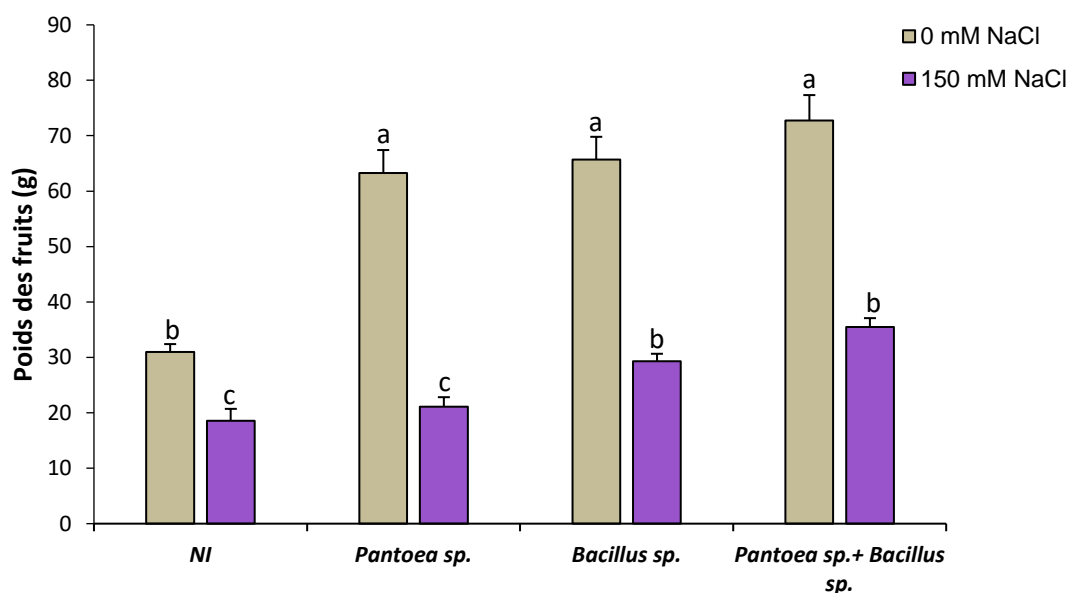


Figure 70. Effet de la simple inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* ou la double inoculation par les deux souches bactériennes sur le poids moyen des fruits produits par des plantes de tomate cultivées en absence et en présence de NaCl. Les barres représentent les moyennes \pm SD d'au moins six répliques biologiques. Les valeurs avec des lettres différentes indiquent des différences statistiques selon le test de Tukey ($p < 0,05$).

Par ailleurs, l'inoculation des plantes qu'elle soit simple ou double, a affecté positivement et significativement le poids des fruits qui a dépassé le double du poids manifesté par le témoin cultivé à 0mM. En effet, le poids moyen optimal est obtenu suite à la co-inoculation ($72,75\text{g} \pm 4,57$) suivi de celui exprimé par *Bacillus sp.* ($65,72\text{g} \pm 4,08$) et enfin celui obtenu par *Pantoea sp.* ($63,25\text{g} \pm 4,16$). Sous stress salin, la simple inoculation par *Pantoea sp.* a suscité une augmentation non significative de 13,81% en comparaison avec le témoin. A l'opposé, *Bacillus sp.* et la double inoculation ont engendré une amplification de poids respective de 58,12% et de 91,58%.

La présente étude a montré que le stress salin n'a pas affecté significativement le nombre de fruits chez la variété Campbell 33. Cependant, Kinsou et *al.* (2021) ont rapporté que le stress salin diminuait le nombre et la masse fraîche des fruits chez la tomate variété Akikon. Selon Martinez et *al.* (2012), le sel réduit le rendement total de fruits en réduisant le poids moyen des tomates, mais le stress salin n'impacte pas le nombre de fruits par plant.

Plusieurs chercheurs ont rapporté que la salinité réduisait le poids des fruits chez des variétés multiples de tomates (Ali et Ismail, 2014 ; Saito et Matsukura, 2014 ; Assimakopoulou et *al.*, 2015, et Zhang et *al.*, 2016 et Abdelgawad et *al.*, 2019). La même étude a été menée sur quelques variétés de piment par Kpinkoun et *al.* (2019), ces investigateurs ont suggéré qu'il y a une diminution du nombre et du poids des fruits à des concentrations croissantes de NaCl. Chez le piment toujours, Navarro et *al.* (2010) ont constaté que la masse de fruits avait baissé tandis que le nombre de fruits avait augmenté. L'effet dépressif de la salinité peut être causé par des difficultés en nutrition hydrique et minérale et par la toxicité des ions accumulés dans la plante (Xiong et Zhu, 2002). La présence de Na⁺ et Cl⁻ en grandes quantités dans le milieu de culture entraîne une compétition au niveau des sites d'absorption de K⁺, Ca²⁺ et NO₃⁻ (Martinez et Laüchli, 1993). Le sodium entre en compétition avec le potassium et le calcium, et le chlorure avec le nitrate, le phosphate et le sulfate (Levigneron et *al.*, 1995). Cette compétition se traduit par une assimilation restreinte de ces nutriments essentiels qui aurait des répercussions néfastes sur la productivité et le poids des fruits (Hajji, 1983). Dans ce contexte, Benzahra et Snoussi (2015) ont réalisé une étude sur la culture de concombre (*Cucumis sativus*), variété super-marketer moyennement sensible à la salinité. Ces chercheurs ont mené la culture dans des eaux salines naturelles et des eaux salines naturelles corrigées par l'addition de nutriments. Ils ont constaté que les plantes irriguées par les eaux salines corrigées donnent un nombre de fruits élevé et de qualité, qui résulte d'un équilibre parfait entre les éléments nutritifs. Van Ieperen (1996), Cuartero et Fernández-Muñoz (1998) et Ali et *al.* (2014) ont démontré dans leurs travaux que le stress salin peut influencer négativement le nombre et la taille des fruits.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Le *Cycas revoluta* appelé communément sagoutier du Japon, est une plante gymnosperme, dioïque, appartenant au genre des Cycadales. Son tronc portant une couronne de belles feuilles de couleur vert foncé brillant fait d'elle une espèce ornementale particulière très recherchée dans le monde entier. Sa multiplication classique par la voie sexuée, est entravée par la dormance des graines qui nécessite une longue durée avant d'être rompue. En plus, la croissance de cette espèce est connue pour être très lente.

Des prétraitements thermiques ont été appliqués aux graines de *Cycas revoluta* pour améliorer leur germination et leur croissance. Les résultats montrent un effet bénéfique des quatre prétraitements testés (T_1 , T_2 , T_3 , T_4), avec des augmentations respectives de 134%, 276%, 300% et 342% par rapport au témoin (T_0). Le temps de germination a été significativement amélioré par tous les prétraitements par rapport au témoin, bien que T_2 , T_3 et T_4 n'aient pas montré de différence significative entre eux. Quant à la cinétique de germination, les résultats ont démontré que c'est le prétraitement T_2 qui a donné le nombre le plus élevé des graines ayant germé et que le traitement T_4 a retardé la germination d'un mois par rapport au témoin T_0 . L'analyse histologique des embryons a révélé des différences structurales entre les différents traitements, expliquant les résultats obtenus. Les embryons prétraités par T_2 ont montré plusieurs différenciations morphologiques, histologiques et cellulaires, notamment l'apparition des méristèmes caulinaire et racinaire et la mise en place du procambium, tissu méristématique chargé de fournir les tissus primaires du système vasculaire. Les embryons issus des prétraitements T_0 et T_1 présentent une structure embryonnaire primitive, marquée par l'absence de structures différenciées. De plus, les embryons prétraités (T_2) ont montré une importante activité catalytique de l'alpha-amylase et une corrélation positive entre cette activité et l'accumulation de sucres solubles. Les quantités d'ABA et de GA_3 ont également varié entre les embryons prétraités (T_2) et non prétraités (T_0), avec des teneurs plus faibles d'ABA et des teneurs légèrement plus élevées de GA_3 chez les graines prétraitées.

Le suivi de la croissance des graines germées pendant 6 mois de culture a permis de déceler des différences dans certains paramètres de croissance, notamment le nombre maximal de feuilles par plante, la largeur du stipe, la longueur de la racine principale entre les plantes issues des différents prétraitements. Il faut noter que le prétraitement n'avait aucun effet sur la longueur de la feuille et du stipe. Bien que ces prétraitements aient pu améliorer certains

paramètres de croissance des plantes de *Cycas*, le problème de la croissance lente de cette espèce persiste toujours. Pour contourner cet obstacle, un enrichissement du substrat de culture par des fertilisants organiques naturels a été réalisé en vue d'explorer le potentiel de ces amendements organiques dans la promotion de la croissance des plantes de *Cycas revoluta*. Le suivi de l'allure de la croissance des plants du *Cycas revoluta* pendant une durée de 6 mois, en absence et en présence du fumier de cheval ou de mouton, a révélé que l'apport de l'un ou l'autre des fumiers au sol de culture, stimule la croissance et le développement des plantules en comparaison avec le sol témoin. Une augmentation significative de la hauteur des plantes, du nombre moyen de feuilles, de la longueur et de la largeur du stipe a été enregistrée suite à l'application du fumier de cheval ou de mouton en comparaison avec le sol témoin, soulignant des différences significatives au seuil de 5% de probabilité. Toutefois, aucune différence significative entre les deux sols fertilisés n'a été enregistrée excepté la densité et la longueur des racines qui se sont montrées plus développées et plus abondantes en présence du fumier de mouton.

L'examen biochimique des feuilles qui a montré que l'addition au sol de culture du fumier de mouton ou de cheval a contribué à une élévation significative des taux des chlorophylles **a**, **b** et **a+b** et a nettement amélioré le fonctionnement du système photosynthétique des feuilles, par rapport aux taux témoins. Nous avons également étudié l'efficacité des traitements organiques du substrat de culture sur le fonctionnement du système photosynthétique des feuilles. Par ailleurs, l'analyse de la composition chimique des racines des plantes de *Cycas revoluta* cultivé en présence du fumier de cheval, a signalé une augmentation en sodium de 30%, en phosphore de 9%, une hausse significative en potassium de 51% et une légère baisse de la teneur en fer et en azote et une réduction hautement significative du taux de zinc (73,5%). De plus, le fumier de cheval a permis une forte concentration des ions potassium dans les feuilles 4 et 2 fois par rapport aux feuilles témoins et celles des plants cultivés sur le sol-fumier de mouton. En se rapportant au fumier de mouton, les racines ont connu une accumulation variable en éléments minéraux, potassium, sodium, phosphate et cuivre et une réduction variable en azote, en fer et en zinc. Cependant, la teneur en azote enregistrée par les feuilles a été améliorée significativement par l'ajout du fumier de mouton au substrat de culture. Les fortes teneurs en éléments nutritifs dans la plante expliquent la promotion de la croissance des plantes cultivées en présence des différents amendements appliqués.

De plus, nous avons détecté l'existence de nodules sur les racines coralloïdes des plants de *Cycas revoluta*. Le nombre de nodules a été très prononcé chez les plantes cultivées sur un sol amendé de fumier de mouton que sur un sol additionné de fumier de cheval. Après analyse, nous avons détecté la présence de cyanobactéries et d'autres bactéries endophytes. L'isolement des cyanobactéries a montré qu'elles sont structurées en trichomes filamenteux regroupés dans une gaine mucilagineuse. La caractérisation moléculaire des souches étudiées (8 isolats) par le séquençage de l'ARNr 16S a montré une forte similarité aux deux genres *Nostoc* et *Desmonostoc*. Les quantités d'EPSs produites par les différentes souches montrent une grande variabilité. Des teneurs élevées en EPSs ont été enregistrées avec les souches CH3C6 et CH5CH3, montrant ainsi le potentiel de ces deux souches de cyanobactéries occupant les racines coralloïdes du *Cycas revoluta*.

Une étude approfondie des bactéries endophytes isolées de *Cycas revoluta*, a pu mettre en évidence l'existence de 20 souches. Dans le but d'employer les bactéries rhizosphériques promotrices de croissance (PGPR) notamment les endophytes dans l'atténuation des effets néfastes engendrés par le stress salin, nous avons réalisé la caractérisation des activités PGP (synthèse d'AIA, production de sidérophores et solubilisation de phosphate inorganique) des bactéries endophytes rencontrées chez *Cycas revoluta*, en absence ainsi qu'en présence de NaCl. L'utilisation des souches les plus performantes comme bio-inoculum pourrait améliorer la tolérance de la tomate variété Campbell 33 au stress salin. Dans un premier temps, l'amplification du gène ADN 16S a révélé une diversité parmi les isolats appartenant aux genres *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Peribacillus*, *Ochrobactrum*, *Staphylococcus* et *Stenotrophomonas*. Un premier criblage sous conditions normales en fonction des trois activités PGP précédemment mentionnées a été réalisé chez les vingt souches pour ne retenir à la fin que six souches *A. tumefaciens* (FC11), FC11GY2, *Bacillus sp.* (FC11P1), *Pantoea sp.* (M42Y), *P. brenneri* (AFC2) et *Bacillus sp.* (B32) comme étant les plus promotrices. Un deuxième criblage concernant les mêmes activités PGP a été mené pour ces six souches sous conditions de stress salin (50mM, 100mM et 120mM). D'après les résultats de ce deuxième criblage, les souches *Pantoea sp.* (M42Y) et *Bacillus sp.* (FC11P1), ont manifesté une production de sidérophores et une synthèse d'AIA importantes ainsi qu'un taux de solubilisation de P plus élevé sous les différentes concentrations de NaCl.

L'inoculation des graines de *Solanum lycopersicum* var. Campbell 33 par les souches *Pantoea sp.* et *Bacillus sp.* a accéléré la germination des graines non soumises au stress salin, débutant après 5 jours, tandis que les graines témoins ont nécessité un temps double pour commencer à germer. Cependant, à mesure que la concentration en sel augmentait, la germination était retardée et le taux de germination diminuait. L'inoculation par *Pantoea sp.* ou *Bacillus sp.* augmenté le potentiel germinatif, avec le traitement par *Pantoea sp.* montrant le meilleur taux de germination dans toutes les conditions salines. Ces souches n'ont pas significativement affecté l'indice de germination sous stress salin par rapport au témoin. Bien que le temps moyen de germination ait été fortement influencé par le stress salin, les traitements bactériens ont réduit ce temps à partir de 120mM de NaCl par rapport au témoin.

La concentration saline de 150mM a eu un effet négatif sur les paramètres de croissance des plants de tomate. De ce fait, ces dernières ont connu une réduction de la hauteur de la tige, de la densité racinaire, du nombre moyen de feuilles par plante et de la surface foliaire, pourtant la longueur de la racine principale n'a pas été affectée par le sel. En plus, la présence de celui-ci a montré un changement dans la couleur des folioles qui sont devenus vert pale soulignant un jaunissement accompagné d'une chlorose. Par ailleurs, les trois traitements bactériens se sont révélés efficaces pour l'allongement de la tige, en conditions normale et saline. La simple ou la double inoculation bactérienne a eu par contre un effet bénéfique sur les différents paramètres de croissance, en particulier le nombre de feuilles, la surface foliaire, le poids sec de la partie aérienne et racinaire ainsi que le ratio (partie aérienne/racinaire).

Les sucres solubles s'accumulent dans les feuilles de tomate sous stress salin, avec une augmentation encore plus marquée chez les plantes stressées et inoculées par rapport aux plantes non stressées. De plus, le stress salin stimule la production d'anthocyanes, et les plantes sous stress montrent des niveaux significativement plus élevés que les témoins. Les taux de chlorophylle sont réduits par le stress salin, mais la double inoculation entraîne une augmentation significative de la chlorophylle totale. La teneur en eau foliaire diminue avec le stress salin, mais les plantes inoculées accumulent plus d'eau, en particulier avec la double inoculation. Le stress salin diminue également le rendement et la masse des fruits de tomate, mais les traitements bactériens, surtout la double inoculation, peuvent atténuer ces effets négatifs.

Au terme de cette étude, il ressort que la germination de l'espèce *Cycas revoluta* est sensible à la chaleur surtout au traitement thermique de 30°C pendant une durée de 2mois. Bien que la stratification thermique ait pu améliorer le développement de l'embryon et la germination de celui-ci, la présence d'un tégument coriace peut réduire l'efficacité de cette méthode. Ainsi, il serait intéressant de tester l'effet combiné de la scarification (chimique et physique) et la stratification thermique sur la levée de la dormance des graines de *Cycas revoluta*.

La croissance et le développement des plants de *Cycas revoluta* réagissent favorablement aux amendements organiques ajoutés au substrat de culture, en particulier le fumier de cheval et de mouton. Cet effet bénéfique a été expliqué par la richesse de ces deux amendements en éléments nutritifs nécessaires pour un bon développement des plantes. Ceci peut être amélioré par l'apport d'autres amendements au substrat de culture tels le biochar, les boues d'épuration des eaux usées seules ou mélangées au fumier.

Cycas revoluta développe des racines particulières en forme de corail, appelées racines coralloïdes. Ces racines ont la particularité de renfermer des cyanobactéries et d'autres bactéries endophytes. Le présent travail a permis l'identification de souches cyanobactériennes et d'autres endophytes. Certaines de ces souches présentent un fort potentiel de promotion de la croissance des plantes. Ainsi, il serait pertinent de tester la biomasse et l'extrait aqueux des souches cyanobactéries seuls ou en combinaison avec les souches endophytes les plus performantes en tant que biofertilisants des cultures en conditions normales de stress salin. Des traitements hormonaux (acide abscissique et auxine) peuvent être également envisagés pour réduire les effets délétères du stress salin sur la culture de tomate.

La tomate est une plante appréciée pour son fruit, qui est consommé dans de nombreuses préparations culinaires en raison de sa polyvalence, de sa saveur et de sa texture. Le présent travail a montré l'efficacité de la simple et la double inoculation dans la promotion de la croissance et le développement des plants de tomate cultivés dans les conditions normales et de stress salin. Ceci s'est manifesté également au niveau de la productivité de ces plantes. En effet, nous avons noté une hausse significative de la masse fraîche des fruits en conditions normales et stressantes. En perspectives, il serait intéressant d'évaluer la qualité nutritionnelle des fruits à travers la quantification de sucres totaux, de protéines et la détermination des concentrations en vitamines (B₆, B₁₂ et C) et en pigments caroténoïdes (lycopène et β -carotène).

Ce travail a permis de mettre la lumière sur l'importance des microorganismes, en particulier des bactéries endophytes dotées d'activités PGPs dans la promotion de la croissance des plantes. Parmi celles-ci, les souches *Pantoea sp.* et *Bacillus sp.*, utilisées comme inoculum, ont réussi à atténuer l'effet négatif du stress salin sur la germination et la croissance de la variété de tomate Campbell 33. En ce qui concerne la germination, la souche *Pantoea sp.* s'est révélée la plus performante, tandis que dans les paramètres de croissance, physiologiques et biochimiques testés, la co-inoculation par les deux souches a donné les meilleurs résultats. D'où la nécessité de valoriser et de confirmer les résultats obtenus *in vitro* et sous serre par une application dans le champ, afin d'exploiter ses ressources naturelles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- Abbad, M., Snoussi, S. A., Djerdjouri, A., and Ghanem, B. N. (2019). Comparative effect of two varieties of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to salinity.
- Abbas, G., Khattak, J., Mir, A., Ishaque, M., Hussain, M., Wahedi, H., et al. (2012). Effect of organic manures with recommended dose of NPK on the performance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Anim. Plant. Sci* 22, 683–687.
- Abdallah, M. B., Trupiano, D., Polzella, A., De Zio, E., Sassi, M., Scaloni, A., et al. (2018). Unraveling physiological, biochemical and molecular mechanisms involved in olive (*Olea europaea* L. cv. Chétoui) tolerance to drought and salt stresses. *Journal of plant physiology* 220, 83–95.
- Abdel-Farid, I. B., Marghany, M. R., Rowezek, M. M., and Sheded, M. G. (2020). Effect of Salinity Stress on Growth and Metabolomic Profiling of *Cucumis sativus* and *Solanum lycopersicum*. *Plants* 9, 1626.
- Adekiya, A. O., Ejue, W. S., Olayanju, A., Dunsin, O., Aboyeji, C. M., Aremu, C., et al. (2020). Different organic manure sources and NPK fertilizer on soil chemical properties, growth, yield and quality of okra. *Scientific Reports* 10, 1–9.
- Adilu, G. S., and Gebre, Y. G. (2021). Effect of salinity on seed germination of some tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) varieties. *Journal of Aridland Agriculture* 7, 76–82.
- Adjab, M. (2002). Recherche des traits morphologiques, physiologiques et biochimiques d'adaptation au déficit hydrique chez différents génotypes de blé dur (*Triticum durum*). *Triticum durum*.
- Ahemad, M., and Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science* 26, 1–20.
- Ahmed, M., Ijaz, W., and Ahmad, S. (2018). Adapting and evaluating APSIM-SoilP-Wheat model for response to phosphorus under rainfed conditions of Pakistan. *Journal of plant nutrition* 41, 2069–2084.
- Albertos, P., Romero-Puertas, M. C., Tatematsu, K., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Nambara, E., et al. (2015). S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. *Nature communications* 6, 8669.
- Albouchi, A., Béjaoui, Z., and El Aouni, M. H. (2003). Influence d'un stress hydrique modéré ou sévère sur la croissance de jeunes plants de *Casuarina glauca* Sieb. *Science et changements planétaires/Sécheresse* 14, 137–142.
- Ali, A. S., and Elozeiri, A. A. (2017). Metabolic processes during seed germination. *Advances in seed biology*, 141–166.
- Ali, H. E. M., and Ismail, G. S. M. (2014). Tomato fruit quality as influenced by salinity and nitric oxide. *Turkish Journal of Botany* 38, 122–129.
- ALKahtani, M. D., Fouda, A., Attia, K. A., Al-Otaibi, F., Eid, A. M., Ewais, E. E.-D., et al. (2020). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from desert plants and their application as bioinoculants for sustainable agriculture. *Agronomy* 10, 1325.

- Almodovar, R., Carmona, L., Zarco, P., Collantes, E., González, C., Mulero, J., et al. (2010). Fibromyalgia in patients with ankylosing spondylitis: prevalence and utility of the measures of activity, function and radiological damage. *Clinical and Experimental Rheumatology-Incl Supplements* 28, S33.
- Amareesan, N., Jayakumar, V., Kumar, K., and Thajuddin, N. (2012). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annum*) seedling growth. *Annals of microbiology* 62, 805–810.
- Anaya, F., Fghire, R., Wahbi, S., and Loutfi, K. (2018). Influence of salicylic acid on seed germination of *Vicia faba* L. under salt stress. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17, 1–8.
- Ansari, M., Shekari, F., Mohammadi, M. H., Juhos, K., Végvári, G., and Biró, B. (2019). Salt-tolerant plant growth-promoting bacteria enhanced salinity tolerance of salt-tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars at high salinity. *Acta physiologiae plantarum* 41, 1–13.
- Anzala, F. J. (2006). Contrôle de la vitesse de germination chez le maïs (*Zea mays*): étude de la voie de biosynthèse des acides aminés issus de l'aspartate et recherche de QTLs.
- Apine, O., and Jadhav, J. (2011). Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. *Journal of applied microbiology* 110, 1235–1244.
- Arora, N. K., Tewari, S., Singh, S., Lal, N., and Maheshwari, D. K. (2011). PGPR for protection of plant health under saline conditions. *Bacteria in agrobiology: stress management*, 239–258.
- Arshad, Z., Hanif, M. A., Qadri, R. W. K., Khan, M., Babarinde, A., Omisore, G., et al. (2014). Role of essential oils in plant diseases protection: a review. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences* 6, 11–17.
- Assimakopoulou, A., Nifakos, K., Salmas, I., and Kalogeropoulos, P. (2015). Growth, ion uptake, and yield responses of three indigenous small-sized greek tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cultivars and four hybrids of cherry tomato under NaCl salinity stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 46, 2357–2377.
- Atashpaz, S., Khani, S., Barzegari, A., Barar, J., Vahed, S. Z., Azarbaijani, R., et al. (2010). A robust universal method for extraction of genomic DNA from bacterial species. *Microbiology* 79, 538–542.
- Attieh, J., Djiana, R., Koonjul, P., Étienne, C., Sparace, S. A., and Saini, H. S. (2002). Cloning and functional expression of two plant thiol methyltransferases: a new class of enzymes involved in the biosynthesis of sulfur volatiles. *Plant Molecular Biology* 50, 511–521.
- Ayaz, M., Ali, Q., Jiang, Q., Wang, R., Wang, Z., Mu, G., et al. (2022). Salt tolerant *Bacillus* strains improve plant growth traits and regulation of phytohormones in wheat under salinity stress. *Plants* 11, 2769.
- Azad, M., Alam, M., and Hamid, M. (2013). Modification of salt tolerance level in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) through induced mutation. *Legume Research-An International Journal* 36, 224–233.
- Azarmi, R., Giglou, M. T., and Hajieghrari, B. (2009). The effect of sheep-manure vermicompost on quantitative and qualitative properties of cucumber (*Cucumis sativus* L.) grown in the greenhouse. *African Journal of Biotechnology* 8.

Aziz, T., Rahmatullah, M. A., Maqsood, M. A., Tahir, I. A., and Cheema, M. A. (2006). Phosphorus utilization by six Brassica cultivars (*Brassica juncea* L.) from tri-calcium phosphate; a relatively insoluble P compound. *Pakistan Journal of Botany* 38, 1529–1538.

Aziz, T., Ullah, S., Sattar, A., Nasim, M., Farooq, M., and Khan, M. M. (2010). Nutrient availability and maize (*Zea mays*) growth in soil amended with organic manures. *Int. J. Agric. Biol* 12, 621–624.

B

Bacha, H., Mansour, E., Guasmi, F., Triki, T., and Ferchichi, A. (2015). Proline, glycine bêtaïne et composition minérale des plantes de *Solanum lycopersicum* L.(var. Microtom) sous stress salin. *Journal of New Sciences* 22, 1007–1013.

Balakrishnan, K., Rajendran, C., and Kulandaivelu, G. (2000). Differential responses of iron, magnesium and zinc deficiency on pigment composition, nutrient content, and photosynthetic activity in tropical fruit crops. *Photosynthetica*, 38, 477-479.

Baldos, O. C., DeFrank, J., Kramer, M., and Sakamoto, G. S. (2014). Storage humidity and temperature affect dormancy loss and viability of tanglehead (*Heteropogon contortus*) seeds. *HortScience* 49, 1328–1334.

Barceloux, D. G. (2009). Cycad seeds and chronic neurologic disease (*Cycas* species). *Disease-a-month: DM* 55, 353–360.

Baruati, D., Talukdar, M. C., and Kumar, V. (2018). Effect of organic manures and biofertilizers on growth and yield of gladiolus (*Gladiolus grandiflorus*, L.). *International Journal of chemical studies* 6, 2529–2532.

Baskin, J. M. (2009). The woody plant seed manual. *Native Plants Journal* 10, 300.

Bassa, C. (2012). Caractérisation de la famille multigénique des Aux/IAA, analyse fonctionnelle du gène SI-IAA27.

Beck, E., and Ziegler, P. (1989). Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annual review of plant biology* 40, 95–117.

Beers, E. P. (1997). Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death & Differentiation* 4, 649–661.

Ben Nja, R. (2014). Effet d'un stress salin sur la teneur en polymères pariétaux dans les feuilles de luzerne (*Medicago sativacv* Gabès) et sur la distribution dans les cellules de transfert des fines nervures.

Benazzouk, S., Djazouli, Z.-E., and Lutts, S. (2018). Assessment of the preventive effect of vermicompost on salinity resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig). *Acta Physiologiae Plantarum* 40, 1–11.

Benjelloun J. (2023). "Pieds du *Cycas revoluta*", prise 23 Avril 2023.

Benjelloun, J., Bouzroud, S., Triqui, Z., Alami, Q. L., and Smouni, A. (2021). Warm stratification improves embryos development and seed germination of *Cycas revoluta*. *Advances in Horticultural Science* 35.

- Benmahioul, B., Daguin, F., and Kaid-Harche, M. (2009). Effet du stress salin sur la germination et la croissance in vitro du pistachier (*Pistacia vera* L.). *Comptes Rendus Biologies* 332, 752–758.
- Benzahra, S., Zouaoui, A., and Snoussi, S. A. (2015). Étude des caractéristiques physico-chimique du sol sur la fixation biologique de l'azote atmosphérique cher le haricot.
- Bewley, J. D., and Black, M. (2013). *Seeds: physiology of development and germination*. Springer Science & Business Media.
- Bohnert, H. J., and Sheveleva, E. (1998). Plant stress adaptations—making metabolism move. *Current opinion in plant biology* 1, 267–274.
- Bokhtiar, S., and Sakurai, K. (2005). Effect of application of inorganic and organic fertilizers on growth, yield and quality of sugarcane. *Sugar Tech* 7, 33–37.
- Bottini, R., Cassán, F., and Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied microbiology and biotechnology* 65, 497–503.
- Bouchenak, F., Degaichia, H., Zibouche, F., and Chaouia, C. (2019). Effects of inoculation by rhizobacteria and osmoprotective molecules on the adaptation of barley (*Hordeum vulgare* L.) under salines constraints.
- Bouzroud, S., Gasparini, K., Hu, G., Barbosa, M. A. M., Rosa, B. L., Fahr, M., et al. (2020). Down regulation and loss of auxin response factor 4 function using CRISPR/Cas9 alters plant growth, stomatal function and improves tomato tolerance to salinity and osmotic stress. *Genes* 11, 272.
- Bouzroud, S., Henkrar, F., Fahr, M., and Smouni, A. (2023). Salt stress responses and alleviation strategies in legumes: a review of the current knowledge. *3 Biotech* 13, 287.
- Brhadda, N., and Abousalim, A. (2007). Étude histologique de l'embryogenèse somatique de l'olivier *Olea europaea* cv. Picholine marocaine. *Fruits* 62, 115–124.
- Broome, T. (2004). Hand-pollination of Cycads. *The Cycad Newsletter* 27, 4–7.

C

- Calonje, M., Kay, J., and Griffith, M. P. (2011). Propagation of cycad collections from seed: applied reproductive biology for conservation. *Sibbaldia: The International Journal of Botanic Garden Horticulture*, 79–96.
- Cedeño-García, G. A., Gerding, M., Moraga, G., Inostroza, L., Fischer, S., Sepúlveda-Caamaño, M., et al. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria with ACC deaminase activity isolated from Mediterranean dryland areas in Chile: Effects on early nodulation in alfalfa. *Chilean journal of agricultural research* 78, 360–369.
- Chang, A. C. G., Chen, T., Li, N., and Duan, J. (2019). Perspectives on endosymbiosis in coralloid roots: association of cycads and cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology* 10, 461756.
- Chang, K. H., Wu, R. Y., Chuang, K. C., Hsieh, T. F., and Chung, R. S. (2010). Effects of chemical and organic fertilizers on the growth, flower quality and nutrient uptake of *Anthurium andreaeanum*, cultivated for cut flower production. *Scientia Horticulturae* 125, 434–441.
- Chapman, M. J., and Margulis, L. (1998). Morphogenesis by symbiogenesis. *Int Microbiol* 1, 319–326.

- Charles, A. L., Chang, Y., Ko, W., Sriroth, K., and Huang, T. (2004). Some physical and chemical properties of starch isolates of cassava genotypes. *Starch-Stärke* 56, 413–418.
- Chaudhary, T., Dixit, M., Gera, R., Shukla, A. K., Prakash, A., Gupta, G., et al. (2020). Techniques for improving formulations of bioinoculants. *3 Biotech* 10, 1–9.
- Chavez, V. M., and Litz, R. E. (1999). Organogenesis from megagametophyte and zygotic embryo explants of the gymnosperm *Dioon edule* Lindley (Zamiaceae, Cycadales). *Plant cell, tissue and organ culture* 58, 219–222.
- Cheikh M'hamed, H. (2008). Evaluation de la tolerance au stress salin de quelques accessions d'orge (*Hordeum vulgare* L.) cultivees en Tunisie: approche physiologique. *Sciences et Technologie C* 28, 30–37.
- Chen, H., Ruan, J., Chu, P., Fu, W., Liang, Z., Li, Y., et al. (2020). AtPER1 enhances primary seed dormancy and reduces seed germination by suppressing the ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seeds. *The Plant Journal* 101, 310–323.
- Chen, S.-Y., Chien, C.-T., Chung, J.-D., Yang, Y.-S., and Kuo, S.-R. (2007). Dormancy-break and germination in seeds of *Prunus campanulata* (Rosaceae): role of covering layers and changes in concentration of abscisic acid and gibberellins. *Seed Science Research* 17, 21–32.
- Chen, W., and Kuo, T.-T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic acids research* 21, 2260.
- Cherif, H. (2018). Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols.
- Cherif-Silini, H., Thissera, B., Bouket, A. C., Saadaoui, N., Silini, A., Eshelli, M., et al. (2019). Durum wheat stress tolerance induced by endophyte *Pantoea agglomerans* with genes contributing to plant functions and secondary metabolite arsenal. *International journal of molecular sciences* 20, 3989.
- Chien, C.-T., Kuo-Huang, L.-L., and Lin, T.-P. (1998). Changes in Ultrastructure and Abscisic Acid Level, and Response to Applied Gibberellins in *Taxus mairei* Seeds Treated With Warm and Cold Stratification. *Annals of Botany* 81, 41–47.
- Chmielarz, P. (2009). Cryopreservation of dormant orthodox seeds of forest trees: mazzard cherry (*Prunus avium* L.). *Annals of forest science* 66, 1–9.
- Chookietwattana, K., and Maneewan, K. (2012). Selection of efficient salt-tolerant bacteria containing ACC deaminase for promotion of tomato growth under salinity stress. *Soil & Environment* 31.
- Clemente, J. M., Martinez, H. E. P., Pedrosa, A. W., Poltronieri Neves, Y., Cecon, P. R., and Jifon, J. L. (2018). Boron, copper, and zinc affect the productivity, cup quality, and chemical compounds in coffee beans. *Journal of Food Quality* 2018.
- Copeland, L. O., and McDonald, M. F. (2012). *Principles of seed science and technology*. Springer Science & Business Media.
- Cruz, J. D., Delattre, C., Felpeto, A. B., Pereira, H., Pierre, G., Morais, J., et al. (2023). Bioprospecting for industrially relevant exopolysaccharide-producing cyanobacteria under Portuguese simulated climate. *Scientific Reports* 13, 13561.
- Cuartero, J., and Fernández-Muñoz, R. (1998). Tomato and salinity. *Scientia horticultrae* 78, 83–125.

da Silva, J. A. T., Woodenberg, W. R., and Zeng, S. (2015). Cycads in vitro. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 24, 287–301.

D

Dahmani, I., Qin, K., Zhang, Y., and Fernie, A. R. (2023). The formation and function of plant metabolons. *The Plant Journal* 114, 1080–1092.

Daneshmand, F., Arvin, M. J., and Kalantari, K. M. (2010). Physiological responses to NaCl stress in three wild species of potato in vitro. *Acta physiologiae plantarum* 32, 91–101.

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

De Boer, M. A., Wolzak, L., and Sloopweg, J. C. (2019). Phosphorus: reserves, production, and applications. *Phosphorus recovery and recycling*, 75–100.

de la Cruz, A. A., Chernoff, N., Sinclair, J. L., Hill, D., Diggs, D. L., and Lynch, A. T. (2020). Introduction to cyanobacteria and cyanotoxins. *Water treatment for purification from cyanobacteria and cyanotoxins*, 1–35.

De Silva, B., and Tambiah, M. (1952). A contribution to the life history of *Cycas rumphii* Miq. *Ceylon J Sci* 12, 223–249.

Dehgan, B. (1983a). Propagation and growth of cycads—a conservation strategy., 137–139.

Dehgan, B. (1983b). Propagation and growth of cycads—a conservation strategy., 137–139.

Dehgan, B. (2014). *Public garden management: a global perspective*. Xlibris Corporation.

Dehgan, B., Durando, J. E., and Yeager, T. H. (1994). Symptoms and treatment of manganese deficiency in *Cycas revoluta* Thunb. *HortScience* 29, 645–648.

Dehgan, B., and Schutzman, B. (1989). Embryo development and germination of *Cycas* seeds. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 114, 125–129.

Demiray, H., Dereboylu, A. E., Bildik, S., Bülbül, K., Şenol, S., and Pırhan, A. (2017). In vitro seed germination of *Cycas revoluta* Thunb. *Bangladesh Journal of Botany* 46, 559–564.

Deora, V., Lee, J. D., Alborno, E. A., McAlary, L., Jagaraj, C. J., Robertson, A. A., et al. (2020). The microglial NLRP3 inflammasome is activated by amyotrophic lateral sclerosis proteins. *Glia* 68, 407–421.

Deshwal, V. K., and Kumar, P. (2013). Effect of salinity on growth and PGPR activity of Pseudomonads. *Journal of Academia and Industrial Research* 2, 353–356.

Devillez, F. (1976). Afterripening and dormancy breakdown in *Taxus baccata* L. seeds., 47–61.

Dhoran, V., and Gudadhe, S. (2012). Effect of plant growth regulators on seed germination and seedling vigour in *Asparagus sprengeri* Regel.

Dimkpa, C., Merten, D., Svatoš, A., Büchel, G., and Kothe, E. (2009). Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1687–1696.

Donaldson, J. (1995). The Winterberg Cycad. *Veld & Flora* 81, 36.

Donaldson, J. S. and Union internationale pour la conservation de la nature et de ses ressources (2003). *Cycads: status survey and conservation action plan*. IUCN--the World Conservation Union.

Downie, B., and Bewley, J. D. (2000). Soluble sugar content of white spruce (*Picea glauca*) seeds during and after germination. *Physiologia Plantarum* 110, 1–12.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. t, and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 28, 350–356.

Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., and Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 85–125.

E

El Mamoun, I., Bouzroud, S., Zouine, M., and Smouni, A. (2023). The Knockdown of AUXIN RESPONSE FACTOR 2 Confers Enhanced Tolerance to Salt and Drought Stresses in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plants* 12, 2804.

El Midaoui, M., Benbella, M., Aït Houssa, A., Ibriz, M., and Talouizte, A. (2007). Contribution à l'étude de quelques mécanismes d'adaptation à la salinité chez le tournesol cultivé (*Helianthus annuus* L.). *Revue HTE* 136, 29–34.

El-Keblawy, A. (2013). Effects of seed storage on germination of two succulent desert halophytes with little dormancy and transient seed bank. *Acta Ecologica Sinica* 33, 338–343.

Ellis, R., and Roberts, E. (1981). The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Science and Technology (Netherlands)* 9.

El-Sherbeny, S. E., Hendawy, S., Youssef, A., Naguib, N., and Hussein, M. (2012). Response of turnip (*Brassica rapa*) plants to minerals or organic fertilizers treatments. *Journal of Applied Sciences Research* 8, 628–634.

Eneji, A. E., Yamamoto, S., and Honna, T. (2001). Rice growth and nutrient uptake as affected by livestock manure in four Japanese soils. *Journal of plant nutrition* 24, 333–343.

Ersoy, E., Ozkan, E. E., Boga, M., Yilmaz, M. A., and Mat, A. (2019). Anti-aging potential and anti-tyrosinase activity of three *Hypericum* species with focus on phytochemical composition by LC–MS/MS. *Industrial Crops and Products* 141, 111735.

Eryılmaz, F. (2006). The relationships between salt stress and anthocyanin content in higher plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 20, 47–52.

Etesami, H., and Glick, B. R. (2020). Halotolerant plant growth–promoting bacteria: Prospects for alleviating salinity stress in plants. *Environmental and Experimental Botany* 178, 104124.

F

F. Abdelgawad, K., M. El-Mogy, M., IA Mohamed, M., Garchery, C., and G. Stevens, R. (2019). Increasing ascorbic acid content and salinity tolerance of cherry tomato plants by suppressed expression of the ascorbate oxidase gene. *Agronomy* 9, 51.

F. Slama (2004). *La salinité et la production végétale*. Centre de publication universitaire.

- Faye, E., Sané, S. K., Ba, A., and Camara, B. (2021). Comportement sous serre de *Casuarina equisetifolia* L., *Gossypium hirsutum* L. et *Jatropha curcas* L. soumis au stress salin. *Journal of Applied Biosciences* 160, 16521–16535.
- Fernando, W. D., Nakkeeran, S., and Zhang, Y. (2006). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. *PGPR: biocontrol and biofertilization*, 67–109.
- Ferreira, M. J., Silva, H., and Cunha, A. (2019). Siderophore-producing rhizobacteria as a promising tool for empowering plants to cope with iron limitation in saline soils: A review. *Pedosphere* 29, 409–420.
- Figueiredo, J. E. F., Gomes, E. A., Guimarães, C. T., Lana, U. G. de P., Teixeira, M. A., Lima, G. V. C., et al. (2009). Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 522–534.
- Finch-Savage, W. E., and Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New phytologist* 171, 501–523.
- Finkelstein, M. (2008). *Failure rate modelling for reliability and risk*. Springer Science & Business Media.
- Fisher, J. B., Lindström, A., and Marler, T. E. (2009). Tissue responses and solution movement after stem wounding in six *Cycas* species. *HortScience* 44, 848–851.
- Frett, J. J. (1987). Seed germination of *Cycas revoluta*. *Journal of Environmental Horticulture* 5, 105–106.
- Fricke, W., and Peters, W. S. (2002). The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiology* 129, 374–388.

G

- Gaby, J. C., and Buckley, D. H. (2012). A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase.
- Gaignard, C. (2019). Criblage, identification et caractérisations physico-chimiques d'exopolysaccharides de microalgues et Cyanobactéries.
- Gamalero, E., Glick, B., and Maheshwari, D. (2011). Bacteria in agrobiolgy: plant nutrient management. *Bact. Agrobiol. Plant Nutr. Manag*, 17–46.
- Gandonou, C. B., Bada, F., Abrini, J., and Skali-Senhaji, N. (2011). Free proline, soluble sugars and soluble proteins concentration as affected by salt stress in two sugarcane (*Saccharum* sp.) cultivars differing in their salt tolerance. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 5, 2441–2453.
- Garriga, M., Retamales, J. B., Romero-Bravo, S., Caligari, P. D., and Lobos, G. A. (2014). Chlorophyll, anthocyanin, and gas exchange changes assessed by spectroradiometry in *Fragaria chiloensis* under salt stress. *Journal of integrative plant biology* 56, 505–515.
- Gehring, M. M., Pengelly, J. J., Cuddy, W. S., Fieker, C., Forster, P. I., and Neilan, B. A. (2010). Host selection of symbiotic cyanobacteria in 31 species of the Australian cycad genus: *Macrozamia* (Zamiaceae). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 811–822.

- Germida, J. J., Siciliano, S. D., Renato de Freitas, J., and Seib, A. M. (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 26, 43–50.
- Ghazy, N., and El-Nahrawy, S. (2021). Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. *Archives of microbiology* 203, 1195–1209.
- Ghosh, P., Ramesh, P., Bandyopadhyay, K., Tripathi, A., Hati, K., Misra, A., et al. (2004). Comparative effectiveness of cattle manure, poultry manure, phosphocompost and fertilizer-NPK on three cropping systems in vertisols of semi-arid tropics. I. Crop yields and system performance. *Bioresource technology* 95, 77–83.
- Gillman, G. (1979). A proposed method for the measurement of exchange properties of highly weathered soils. *Soil Research* 17, 129–139.
- Gobat, J.-M., Aragno, M., and Matthey, W. (2010). *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*. PPUR Presses polytechniques.
- Goel, A. K., and Khurajam, J. (2015). Cycads: an overview. *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement*, 349–360.
- González-Grande, P., Suárez, N., and Marín, O. (2020). Effect of salinity and seed salt priming on the physiology of adult plants of *Solanum Lycopersicum* cv. 'Río Grande.' *Brazilian Journal of Botany* 43, 775–787.
- Gopinath, K., Saha, S., Mina, B., Pande, H., Kundu, S., and Gupta, H. (2008). Influence of organic amendments on growth, yield and quality of wheat and on soil properties during transition to organic production. *Nutrient cycling in agroecosystems* 82, 51–60.
- Gould, K. S. (2004). Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2004, 314.
- Gray, E., and Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil biology and biochemistry* 37, 395–412.
- Gregory, P. J. (1994). Root growth and activity. *Physiology and determination of crop yield*, 65–93.
- Grobbelaar, N. (1990). Encephalartos embryos. *Encephalartos* 24, 23.
- Grobbelaar, N. (2002). *Cycads with special reference to the southern African species*. author.
- Grove, T., O'connell, A., and Malajczuk, N. (1980). Effects of fire on the growth, nutrient content and rate of nitrogen fixation of the cycad *Macrozamia riedlei*. *Australian Journal of Botany* 28, 271–281.
- Gu, Y., Ma, Y., Wang, J., Xia, Z., and Wei, H. (2020). Genomic insights into a plant growth-promoting *Pseudomonas koreensis* strain with cyclic lipopeptide-mediated antifungal activity. *MicrobiologyOpen* 9, e1092.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., and Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol* 7, 096–102.

Gutiérrez-García, K., Bustos-Díaz, E. D., Corona-Gómez, J. A., Ramos-Aboites, H. E., Sélem-Mojica, N., Cruz-Morales, P., et al. (2019). Cycad coralloid roots contain bacterial communities including cyanobacteria and *Caulobacter* spp. that encode niche-specific biosynthetic gene clusters. *Genome Biology and Evolution* 11, 319–334.

H

Haas, D., and Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews microbiology* 3, 307–319.

Hajhashemi, S., Kiarostami, K., Enteshari, S., and Saboora, A. (2006). The effects of salt stress and paclobutrazol on some physiological parameters of two salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of wheat.

Hajji, M. (1983). Mécanismes des effets du milieu salé sur la nutrition minérale d'une plante ripicole: interaction des transports d'ions et d'eau chez le laurier rose.

Halliday, J., and Pate, J. (1976). Symbiotic nitrogen fixation by coralloid roots of the cycad *Macrozamia riedlei*: physiological characteristics and ecological significance. *Functional Plant Biology* 3, 349–358.

Hamrouni, L., Hanana, M., Abdelly, C., and Ghorbel, A. (2011). Exclusion du chlorure et inclusion du sodium: deux mécanismes concomitants de tolérance à la salinité chez la vigne sauvage *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (var. 'Séjène'). *BASE*.

Haq, M. E., Mira, M. M., Duncan, R. W., Hill, R. D., and Stasolla, C. (2023). Seed-specific expression of the class 2 Phytoalbumin (Pgb2) increases seed oil in *Brassica napus*. *Journal of Plant Physiology* 287, 154032.

Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., et al. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and molecular biology reviews* 79, 293–320.

Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K., and Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology* 51, 463–499.

Hayward, P., and Kuwahara, S. (2013). Cycads, sustenance and cultural landscapes in the Amami islands. *The Islands of Kagoshima*, 29–37.

He, Y., Yao, Y., Ji, Y., Deng, J., Zhou, G., Liu, R., et al. (2020). Biochar amendment boosts photosynthesis and biomass in C3 but not C4 plants: A global synthesis. *Gcb Bioenergy* 12, 605–617.

Heller, A. (1990). Electrical wiring of redox enzymes. *Accounts of Chemical Research* 23, 128–134.

Hikosaka, K., Ishikawa, K., Borjigidai, A., Muller, O., and Onoda, Y. (2006). Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. *Journal of experimental botany* 57, 291–302.

Hilhorst, H. W. (1990). Dose-response analysis of factors involved in germination and secondary dormancy of seeds of *Sisymbrium officinale*: II. Nitrate. *Plant physiology* 94, 1096–1102.

Hill, K. D., Stevenson, D. W., and Osborne, R. (2004). Appendix 1: the world list of cycads. *Cycad classification: Concepts and recommendations*. CABI Publishing, Wallingford, England, 219–235.

Hilton, J., and Slinger, S. (1986). Digestibility and utilization of canola meal in practical-type diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43, 1149–1155.

Hinkle, C. (1994). *Cycads of the world: Ancient plants in today's landscape*: By David L. Jones. The New York Botanical Gardens. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 1993 and Reed Books, Australia, 1993. 312 pp. ISBN 1 56098 220 9. Price: US \$45.00.

Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.

Hu, Q. (2019). Effects of *Bacillus subtilis* QM3 on germination and antioxidant enzymes activities of wheat seeds under salt stress. *Open Access Library Journal* 6, 1.

I

Ibriz, M., Thami Alami, I., Amotfi, S., Al Faiz, C., and Rachidai, A. (2004). Réponse de quelques écotypes marocains de luzerne (*Medicago sativa* L.) à différentes concentrations de chlorure de sodium. *Congrès International de Biochimie. Marrakech, Maroc*, 3–6.

Idan, R. O., Prasad, V., and Saravanan, S. (2014). Effect of organic manures on flower yield of African marigold (*Tagetes erecta* L.) cv. pusa narangi gainda. *Int J Agric Sci Res* 4, 39–50.

J

Jabnour, M. (2009). Adaptation des plantes au stress salin: caractérisation de transporteurs de sodium et potassium de la famille HKT chez le riz.

Jiang, C., and Zeng, Z.-B. (1995). Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140, 1111–1127.

Joseph, J. O. (2017). Population structure of the cycad along River Mpanga, Western Uganda. *African Journal of Rural Development (AFJRD)* 2, 95–103.

Joshi, E., Iyer, B., and Rajkumar, S. (2019). Glucose and arabinose dependent mineral phosphate solubilization and its succinate-mediated catabolite repression in *Rhizobium* sp. RM and RS. *Journal of bioscience and bioengineering* 128, 551–557.

K

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

Kakabouki, I. P., Roussis, I., Hela, D., Papastylianou, P., Folina, A., and Bilalis, D. (2019). Root growth dynamics and productivity of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in response to fertilization and soil tillage. *Folia Horticulturae* 31, 285–299.

Kaushal, M. (2019). Microbes in cahoots with plants: MIST to hit the jackpot of agricultural productivity during drought. *International journal of molecular sciences* 20, 1769.

Kaymakanova, M. (2009). Effect of salinity on germination and seed physiology in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 23, 326–329.

Keun, S. J., Hee, K. J., and Kyung, L. A. (2016). Effect of warm and cold stratification, and ethanol treatment on germination of *Corylopsis* seeds. *Horticultural Science* 43, 84–91.

- Khairnar, S. O., and Kaur, V. I. (2022). Efficacy of Different Organic Manures and Inorganic Fertilizers in Culture and Propagation of Fresh Water Ornamental Aquatic Plant Fanwort, *Cabomba caroliniana*. *Environment and Ecology* 40, 522–527.
- Khaitov, B., Yun, H. J., Lee, Y., Ruziev, F., Le, T. H., Umurzokov, M., et al. (2019). Impact of organic manure on growth, nutrient content and yield of chilli pepper under various temperature environments. *International journal of environmental research and public health* 16, 3031.
- Khalid, A., Arshad, M., and Zahir, Z. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of applied microbiology* 96, 473–480.
- Khalifa, T., Elbagory, M., and Omara, A. E.-D. (2021). Salt stress amelioration in maize plants through phosphogypsum application and bacterial inoculation. *Plants* 10, 2024.
- Khan, A. L., Hamayun, M., Kim, Y.-H., Kang, S.-M., and Lee, I.-J. (2011). Ameliorative symbiosis of endophyte (*Penicillium funiculosum* LHL06) under salt stress elevated plant growth of *Glycine max* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 852–861.
- Khan, M., Asaf, S., Khan, A., Adhikari, A., Jan, R., Ali, S., et al. (2020). Plant growth-promoting endophytic bacteria augment growth and salinity tolerance in rice plants. *Plant Biology* 22, 850–862.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., and Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science* 56, 73–98.
- Khan, N., Bano, A., and Babar, M. A. (2017). The root growth of wheat plants, the water conservation and fertility status of sandy soils influenced by plant growth promoting rhizobacteria. *Symbiosis* 72, 195–205.
- Khan, Z., Xianting, F., Khan, M. N., Khan, M. A., Zhang, K., Fu, Y., et al. (2022). The toxicity of heavy metals and plant signaling facilitated by biochar application: Implications for stress mitigation and crop production. *Chemosphere*, 136466.
- Khursheda, P., Ahamed, K. U., Islam, M. M., and Haque, M. N. (2015). Response of tomato plant under salt stress: role of exogenous calcium. *Journal of Plant Sciences* 10, 222–233.
- Kinsou, E., Amoussa, A. M., Mensah, A. C. G., Kpinkoun, J. K., Komlan, F. A., Ahissou, H., et al. (2021). Effet de la salinité sur la floraison, la fructification et la qualité nutritionnelle des fruits du cultivar local Akikon de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 15, 737–749.
- Kpinkoun, J. K., Zanklan, S. A., Komlan, F. A., Mensah, A. C., Montcho, D., Kinsou, E., et al. (2019). Évaluation de la résistance à la salinité au stade jeune plant de quelques cultivars de piment (*Capsicum* spp.) du Bénin. *Journal of Applied Biosciences* 133, 13561–13573.
- Kuiper, D., Schuit, J., and Kuiper, P. (1990). Actual cytokinin concentrations in plant tissue as an indicator for salt resistance in cereals. *Plant and Soil* 123, 243–250.
- Kumar, A., and Verma, J. (2018). Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? *Microbiological Research* 207, 41–52. doi: 10.1016/j.micres.2017.11.004
- Kumar, N., Bharadwaj, C., Sahu, S., Shiv, A., Shrivastava, A. K., Reddy, S. P. P., et al. (2021). Genome-wide identification and functional prediction of salt-stress related long non-coding RNAs (lncRNAs) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 27, 2605–2619.

Kundan, R., Pant, G., Jadon, N., and Agrawal, P. K. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria: mechanism and current prospective. *J Fertil Pestic* 6, 9.

L

Lafon, J.-P., Tharaud-Prayer, C., and Lévy, G. (1985). *Biologie des plantes cultivées*.

Lastochkina, O., Aliniaefard, S., Garshina, D., Garipova, S., Pusenkova, L., Allagulova, C., et al. (2021). Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damages. *Journal of Plant Physiology* 263, 153462.

Lebrazi, S., Fadil, M., Chraïbi, M., and Fikri-Benbrahim, K. (2020). Screening and optimization of indole-3-acetic acid production by *Rhizobium* sp. strain using response surface methodology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 18, 21.

Levigneron, A., Lopez, F., Vansuyt, G., Berthomieu, P., Fourcroy, P., and Casse-Delbart, F. (1995). Les plantes face au stress salin. *Cahiers Agricultures* 4, 263–273.

Levitt, J. (2012). *Chilling, freezing, and high temperature stresses*. Elsevier.

Li, H., and Jiang, X. (2017). Inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) improves salt tolerance of maize seedling. *Russian Journal of Plant Physiology* 64, 235–241.

Lim, T. (2011). “*Cycas revoluta*,” in *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 1, Fruits*, (Springer), 732–738.

Lindsay, W. L., and Norvell, Wa. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil science society of America journal* 42, 421–428.

Liu, D., Lian, B., and Dong, H. (2012). Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiology Journal* 29, 413–421.

Liu, J., Xu, H., Wang, Z., Liu, J., and Gong, X. (2023). Core Endophytic Bacteria and Their Roles in the Coralloid Roots of Cultivated *Cycas revoluta* (Cycadaceae). *Microorganisms* 11, 2364.

Liu, L., Xia, W., Li, H., Zeng, H., Wei, B., Han, S., et al. (2018). Salinity inhibits rice seed germination by reducing α -amylase activity via decreased bioactive gibberellin content. *Frontiers in Plant Science* 9, 275.

Liu, W.-R., Zeng, D., She, L., Su, W.-X., He, D.-C., Wu, G.-Y., et al. (2020). Comparisons of pollution characteristics, emission situations, and mass loads for heavy metals in the manures of different livestock and poultry in China. *Science of the Total Environment* 734, 139023.

Liu, X., Luo, Y., Li, Z., Wang, J., and Wei, G. (2017). Role of exopolysaccharide in salt stress resistance and cell motility of *Mesorhizobium alhagi* CCNWXJ12–2T. *Applied microbiology and biotechnology* 101, 2967–2978.

Lobakova, E., Orazova, M. K., and Dobrovol'skaya, T. (2003). The Structure of Cyanobacterial Communities Formed during the Degradation of Apogeotropic Roots of Cycads. *Microbiology (00262617)* 72.

Loper, J., and Schroth, M. (1986). Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* 76, 386–389.

M

- Marak, B. S., Kumar, S., and Momin, K. C. (2020). Effects of organic manures and bio-fertilizers on growth, flowering and yield of China aster (*Callistephus chinensis* L. Nees var. Kamini). *Bangladesh Journal of Botany* 49, 1111–1117.
- Marler, T. E., Deloso, B. E., and Cruz, G. N. (2020). Prophylactic treatments of *Cycas* stem wounds influence vegetative propagation. *Tropical Conservation Science* 13, 1940082920920595.
- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants.
- Martinez, J.-P., Antunez, A., Pertuze, R., ACOSTA, M. D. P., Palma, X., Fuentes, L., et al. (2012). Effects of saline water on water status, yield and fruit quality of wild (*Solanum chilense*) and domesticated (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) tomatoes. *Experimental Agriculture* 48, 573–586.
- Mavi, A., Urhan, M., Jian, Q. Y., Zhuang, H., Houseni, M., Cermik, T. F., et al. (2006). Dual time point 18F-FDG PET imaging detects breast cancer with high sensitivity and correlates well with histologic subtypes. *Journal of Nuclear Medicine* 47, 1440–1446.
- Mayak, S., Tirosh, T., and Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant physiology and Biochemistry* 42, 565–572.
- Mazliak, P., Côme, D., Roger, J., Durand, R., and Durand, B. (1982). Croissance et développement. (*No Title*).
- Mehnaz, S. (2013). “Secondary metabolites of *Pseudomonas aurantiaca* and their role in plant growth promotion,” in *Plant microbe symbiosis: fundamentals and advances*, (Springer), 373–393.
- Mehta, A., Brasileiro, A. C., Souza, D. S., Romano, E., Campos, M. A., Grossi-de-Sá, M. F., et al. (2008). Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us? *The FEBS journal* 275, 3731–3746.
- Merritt, D., Turner, S., Clarke, S., and Dixon, K. (2007). Seed dormancy and germination stimulation syndromes for Australian temperate species. *Australian Journal of Botany* 55, 336–344.
- Meyer, J. P., and Allen, N. J. (2004). TCM employee commitment survey academic users guide 2004. *London, Ontario, Canada: The University of Western Ontario, Department of Psychology*, 143–159.
- Mezni, M., Haffani, S., and Albouchi, A. (2012). Morphological and physiological studies in three alfalfa varieties (*Medicago sativa* L.) under salt stress. *J. Agric. Veter. Sci* 1.
- Miliute, I., Buzaitė, O., Baniulis, D., and Stanys, V. (2015). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture* 102, 465–478.
- Millaku, F., Gashi, B., Abdullai, K., Aliu, S., Osmani, M., Krasniqi, E., et al. (2012). Effects of cold-stratification, gibberellic acid and potassium nitrate on seed germination of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.). *African Journal of Biotechnology* 11, 13173–13178.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* 31, 426–428.
- Miransari, M., and Smith, D. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and experimental botany* 99, 110–121.

- Mohamdi, M., Bouya, D., and Salem, A. O. M. (2011). Etude de l'effet du stress salin (NaCl) chez deux variétés de tomate (Campbell 33 et Mongal). *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 5.
- Morant-Manceau, A., Pradier, E., and Tremblin, G. (2004). Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species under salt stress. *Journal of plant physiology* 161, 25–33.
- Morgan, J. (1983). Osmoregulation as a selection criterion for drought tolerance in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 34, 607–614.
- Moriwaki, T., Falcioni, R., Tanaka, F. A. O., Cardoso, K. A. K., Souza, L., Benedito, E., et al. (2019). Nitrogen-improved photosynthesis quantum yield is driven by increased thylakoid density, enhancing green light absorption. *Plant Science* 278, 1–11.
- Muhammad, S., and Amusa, N. (2003). Effects of sulphuric acid and hot water treatments on seed germination of tamarind (*Tamarindus indica* L). *African journal of biotechnology* 2, 376–279.
- Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987). “[21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction,” in *Methods in enzymology*, (Elsevier), 335–350.
- Muralitharan, G., and Thajuddin, N. (2011). Rapid differentiation of phenotypically and genotypically similar *Synechococcus elongatus* strains by PCR fingerprinting. *Biologia* 66, 238–243.
- Muscolo, A., Panuccio, M. R., Zahir, Z., Mahmood, S., and Nadeem, S. M. (2019). Use of plant growth-promoting rhizobacteria to ameliorate the performance of lentil under salinity. *J. Appl. Bot. Food Qual* 92, 179–186.
- Mutale-Joan, C., Redouane, B., Najib, E., Yassine, K., Lyamlouli, K., Laila, S., et al. (2020). Screening of microalgae liquid extracts for their bio stimulant properties on plant growth, nutrient uptake and metabolite profile of *Solanum lycopersicum* L. *Scientific reports* 10, 2820.

N

- Nabors, M. W. (2008). *Biologie végétale: structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies*. Pearson Education France.
- Naderi, R., Mohaiseni, K., Da Silva, J. A. T., Omid, M., and Naderi, B. (2015). Simplified regeneration protocol for *Cycas revoluta* Thunb. Mature zygotic embryos. *Notulae Scientia Biologicae* 7, 62–65.
- Najm, A. A., Hadi, M. R. H. S., Fazeli, F., Darzi, M. T., and Rahi, A. (2012). Effect of integrated management of nitrogen fertilizer and cattle manure on the leaf chlorophyll, yield, and tuber glycoalkaloids of *Agria* potato. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 43, 912–923.
- Nakahara, H., Matsuzoe, N., Taniguchi, T., and An, P. (2022). Effect of *Burkholderia* sp. and *Pseudomonas* spp. inoculation on growth, yield, and absorption of inorganic components in tomato ‘Micro-Tom’ under salinity conditions. *Journal of Plant Interactions* 17, 277–289.
- Narula, S., Anand, R., and Dudeja, S. (2013). Beneficial traits of endophytic bacteria from field pea nodules and plant growth promotion of field pea. *Journal of food legumes* 26, 73–79.
- Navarro, J., Garrido, C., Flores, P., and Martínez, V. (2010). The effect of salinity on yield and fruit quality of pepper grown in perlite. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8, 142–150.

N'Dri, A. A., Vroh-Bi, I., Kouamé, P. L., and Bi, I. Z. (2011). Bases génétiques et biochimiques de la capacité germinative des graines: implications pour les systèmes semenciers et la production alimentaire. *Sciences & Nature* 8, 119–137.

Norstog, K., and Nicholls, T. J. (2020). *The biology of the cycads*. Cornell University Press.

Nübel, U., Garcia-Pichel, F., and Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology* 63, 3327–3332.

O

Olsen, S. R. (1954). *Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate*. US Department of Agriculture.

Osama, H., El Gammal, A., and Salama, S. (2016). Effect of Sheep Manure Application Rate and Method on Growth, Fruiting and Fruit Quality of Balady Guava Trees Grown Under Mid-Sinai Conditions. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science* 9, 59–72.

O'Sullivan, D. J., and O'Gara, F. (1991). Regulation of iron assimilation: nucleotide sequence analysis of an iron-regulated promoter from a fluorescent pseudomonad. *Molecular and General Genetics MGG* 228, 1–8.

Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., et al. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology* 6, 745.

P

Pal, K. K., and Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens.

Pandey, P., and Maheshwari, D. (2007). Two-species microbial consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. *Current science*, 1137–1142.

Pang, F., Tao, A., Ayra-Pardo, C., Wang, T., Yu, Z., and Huang, S. (2022). Plant organ-and growth stage-diversity of endophytic bacteria with potential as biofertilisers isolated from wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology* 22, 276.

Parham, J., Deng, S., Raun, W., and Johnson, G. (2002). Long-term cattle manure application in soil: I. Effect on soil phosphorus levels, microbial biomass C, and dehydrogenase and phosphatase activities. *Biology and Fertility of Soils* 35, 328–337.

Pattanagul, W., and Thitisaksakul, M. (2008). Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance.

Pearce, S., Huttly, A. K., Prosser, I. M., Li, Y., Vaughan, S. P., Gallova, B., et al. (2015). Heterologous expression and transcript analysis of gibberellin biosynthetic genes of grasses reveals novel functionality in the GA3ox family. *BMC Plant Biology* 15, 1–19.

Penfield, S. (2017). Seed dormancy and germination. *Current Biology* 27, R874–R878.

Pereira, I., Ortega, R., Barrientos, L., Moya, M., Reyes, G., and Kramm, V. (2009). Development of a biofertilizer based on filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria for rice crops in Chile. *Journal of applied phycology* 21, 135–144.

- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R., Del Cerro, P., Espuny, M., Jiménez-Guerrero, I., et al. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological research* 169, 325–336.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., and Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature reviews microbiology* 11, 789–799.
- Piao, H. L., Lim, J. H., Kim, S. J., Cheong, G., and Hwang, I. (2001). Constitutive over-expression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal* 27, 305–314.
- Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362–370. *Plant Soil* 287, 77–84.
- Pipinis, E., Milios, E., Georgiou, M., and Smiris, P. (2015). Effects of gibberellic acid and cold stratification on seed germination of two Sorbus species. *Forestry Ideas* 21, 107–114.
- Priya, A., Gnanasekaran, L., Dutta, K., Rajendran, S., Balakrishnan, D., and Soto-Moscoco, M. (2022). Biosorption of heavy metals by microorganisms: Evaluation of different underlying mechanisms. *Chemosphere* 307, 135957.

R

- Rao, J., Kumar, M., Rao, V., Kumar, O., and Venkaiah, M. (2014). New population of *Cycas spheric* Roxb.(Cycadaceae) discovered in Pinjarikonda Reserve Forest, Andhra Pradesh, India. *Journal of Threatened Taxa* 6, 5871–5874.
- Razavi, S. M., and Hajiboland, R. (2009). Dormancy breaking and germination of *Prangos ferulacea* seeds. *Journal of Biosciences (EurAsian)* 3, 78–83.
- Read, R. W., and Solt, M. L. (1986). Bibliography of the living cycads (annotated).
- Reed, S. C., Townsend, A. R., Taylor, P. G., and Cleveland, C. C. (2011). Phosphorus cycling in tropical forests growing on highly weathered soils. *Phosphorus in action: biological processes in soil phosphorus cycling*, 339–369.
- Rinaldi, L. (1999). Factors affecting shoot regeneration from zygotic embryo and seedling explants of *Cycas revoluta* Thunb. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 35, 25–28.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., and Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology* 111, 1–61.
- Rodríguez-Navarro, A., and Rubio, F. (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of experimental botany* 57, 1149–1160.
- Roh, M. S., and Bentz, J.-A. (2002). Germination of *Styrax japonicus* seeds as influenced by storage and sowing conditions., 411–416.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., Hilal, M., et al. (2009). Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant signaling & behavior* 4, 388–393.
- Rouhi, H. R., Sepehri, A., Sefidkhani, L., and Karimi, F. (2015). Evaluation of several methods for breaking dormancy of bitter vetch seeds (*Vicia ervilia* L.). *Plant Breeding and Seed Science* 71, 57.

Rouhi, P., Jensen, L. D., Cao, Z., Hosaka, K., Länne, T., Wahlberg, E., et al. (2010). Hypoxia-induced metastasis model in embryonic zebrafish. *Nature protocols* 5, 1911–1918.

Rutherford, C., Donaldson, J., Hudson, A., McGough, H. N., and Sajeve Schippmann, M. (2013). CITES and cycads. *Royal Botanic Gardens, Kew*.

S

Sagar, A., Dhusiya, K., Shukla, P., and Ramteke, P. (2016). Salt tolerance plant growth promoting bacterium *Enterobacter cloacae* (KP226569) in sustainable maize production under salt stress., 25–26.

Said Ali, I., Razanamparany, L., and Gibert, O. (2014). Les fruits de Cycas (Cycadaceae) des Comores: utilisation, compositions chimique et nutritionnelle.

Saini, S., Sharma, I., Kaur, N., and Pati, P. K. (2013). Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant cell reports* 32, 741–757.

Saito, T., and Matsukura, C. (2015). Effect of salt stress on the growth and fruit quality of tomato plants. *Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants*, 3–16.

Saji, V. S. (2021). Recent progress in superhydrophobic and superamphiphobic coatings for magnesium and its alloys. *Journal of Magnesium and Alloys* 9, 748–778.

Salisbury, F., and Ross, C. (1995). Plant Physiology. Fisiologi Tumbuhan. *Jilid II. Penerbit ITB Bandung* 173.

Samb, C. O., Wade, D., Faye, E., and Diaw, M. M. (2020). Effet du stress salin sur la croissance de quatre provenances d’anacardier (*Anacardium occidentale* L.) en milieu semi-contrôlé. *VertigO-la revue électronique en sciences de l’environnement*.

Sand-Jensen, K. (2014). Ecophysiology of gelatinous Nostoc colonies: unprecedented slow growth and survival in resource-poor and harsh environments. *Annals of botany* 114, 17–33.

Sandra, D. G. A. B. B., Duggan, A. N.-B. P. S., and Schüßler, A. N. R. A. (2013). 16 Cyanobacterial-Plant Symbioses. *Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations*.

Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., et al. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *nature* 265, 687–695.

Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A., and Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology* 5, 301–307.

Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., and Fernandez, E. (2015). Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Frontiers in plant science* 6, 163887.

Satake, T. (1981). The varieties of *Cycas revoluta*. *Cycad Newsl* 4, 3–10.

Sautu, A., Baskin, J. M., Baskin, C. C., and Condit, R. (2006). Studies on the seed biology of 100 native species of trees in a seasonal moist tropical forest, Panama, Central America. *Forest Ecology and Management* 234, 245–263.

Schutzman, B. (1984). A new species of *Zamia* L.(Zamiaceae, Cycadales) from Chiapas, Mexico. *Phytologia* 55, 299–304.

- Schwartz, B. W., Vernon, D. M., and Meinke, D. W. (1997). Development of the suspensor: differentiation, communication, and programmed cell death during plant embryogenesis. *Cellular and molecular biology of plant seed development*, 53–72.
- Schwyn, B., and Neilands, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry* 160, 47–56.
- Shahnaz, S., and Manjurul, K. M. (2018). Salinity intrusion and coastal agriculture: adaptation strategies using salt-tolerant plant-growth promoting rhizobacteria for sustainable food security. *Региональные проблемы* 21, 58–61.
- Shaji, H., Chandran, V., and Mathew, L. (2021). “Organic fertilizers as a route to controlled release of nutrients,” in *Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture*, (Elsevier), 231–245.
- Shameer, S., and Prasad, T. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation* 84, 603–615.
- Shanmugam, P., and Veeraputhran, R. (2000). Effect of organic manure, biofertilizers, inorganic nitrogen and zinc on growth and yield of rabi rice (*Oryza sativa* L.). *Madras Agricultural Journal* 87, 90–93.
- Sharma, A., Johri, B., Sharma, A., and Glick, B. (2003). Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry* 35, 887–894.
- Sharma, S., Rana, V. S., Rana, N., Sharma, U., Gudeta, K., Alharbi, K., et al. (2022). Effect of Organic Manures on Growth, Yield, Leaf Nutrient Uptake and Soil Properties of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa* Chev.) cv. Allison. *Plants* 11, 3354.
- Shiley, S. (2013). “Soil rhizobacteria regulating the uptake of nutrients and undesirable elements by plants,” in *Plant microbe symbiosis: fundamentals and advances*, (Springer), 147–167.
- Shu, K., Liu, X., Xie, Q., and He, Z. (2016). Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular plant* 9, 34–45.
- Shultana, R., Kee Zuan, A. T., Yusop, M. R., and Saud, H. M. (2020). Characterization of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria and the effect on growth and yield of saline-affected rice. *PLoS One* 15, e0238537.
- Silva, J. V., Lacerda, C. F. de, Costa, P. H. A. da, Enéas Filho, J., Gomes Filho, E., and Prisco, J. T. (2003). Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with CaCl₂. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15, 99–105.
- Singh, A., Singh, D., and Jauhari, S. (2006). Response of manures and bio-fertilizers on growth and flowering in rose. *Journal of Ornamental Horticulture* 9, 278–281.
- Singh, R. P., and Jha, P. N. (2016). A halotolerant bacterium *Bacillus licheniformis* HSW-16 augments induced systemic tolerance to salt stress in wheat plant (*Triticum aestivum*). *Frontiers in plant science* 7, 1890.
- Singh, S., Awasthi, L., Shyam Singh, S. S., and Sharma, N. (2011). Protection of mungbean and urdbean crops against vector borne mungbean yellow mosaic virus through botanicals.

- Sinha, A. K., and Parli, B. V. (2020). Siderophore production by bacteria isolated from mangrove sediments: a microcosm study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 524, 151290.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., and Pandey, A. (2006). α -Amylases from Microbial Sources--An Overview on Recent Developments. *Food Technology & Biotechnology* 44.
- Small, E. (2011). *Top 100 exotic food plants*. Crc Press.
- Smith, G. S. (1978). N and K Fertilization of Florida Coontie, *Zamia integrifolia* Ait. 1. *HortScience* 13, 438–439.
- Soe, K. M., Htwe, A. Z., Moe, K., Tomomi, A., and Yamakawa, T. (2020). Diversity and effectivity of indigenous Mesorhizobium strains for chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Myanmar. *Agronomy* 10, 287.
- Song, P., Zhao, B., Sun, X., Li, L., Wang, Z., Ma, C., et al. (2023). Effects of *Bacillus subtilis* HS5B5 on maize seed germination and seedling growth under NaCl stress conditions. *Agronomy* 13, 1874.
- Soomro, A. F., Tunio, S., Oad, F. C., and Rajper, I. (2013). Integrated effect of inorganic and organic fertilizers on the yield and quality of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Pak. J. Bot* 45, 1339–1348.
- Spaepen, S., and Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a001438.
- Stevenson, D. W. (1992). A formal classification of the extant cycads. *Brittonia* 44, 220–223.
- Stokes, P. (1965). “Temperature and seed dormancy,” in *Differenzierung und Entwicklung/Differentiation and Development*, (Springer), 2393–2450.
- Suty, L. (2015). Les végétaux: des symbioses pour mieux vivre.

T

- Taïbi, K., Taïbi, F., Abderrahim, L. A., Ennajah, A., Belkhodja, M., and Mulet, J. M. (2016). Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany* 105, 306–312.
- Takaji, O., Hiroshi, I., and Yasunosuke, N. (1977). Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp. CK lysing viable yeast cells. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* 41, 2387–2394.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30, 2725–2729.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., and Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54, 733–749.
- Tandon, H., Cescas, M., and Tyner, E. (1968). An acid-free vanadate-molybdate reagent for the determination of total phosphorus in soils. *Soil Science Society of America Journal* 32, 48–51.
- Tang, W. (1986). Pollinating cycads. *Encephalartos* 8, 16–19.

- Tardieu, F., and Tuberosa, R. (2010). Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. *Current opinion in plant biology* 13, 206–212.
- Tester, C. F. (1990). Organic amendment effects on physical and chemical properties of a sandy soil. *Soil Science Society of America Journal* 54, 827–831.
- Thouraya, R., Imen, I., Imen, H., Riadh, I., Ahlem, B., and Hager, J. (2013). Effet du stress salin sur le comportement physiologique et métabolique de trois variétés de piment (*Capsicum annum* L.). *Journal of Applied Biosciences* 66, 5060–5069.
- Todorovic, B., and Glick, B. R. (2008). The interconversion of ACC deaminase and D-cysteine desulphhydrase by directed mutagenesis. *Planta* 229, 193–205.
- Trinh, C. S., Jeong, C. Y., Lee, W. J., Truong, H. A., Chung, N., Han, J., et al. (2018). *Paenibacillus pabuli* strain P7S promotes plant growth and induces anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology and biochemistry* 129, 264–272.
- Tuan, P. A., Kumar, R., Rehal, P. K., Toora, P. K., and Ayele, B. T. (2018). Molecular mechanisms underlying abscisic acid/gibberellin balance in the control of seed dormancy and germination in cereals. *Frontiers in Plant Science* 9, 668.

U

- Udomchalothorn, T., Maneeprasobsuk, S., Bangyeekhun, E., Boon-Long, P., and Chadchawan, S. (2009). The role of the bifunctional enzyme, fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase, in carbon partitioning during salt stress and salt tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.). *Plant science* 176, 334–341.
- Ullah, Z., Hassan, I., Hafiz, I. A., and Abbasi, N. A. (2020). Effect of different priming treatments on seed germination of sago palm (*Cycas revoluta* L.). *World Journal of Biology and Biotechnology* 5, 1–3.
- Upadhyay, S. K., Maurya, S. K., and Singh, D. P. (2012). Salinity tolerance in free living plant growth promoting rhizobacteria. *Indian Journal of Scientific Research* 3, 73–78.

V

- Van Ieperen, W. (1996). Effects of different day and night salinity levels on vegetative growth, yield and quality of tomato. *Journal of Horticultural Science* 71, 99–111.
- Vincent, J. M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria*. [Published for the] International Biological Programme [by] Blackwell Scientific.
- Vogel, J., van der Merwe, H., Grobbelaar, N., and Voster, P. (1995). The use of radiocarbon for determining the growth rate of arborescent cycads., 115–9.
- von Aderkas, P., Little, S., Nepi, M., Guarnieri, M., Antony, M., and Takaso, T. (2022). Composition of sexual fluids in *Cycas revoluta* ovules during pollination and fertilization. *The Botanical Review* 88, 453–484.
- Vovides, A. P. (1990). Spatial distribution, survival, and fecundity of *Dioon edule* (Zamiaceae) in a tropical deciduous forest in Veracruz, Mexico, with notes on its habitat. *American Journal of Botany* 77, 1532–1543.

W

- Wagi, S., and Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ* 7, e7258.
- Walkley, A., and Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science* 37, 29–38.
- Walters, T., and Osborne, R. (2004). *Cycad classification: concepts and recommendations*. CABI Publishing.
- Wang, W., Zhu Dan, Y., and Wang, H. (2010). Effect of different amount of organic fertilizer in the yield of organic vegetables. *North Hortic* 17, 29–30.
- Werner, M. R. (1997). Soil quality characteristics during conversion to organic orchard management. *Applied Soil Ecology* 5, 151–167.
- Whitelock, L. (2002). *The Cycads* Timber Press. *Portland, Oregon*.
- Witte, V. T. (1977). Department of Ornamental Horticulture. *Proc. Fla. State Hort. Soc* 90, 89–91.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews* 51, 221–271.
- Woodenberg, W. R. (2009). Some aspects of megagametophyte development and post-shedding seed behaviour of *Encephalartos natalensis* (Zamiaceae).
- Woodenberg, W. R., Berjak, P., Pammenter, N., and Farrant, J. M. (2014). Development of cycad ovules and seeds. 2. Histological and ultrastructural aspects of ontogeny of the embryo in *Encephalartos natalensis* (Zamiaceae). *Protoplasma* 251, 797–816.
- Worcester, S. (1995). Effects of eelgrass beds on advection and turbulent mixing in low current and low shoot density environments. *Marine Ecology Progress Series* 126, 223–232.
- Wredle, U., Walles, B., and Hakman, I. (2001). DNA fragmentation and nuclear degradation during programmed cell death in the suspensor and endosperm of *Vicia faba*. *International Journal of Plant Sciences* 162, 1053–1063.

X

- Xiao, C., Chi, R., Li, X., Xia, M., and Xia, Z. (2011). Biosolubilization of rock phosphate by three stress-tolerant fungal strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165, 719–727.
- Xie, Z., Zhang, Z.-L., Hanzlik, S., Cook, E., and Shen, Q. J. (2007). Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. *Plant molecular biology* 64, 293–303.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., and Zhu, J.-K. (2002). Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *thelos6/aba1* locus in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 8588–8596.

Y

- Yang, B., Chen, M., Zhan, C., Liu, K., Cheng, Y., Xie, T., et al. (2022). Identification of OsPK5 involved in rice glycolytic metabolism and GA/ABA balance for improving seed germination via genome-wide association study. *Journal of Experimental Botany* 73, 3446–3461.

- Yang, C., Yang, L., Yang, Y., and Ouyang, Z. (2004). Rice root growth and nutrient uptake as influenced by organic manure in continuously and alternately flooded paddy soils. *Agricultural Water Management* 70, 67–81.
- Yasin, N. A., Khan, W. U., Ahmad, S. R., Ali, A., Ahmad, A., and Akram, W. (2018). Imperative roles of halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria and kinetin in improving salt tolerance and growth of black gram (*Phaseolus mungo*). *Environmental Science and Pollution Research* 25, 4491–4505.
- Yildirim, E., Donmez, M. F., and Turan, M. (2008). Use of bioinoculants in ameliorative effects on radish plants under salinity stress. *Journal of plant nutrition* 31, 2059–2074.
- Ykhlef, N. (2001). Photosynthèse, activité photochimique et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf). *Thèse de doctorat, University of Constantine* 1.
- Yousef, N. M. (2018). Capability of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for producing indole acetic acid (IAA) under extreme conditions. *European Journal of Biological Research* 8, 174–182.

Z

- Zahran, H. H. (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of biotechnology* 91, 143–153.
- Zarchini, M., Hashemabadi, D., Kaviani, B., Fallahabadi, P. R., and Negahdar, N. (2011). Improved germination conditions in *Cycas revoluta* L. by using sulfuric acid and hot water.
- Zhang, P., Senge, M., and Dai, Y. (2016). Effects of salinity stress on growth, yield, fruit quality and water use efficiency of tomato under hydroponics system. *Reviews in Agricultural Science* 4, 46–55.
- Zhang, X. (2019). Ovule development in Cycads: observation on anatomy and nucellus morphology in *Zamia* and *Cycas*. *bioRxiv*, 735837.
- Zhao, P., Alam, M. B., and Lee, S.-H. (2018). Protection of UVB-induced photoaging by Fuzhuan-Brick tea aqueous extract via MAPKs/Nrf2-mediated down-regulation of MMP-1. *Nutrients* 11, 60.
- Zheng, Y., Chiang, T.-Y., Huang, C.-L., and Gong, X. (2018). Highly diverse endophytes in roots of *Cycas bifida* (Cycadaceae), an ancient but endangered gymnosperm. *Journal of Microbiology* 56, 337–345.

ANNEXES

Annexe 1

Composition du milieu BG-11(Stanier et al., 1971)

Composé chimique	Concentration finale
NaNO ₃	17.6 mM
K ₂ HPO ₄	0.23 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.3 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.24 mM
Acide citrique, H ₂ O	0.031mM
Citrate d'ammonium ferrique	0.021 mM
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	0.0027 mM
Na ₂ CO ₃	0.19 mM
Thiosulfate de sodium, 5H ₂ O	1 mM

Annexe 2

Composition du milieu YeastExtract Medium (YEM)

Composé chimique	Concentration finale
Mannitol	5 g/L
Extrait de levure	1 g/L
K ₂ HPO ₄	0.46 g/L
KH ₂ PO ₄	0.12 g/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2 g/L
NaCl	0.1 g/L
Eau distillée	1000 ml

Pour le YEM solide, ajouter 15g d'Agar / litre + Rouge Congo pour une concentration finale de 0,0025%. Stériliser le milieu YEM par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

Annexe 3

Composition du milieu Bouillon nutritif (BN)

Constituant	Concentration finale
Bouillon nutritif	15 g/L
H ₂ O	1000 ml

Annexe 4

Préparation du réactif de Salkowsky

Constituant	Concentration finale
FeCl ₃	20 g/L
Acide sulfurique	421.9 ml
H ₂ O	1000 ml

Dans un erlenmeyer placé dans un bain d'eau froide :

- Verser 20g de FeCl₃ dans 500 ml d'eau distillée stérile, puis mélanger
- Après dissolution complète du chlorure ferrique, verser lentement 421,9 ml d'acide sulfurique concentré en agitant constamment avec une baguette de verre.
- Laisser reposer jusqu'à ce que le mélange soit froid, puis ajouter l'eau distillée, pour compléter.

Annexe 5

Gamme étalon de l'acide indole-3- acétique (AIA)

AIA en µg/ml	DO à 540
0	0
0.1	0.012
0.2	0.029
0.5	0.049
1	0.091
2	0.095
4	0.185
5	0.218
8	0.333
10	0.502
15	0.641
20	0.748
25	0.904
30	1.035
35	1.215
50	1.486
75	1.871
100	2.121
125	2.304

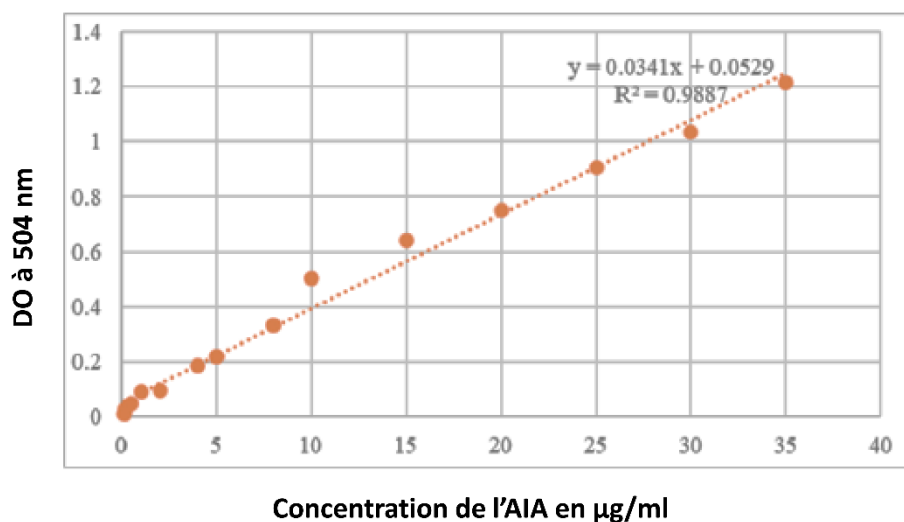


Figure. Gamme étalon de l'acide indole-3-acétique

Annexe 6

Préparation du réactif CAS (Zuberer et al., 1999)

Solution	Composition	Concentration finale
Solution 1	HDTMA	20 g/L
Solution 2	FeCl ₃ , 6 H ₂ O	1mM préparé dans HCl à 10 mM
Solution 3	CAS	2 mM
Solution 4	MES	9.76 g/ 50 ml

- Dans une fiole de 100ml, mettre la solution 1 sous agitation douce
- Ajouter goutte à goutte le mélange (1,5 ml de la solution 2+7,5ml de la solution 3)
- Ajouter la solution 4 puis compléter à 100 ml avec l'eau distillée.
- La solution CAS doit est conservée à l'obscurité et de préférence dans un flacon en polyéthylène.

Annexe 7

Préparation du milieu Modi liquide

Composé chimique	Concentration finale
Mannitol	10 g/L
Sodium glutamate	1 g/L
NaCl	0.1 g/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2 g/L
K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
NH ₄ NO ₃	1 g/L
Eau distillée	1000 ml

Annexe 8

Composition du milieu Pikovskaya phosphate (Pikovskaya, 1948)

Composé chimique	Concentration finale
Glucose	1 g/L
KCl	0.02 g/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.01 g/L
FeSO ₄ , 7H ₂ O	Traces
MnSO ₄ , 7H ₂ O	Traces
Phosphate naturel broyé	0.5 g/L
Extrait de levure	0.01 g/L
Eau distillée	1000 ml

Annexe 9

Préparation du réactif Vanadate-Molybdate

Solution A :

- $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 25g
- Eau distillée : 400ml

Solution B :

- NH_4VO_3 : 1.25g
- Eau distillée : 300ml

Dans un bêcher, on chauffe de l'eau distillée jusqu'à ébullition, puis on rajoute du NH_4VO_3 et on laisse le bêcher en ébullition. Après refroidissement de cette solution, on ajoute sous la hotte chimique 250ml d'acide nitrique concentré (60%) et on complète l'ensemble des deux solutions (A+B) jusqu'à 1 litre.

Annexe 10

Gamme étalon du dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄)

KH ₂ PO ₄ en µg/ml	DO
0	0.081
1	0.108
2.5	0.121
5	0.149
7.5	0.198
10	0.221
20	0.353
30	0.496
40	0.635
50	0.758
60	0.865
70	0.996
80	1.194
90	1.308
100	1.459
140	1.989

