

THESE

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

Centre de Recherche : Biotechnologies Végétales et Microbiennes, Biodiversité et Environnement
Structure de Recherche : Équipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire
Discipline : Biologie
Spécialité : Biotechnologies microbiennes et Agrobiologie

Présentée et soutenue le 25/06/2022 par:

Imane EL ATTAR

Potentiel des biofertilisants à base de rhizobia et/ou de rhizobactéries pour l'amélioration de la croissance et la productivité du haricot vert (*Phaseolus vulgaris* L.) sous conditions de déficits azoté et phosphoré

Devant le Jury :

Bouchra BELKADI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences-Rabat.	<i>Président</i>
Jamal IBIJBIJEN	PES, Université Moulay Ismail, Faculté des Sciences-Meknès.	<i>Rapporteur/Examineur</i>
Allal DOUIRA	PES, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences-Kénitra.	<i>Rapporteur/Examineur</i>
Laila MEDRAOUI	PH, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat.	<i>Rapporteur/Examineur</i>
Zine El Abidine TRIQUI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences-Rabat.	<i>Examineur</i>
Imane THAMI-ALAMI	Dr, Expert, Institut National de la Recherche Agronomique-Rabat.	<i>Co-directeur de thèse</i>
Jamal AURAG	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences-Rabat.	<i>Directeur de thèse</i>

Année Universitaire : 2021/2022

Dédicace

Je dédie ce travail à mon très cher Père qui a tout mis en œuvre pour que je puisse mener à bien mes études et qui a consenti de bien lourds efforts pendant des années pour le bien de toute la famille.

Je voudrais te remercier pour ta patience, ton amour, ta générosité, ta compréhension et pour tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je te dédie ce travail en reconnaissance à l'amour que tu m'offres quotidiennement et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

Je dédie également ce travail à ma merveilleuse famille, pour leur soutien de tout instant, leur patience et leurs encouragements qui m'ont permis d'avancer avec assurance et de tenir bon tout au long de ces années. Je leur serai toujours reconnaissante d'avoir inconditionnellement soutenu mes ambitions et mes rêves. Je reconnais que chacun, à sa manière et avec une égale bienveillance, a contribué à faire de moi ce que je suis aujourd'hui, que ces mots vous soient l'expression de ma gratitude infinie.

A mes chers amis Kaoutar TAHA, Ouafae PAKHAROU et Khalil CHAHDI OUAZZANI, en témoignage de toutes ces années d'amitié et en souvenir des moments heureux passés ensemble.

Avant-propos

*Ce travail a été réalisé au sein de l'Equipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire (EMBM) du Centre de recherche Biotechnologies Végétales et Microbiennes, Biodiversité et Environnement (BioBio) de la Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat et à l'unité de recherche et de valorisation des ressources naturelles de l'INRA-Rabat sous la direction du Professeur **Jamal AURAG** de la Faculté des Sciences de Rabat et la co-direction du Docteur **Imane THAMI-ALAMI**.*

*Ce travail de recherche a reçu le soutien financier de l'Académie Hassan II des Sciences et Techniques. Il s'insère dans le cadre du projet intitulé: «Mise au point et production de biofertilisants bactériens pour l'inoculation et l'amélioration de la productivité des légumineuses alimentaires au Maroc (BIOFERT) », qui a été mené par l'EMBM et l'INRA sous la coordination du professeur **Jamal AURAG**.*

Au terme de ce travail, il m'est particulièrement agréable de remercier et d'exprimer ma reconnaissance envers un grand nombre de personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation et m'ont permis de progresser dans cette phase délicate.

*En tête de liste, je tiens à exprimer ma gratitude à mon très cher Professeur **Jamal AURAG**, mon directeur de thèse, d'abord pour la confiance qu'il m'a témoigné en acceptant d'encadrer mon travail de thèse. Je vous remercie profondément d'avoir dirigé cette thèse avec l'attention et la minutie qui vous caractérisent et de m'avoir aidé à réaliser ce rêve. Avec vous j'ai découvert le monde de la recherche scientifique et j'ai appris à approfondir ma pensée scientifique grâce à nos nombreuses discussions et à vos remarques et conseils pratiques que je n'oublierai jamais. Je resterai toujours reconnaissante à votre patience durant ce parcours de recherche et surtout votre engagement quasi paternelle à mes côtés tout au long de ces années.*

*J'exprime toute ma gratitude à ma co-directrice de thèse Madame **Imane THAMI-ALAMI**, Docteur et directeur de recherche à L'INRA, de m'avoir encouragé à faire cette thèse. Je la remercie vivement pour sa gentillesse et son aide qui ont permis à mon travail d'aboutir et de voir le jour. Je la remercie plus particulièrement pour son apport et son implication dans la réalisation des essais au champ, qui ont permis de bien boucler ce travail en lui donnant la touche appliquée nécessaire pour la réalisation des objectifs initiaux. Je lui serai infiniment grée pour ses remarques avisées et professionnelles qui ont permis d'améliorer ce travail et pour son soutien permanent pour la bonne réussite de cette thèse.*

*Je tiens également à remercier mon jury de thèse, Madame **Bouchra BELKADI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, pour l'honneur qu'elle m'a accordé en acceptant de présider le jury de thèse.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à **Jamal IBIJBIJEN**, Professeur à la faculté des sciences, Université Moulay Ismail de Meknès, de m'avoir fait l'honneur d'examiner et d'être le rapporteur de ce travail afin de mieux le valoriser.*

*Mes remerciements les plus chaleureux à Monsieur **Allal DOUIRA**, Professeur à la Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail de Kénitra, qui m'a fait l'insigne honneur d'être examinateur et rapporteur de ce travail. Je vous remercie pour l'expertise et les conseils que vous m'avez apportés.*

*Mes plus vifs remerciements s'adressent également à Madame **Laila MEDRAOUI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, d'avoir accepté d'examiner et d'être le rapporteur ce travail sans aucun à priori. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.*

*Je remercie également Monsieur **Zine El Abidine TRIQUI** Professeurs à la Faculté des Sciences de Rabat, d'avoir accepté aimablement d'examiner mon travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.*

*Je souhaiterais remercier Monsieur **Mhamed EL KHADIR** qui m'a initié et m'a accompagné sur le terrain à la recherche des champs du haricot vert et d'avoir partagé ma joie avec chaque nodule décelé. Je le remercie également pour tous les efforts qu'il m'a consacré et de m'avoir fait bénéficier de son expertise et son large savoir en agronomie.*

*Je remercie chaleureusement le Professeur **Abdelkarim FILALI-MALTOUF**, ancien responsable de l'Equipe de Microbiologie et de Biologie Moléculaire, de m'avoir accueilli et permis d'utiliser les facilités du laboratoire pour la réalisation de mon travail de thèse et d'avoir mis beaucoup de moyens à notre disposition pour l'accomplissement de nos expériences.*

Que soient remerciés aussi tous les membres de l'unité de recherche et de valorisation des ressources naturelles de l'INRA-Rabat et de l'équipe de microbiologie et de biologie moléculaire pour toute aide précieuse apportée et qui a contribué à l'élaboration de ce travail.

Résumé

Le présent projet de thèse vise la mise au point de biofertilisants bactériens capables de contribuer efficacement à la nutrition et la croissance du haricot. Plusieurs prospections couvrant un total de 31 sites ont permis d'obtenir 133 isolats bactériens nodulaires. La tolérance de ces isolats à différents types de sel et à différents pH, de même que leurs activités promotrices de la croissance des plantes ont été étudiées. Une large diversité physiologique a été mise en évidence et une Analyse Factorielle de Correspondance a montré que la capacité des isolats à tolérer NaCl et KCl ainsi qu'à solubiliser le phosphate inorganique est liée aux sites de prélèvement. L'étude de l'efficacité symbiotique de 45 isolats sélectionnés a montré que seuls 18 étaient capables de re-noduler le haricot avec une efficacité relative variable (19-97%). Le séquençage de l'ADNr 16S a assigné ces isolats aux genres *Rhizobium* (2 souches) et *Agrobacterium* (16 isolats). Deux essais d'inoculation du haricot cultivé sous différents traitements phosphatés sous serre ont permis d'évaluer le potentiel biofertilisant des isolats les plus efficaces (LMR676, LMR670, LMR674) seuls ou combinés avec des PGPR (P4S9, M131, P1S6). Les deux combinaisons les plus performantes (LMR670+P1S6 et LMR670+M131) et les inocula individuels ont été par la suite évalués au champ. L'inoculation simple avec LMR670 ou M131 a permis d'améliorer significativement le rendement du haricot (14.02 t/ha et 13.07 t/ha respectivement) dépassant ainsi le contrôle positif. En définitive, l'utilisation de ces inocula dans les pratiques agronomiques permettrait d'assurer un bon rendement du haricot, la diminution des coûts de production et la préservation des écosystèmes.

Mots-clés: *Phaseolus vulgaris*, *Agrobacterium*, PGPR, Co-inoculation, Nutrition azotée, Solubilisation du phosphate.

Abstract

This thesis project aims to develop bacterial biofertilizers capable of contributing effectively to bean nutrition and growth. Several surveys covering a total of 31 sites yielded 133 bacterial isolates from common bean nodules. The tolerance of these isolates to different types of salt and different pH, as well as their Plant Growth Promoting activities were studied. A wide physiological diversity was highlighted and a Factorial Correspondence Analysis showed that the ability of isolates to tolerate NaCl and KCl as well as to solubilize inorganic phosphate is linked to the sampling sites. The study of the symbiotic efficiency of 45 selected isolates showed that only 18 were able to re-nodulate common bean with a variable relative efficiency (19-97%). The 16S rDNA gene sequencing assigned these isolates to the genera *Rhizobium* (2 strains) and *Agrobacterium* (16 isolates). Two inoculation trials of common bean grown under different phosphate treatments in greenhouse conditions made it possible to evaluate the biofertilizing potential of the most efficient isolates (LMR676, LMR670, LMR674) alone or combined with PGPRs (P4S9, M131, P1S6). The two best performing combinations (LMR670+P1S6 and LMR670+M131) and the individual inocula were then evaluated in the field. Single inoculation with LMR670 or M131 significantly improved bean yield (14.02 t/ha and 13.07 t/ha respectively) exceeding the positive control. Ultimately, the use of these inocula in agronomic practices would ensure good bean yields, reduce production costs and help in the preservation of ecosystems.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, *Agrobacterium*, PGPR, Co-inoculation, Nitrogen nutrition, Phosphate solubilisation.

Liste des abréviations

A.	: <i>Agrobacterium</i>
ACC	: 1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNr	: Acide désoxyribonucléique ribosomique
AFC	: Analyse Factorielle de Correspondance
AIA	: Acide indole-3-acétique
ANOVA	: Analyse de la variance
ARNr	: Acide Ribonucléique Ribosomique
BAC	: Bloc Aléatoire Complet
CAS	: Chrome Azurol-S
CE	: Conductivité électrique
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
EDTA	: Acide éthylène diamine tétra acétique
Efr	: Efficience relative
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
LSD	: Least Significant Difference
NJ	: Neighbor-Joining
OD	: Densité optique
P	: Phosphate
P.	: <i>Phaseolus</i>
pb	: Paire de bases
PCR	: Polymerase chain reaction
PGPR	: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PVK	: Pikovskaya
R.	: <i>Rhizobium</i>
rpm	: Rotation par minute
STP	: Super Triple Phosphate
Trp	: Tryptophane
UFC	: Unité Formant Colonie
YEM	: Yeast Extract Mannitol

Liste des tableaux

- Tableau I- 1:** Espèces de rhizobium isolées à partir des nodules de *P. vulgaris*
- Tableau II-1:** Mélange réactionnel utilisé dans la PCR de l'ADNr 16S
- Tableau II-2:** Sites de collecte
- Tableau II-3:** Fréquence de la production d'AIA chez les isolats.
- Tableau II-4:** Fréquence de la solubilisation du phosphate naturel chez les isolats.
- Tableau II-5:** Fréquence de la production des sidérophores chez les isolats.
- Tableau II-6:** Groupes des variables utilisés dans l'Analyse Factorielle de Correspondance
- Tableau II-7:** Effet de l'inoculation sur le poids sec aérien, racinaire, nodulaire et sur le nombre de nodules des plantes du haricot vert sous conditions contrôlées.
- Tableau II-8:** Origine et identité des souches PGPR
- Tableau II-9 :** Production d'ammoniac par les isolats testés
- Tableau III-1:** Origine et traits PGP principaux des souches sélectionnées pour le test d'inoculation
- Tableau III-2:** Traitements et inoculations appliquées pour le premier test d'inoculation
- Tableau III-3:** Traitements et inoculations appliquées pour le deuxième test d'inoculation
- Tableau III-4:** Analyse du sol utilisé dans les essais d'inoculation sous conditions contrôlées
- Tableau III-5:** Effet de l'inoculation simple et combinée sur les différents paramètres de la croissance du haricot vert fertilisé avec 20% de la roche phosphatée
- Tableau III-6:** Effet de l'inoculation simple et combinée sur les différents paramètres de la croissance du haricot vert amendé avec 80 kg/ha du P soluble.
- Tableau III-7:** Effet de l'inoculation simple et combinée sur les différents paramètres de la croissance du haricot vert amendé avec 20% de la roche phosphatée
- Tableau III-8:** Effet de l'inoculation simple et combinée sur les différents paramètres de la croissance du haricot vert sans amendement phosphaté (P0).
- Tableau III-9:** Effet de l'inoculation simple et combinée sur les différents paramètres de la croissance du haricot vert amendé avec 80 kg/ha du STP
- Tableau IV-1:** Traitements appliqués au champ
- Tableau IV-2:** Effet de l'inoculation simple et combinée sur les différents paramètres de la croissance du haricot vert inoculé au champ.

Liste des figures

- Figure I- 1:** Superficie et production du haricot vert au Maroc (Harbouze *et al.*, 2019).
- Figure I- 2:** Développement du nodule racinaire (Singh *et al.*, 2019b).
- Figure I- 3:** Présentation schématique du cycle du phosphore montrant la répartition du stock total de P du sol entre les différents pools de P (Tian *et al.*, 2021).
- Figure I- 4:** Mécanismes de contribution des PGPR à l'atténuation du stress salin favorisant la croissance des plantes (Paul and Lade, 2014).
- Figure I- 5:** Modes d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (Chauhan *et al.*, 2022).
- Figure I- 6:** Représentation schématique des mécanismes de la solubilisation/minéralisation et immobilisation du phosphore (Sharma *et al.*, 2013).
- Figure II- 1:** Positions géographiques des zones de prospection
- Figure II- 2:** Diagramme représentant le pourcentage d'isolats tolérants les différentes concentrations de NaCl, KCl et CaCl₂.
- Figure II- 3:** Diagramme représentant le pourcentage d'isolats tolérants les pH appliqués.
- Figure II- 4:** Biplot de la relation entre les sites de prélèvement des isolats et leur tolérance à KCl (a) et NaCl (b).
- Figure II- 5:** Biplot de la relation entre les sites de prélèvement des isolats et leur capacité à solubiliser le phosphate inorganique.
- Figure II- 6:** Biplot de la relation entre la capacité des isolats à tolérer KCl (a) et NaCl (b) et la production des sidérophores.
- Figure II- 7:** Biplot de la relation entre la capacité des isolats à tolérer le pH et la production des sidérophores.
- Figure II- 8:** Arbre phylogénique généré par l'analyse des séquences du gène ARNr 16S des souches nodulant le haricot vert. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées sur les points de branchement.
- Figure II- 9:** Suivi pendant 72h de la croissance bactérienne, de la solubilisation du phosphate et du pH des milieux de culture des souches de rhizobia (a, c, e) et de PGPR (b, d, f).
- Figure II- 10:** Suivi pendant 72h d'incubation de la production d'AIA (a-b) et croissance bactérienne (c-d) des rhizobia (LMR670, LMR676 et LMR674) et des PGPR (P4S9, P1S6 et M131).
- Figure II-11:** Croissance bactérienne en présence de MgSO₄, (NH₄)₂SO₄ et ACC

Liste des annexes

- Annexe 1 :** Composition chimique des milieux de culture
- Annexe 2 :** Réactifs
- Annexe 3 :** Solution nutritive de base des plantes (Broughton and Dilworth, 1971)
- Annexe 4 :** Composition du tampon de lyse
- Annexe 5 :** Figures de corrélation
- Annexe 6 :** Tableau des activités PGP et tolérance des isolats sélectionnés pour le test d'infectivité
- Annexe 7 :** Photos montrant la nodulation et l'effet de l'inoculation sur la croissance du haricot vert

Production scientifique

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse et dans d'autres travaux de recherche auxquels j'ai participé durant mes années de thèse ont fait l'objet de publications dans des revues indexées à comité de lecture et ont été présentés dans plusieurs manifestations nationales et internationales sous forme de communications orales et affichées :

Articles publiés

Imane El Attar; Kaoutar Taha; Boubacar Diouf, Hajar Ait Jenk, El Bekkay Berraho, Imane Thami Alami and Jamal Aurag., 2022. Phytobeneficial bacterial inoculants for common bean growth and productivity in nitrogen and phosphorus deficient soils. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*.59:157-163. DOI: 10.21162/PAKJAS/22.485

Kaoutar Taha; **Imane El Attar**; Mohammed Hnini; Gilles Béna; Jamal Aurag and El Bekkay Berraho. 2022. Beneficial effect of *Rhizobium laguerreae* co-inoculated with native *Bacillus* sp. and *Enterobacter aerogenes* on lentil growth under drought stress. *Rhizosphere* 22, 100523. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100523>.

Imane El Attar; Kaoutar Taha; Berraho El Bekkay; Mhamed El Khadir; Imane Thami Alami and Jamal Aurag., 2019. Screening of stress tolerant bacterial strains possessing interesting multi-plant growth promoting traits isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 20, 101225. DOI 10.1016/j.bcab.2019.101225

Kaoutar Taha; El Bekkay Berraho; **Imane El Attar**; Samia Dekkiche; Jamal Aurag; Gilles Béna., 2017. *Rhizobium laguerreae* is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris*) in Morocco. *Syst. Appl. Microbiol.* DOI 10.1016/j.syapm.2017.09.008

Communications orales:

- **El Attar Imane**, Taha Kaoutar, Berraho EL Bekkay, Mhamed El Khadir, Thami Alami Imane and Aurag Jamal (2018): Caractérisation et sélection de souches tolérantes au stress isolées des nodules de *Phaseolus vulgaris* L. possédant des caractéristiques intéressantes pour la croissance des plantes. 2^{ème} Rencontres Francophones sur les Légumineuses. Toulouse, France 17-20 Octobre 2018.

- **El Attar Imane**, Diouf Boubacar., Ait Jenk Hajar, Taha Kaoutar, Thami Alami Imane and Aurag Jamal (2017): Screening of effective native common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia and their use in mixed inocula with Plant Growth Promoting Rhizobacteria under different phosphorus conditions, Granada, Espagne 3-7 Septembre 2017.

- **El Attar Imane**, Diouf Boubacar, Thami Alami Imane, Aurag Jamal. (2016): Effet de la co-inoculation avec des souches de rhizobium et de PGPR sur la croissance du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) en conditions semi contrôlées. 1^{ères} Rencontres Francophones sur les Légumineuses, Dijon, France, 31 mai et 1er juin 2016.

El Attar Imane, Thami Alami Imane, El Khadir Mhamed, Aurag Jamal. Etudes physiologiques et moléculaires des isolats bactériens prélevés des nodules du haricot vert. Doctoriales FSR, Université MedV - Rabat, Maroc 2014.

Communications affichées :

- Kaoutar Taha, **Imane El Attar**, Amina Raif, Imane Thami Alami, Jamal Aurag, Gilles Béna and El Bekkay Berraho. Effet combiné des souches de *Rhizobium laguerreae* et de PGPRs sur la croissance de la lentille (*Lens culinaris* Medik.) dans des conditions de déficit hydrique. Toulouse, France 17-20 Octobre 2018.

- **El Attar Imane**, Diouf Boubacar, Ait Jenk Hajar, Taha Kaoutar, Thami Alami Imane and Aurag Jamal: Screening of effective native common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia and their use in mixed inocula with Plant Growth Promoting Rhizobacteria under different phosphorus conditions Mediterranean Forum “Research and Innovation as Tools for Sustainable Agriculture, Food and Nutrition Security », Bari, Italy 17-20 Septembre 2018.

- Kaoutar Taha, **Imane El Attar**, Amina Raif, Imane Thami Alami, Jamal Aurag, Gilles Béna and El Bekkay Berraho. *Rhizobium laguerreae* in combination with *Enterobacter aerogens* and *Bacillus* sp improves lentil water stress tolerance. Bari, Italy 17-20 Septembre 2018.

- Kaoutar Taha, El Bekkay Berraho, **Imane El Attar**, Samia Dekkiche, Jamal Aurag, Gilles Béna. *Rhizobium laguerreae* is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris* Medik.) in Morocco. Granada, Espagne 3-7 Septembre 2017.

- **El Attar Imane**, Diouf Boubacar, Thami Alami Imane and Aurag Jamal: Common bean co-inoculation with plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia: impact on nodulation and growth under greenhouse. International Conference on Pulses », Marrakech, Morocco. 18-20 April, 2016.

- **El Attar Imane**, Thami Alami Imane, El Khadir Mhamed, Aurag Jamal. Diagnosis of common bean inoculation needs and selection of effective bacterial biofertilizers adapted to soil conditions of the Skhirate region in Morocco. Rhizosphere 4 Conference. Maastricht, Netherlands le 21-25 June 2015.

- **El Attar Imane**, Thami Alami Imane, El Khadir Mhamed, Aurag Jamal. Diagnostic du besoin en inoculation du haricot vert (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivé dans la région de Skhirat. Doctoriales FSR, Université MedV - Rabat, Maroc 2014.

Sommaire

Dédicace	i
Avant-propos	ii
Résumé	iv
Abstract	v
Liste des abréviations	vi
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des annexes.....	ix
Production scientifique.....	x
Introduction générale.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	3
I. Synthèse bibliographique	4
I.1 Haricot vert : aperçu générale	4
I.1.1 Origine et extension de la culture du haricot	4
I.1.2 Description générale	4
I.1.3 Production.....	5
I.1.4 Nutrition azotée chez le haricot	5
I.2 Symbiose <i>Rhizobium</i> -Légumineuse	6
I.2.1 Le rhizobium.....	6
I.2.2 Classification des rhizobia.....	7
I.2.3 La nodulation	7
I.3 La symbiose rhizobium-haricot	8
I.3.1 Diversité des rhizobia associés au haricot	8
I.3.2 Fixation biologique d'azote chez le haricot.....	9
I.4 Facteurs limitants la symbiose rhizobium-légumineuses.....	9
I.4.1 Les facteurs nutritionnels : le cas du phosphore.....	9
I.4.1.1 Le phosphore dans le sol	9
I.4.1.2 La biodisponibilité du phosphore	10
I.4.1.3 Le déficit en phosphore dans le sol	11
I.5 Principaux facteurs physico-chimiques limitant la symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuses	11
I.5.1 La salinité	12
I.5.1.1 Définition.....	12
I.5.1.2 Effet du stress salin sur la croissance des plantes	12
I.5.1.3 Effet du stress salin sur la croissance bactérienne.....	12
I.5.1.4 Effet du stress salin sur la symbiose.....	12
I.5.2 Le pH	13
I.5.2.1 Effet du pH sur la croissance des légumineuses	13
I.5.2.2 Effet du pH sur la croissance bactérienne	14
I.5.2.3 Effet du pH sur la symbiose légumineuse- <i>Rhizobium</i>	14
I.6 Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes.....	14
I.6.1 Principaux mécanismes d'action des PGPR	15
I.6.1.1 Fixation d'azote.....	15
I.6.1.2 Solubilisation bactérienne du phosphate	16
I.6.1.3 Solubilisation du potassium (K).....	17
I.6.1.4 Production des Sidérophores	17
I.6.1.5 Production d'Auxine	18
I.6.2.6 Production de l'ACC désaminase	18

I.7 L'inoculation bactérienne comme moyen d'allègement des stress nutritionnels et abiotiques affectant la symbiose rhizobium-légumineuses	19
I.7.1 Inoculation par les rhizobia	19
I.7.2 Effet de l'inoculation avec les PGPR	19
I.7.3 Co-inoculation des légumineuses avec les rhizobia et les PGPR	20
Chapitre II : Isolement et caractérisation des souches des nodules du haricot vert	21
II.1 Introduction	22
II.2 Matériel et méthodes	23
II.2.1 Collecte des plantes de haricot et isolement des bactéries symbiotiques.....	23
II.2.2 Collecte des nodules.....	23
II.2.3 Désinfection des nodules.....	24
II.2.4 Isolement bactérien à partir des nodules	24
II.2.5 Purification des isolats	24
II.2.6 Caractérisation physiologique et criblage des souches	24
II.2.6.1 Préparation des cultures bactériennes	25
II.2.6.2 Tolérance à la salinité	25
II.2.6.3 Tolérance au pH.....	25
II.2.7 Evaluation des activités PGPR.....	25
II.2.7.1 Solubilisation du phosphate	26
II.2.7.2 Production d'Acide Indole Acétique (AIA).....	26
II.2.7.3 Production des sidérophores	27
II.2.7.4 Production d'ACC-désaminase.....	28
II.2.7.5 Production d'ammoniac (NH ₃)	28
II.2.8 Evaluation de l'efficacité symbiotique des isolats de la collection	28
II.2.8.1 Préparation de culture bactérienne et semi	28
II.2.8.2 Inoculation et conduite de l'essai.....	29
II.2.9 Identification moléculaire des souches nodulant le haricot vert	29
II.2.9.1 Extraction de l'ADN génomique	30
II.2.9.2 Amplification de l'ADN ribosomal 16S.....	31
II.2.9.3 Analyse des séquences nucléotidiques, correction et alignement.....	31
II.2.9.4 Analyse phylogénétique.....	31
II.2.10 Analyses statistiques	32
II.3 Résultats.....	32
II.3.1 Collecte des plantes et isolats bactériens.....	32
II.3.2 Caractérisation physiologique et criblage des souches	33
II.3.2.1 Tolérance à la salinité	33
II.3.2.2 Tolérance au Ph.....	34
II.3.2.3 Production d'Acide Indole Acétique (AIA).....	35
II.3.2.4 Solubilisation du Phosphate	35
II.3.2.5 Production des sidérophores	36
II.3.3 Analyse Factorielle de Correspondance (AFC)	36
II.3.4 Evaluation de l'efficacité symbiotique des isolats de la collection.....	39
II.3.5 Identification moléculaire des souches	40
II.3.6 Caractérisation des souches sélectionnées pour les tests de la double inoculation	42
II.3.6.1 Production de NH ₃	42
II.3.6.2 Cinétique de solubilisation du phosphate inorganique	42
II.3.6.3 Cinétique de production d'AIA	44
II.3.6.4 Activité ACC désaminase	45
II.4 Discussion.....	45

Chapitre III : Evaluation de l'effet de l'inoculation par des souches sélectionnées sur la croissance du haricot sous conditions contrôlées	53
III.1 Introduction	54
III.2 Matériel et méthodes	55
III.2.1 Premier essai d'inoculation du haricot par des souches sélectionnées d'agrobacterium et de PGPR sous différents traitements de phosphate.....	55
III.2.1.1 Souches bactériennes utilisées	55
III.2.1.2 Test d'antagonisme entre souches de PGPR et d' <i>Agrobacterium</i>	55
III.2.1.3 Préparation du dispositif expérimental	56
III.2.2 Deuxième essai d'inoculation du haricot sous différents traitements phosphatés	57
III.2.2.1 Traitements phosphatés et inoculation bactérienne	58
III.3 Résultats	58
III.3.1 Test d'antagonisme entre souches de PGPR et d'agrobacterium	58
III.3.2 Premier essai d'inoculation du haricot sous différents traitements de phosphate	59
III.3.2.1 Analyse du sol	59
III.3.2.2 Paramètres de nodulation et de croissance	59
III.3.3 Deuxième essai d'inoculation du haricot sous différents traitements phosphatés	61
III.4 Discussion	64
Chapitre IV : Etude de l'effet de l'inoculation sur la croissance et la productivité du haricot vert au champ	66
IV.1 Introduction	67
IV.2 Matériel et méthodes	68
IV.2.1 Installation de l'essai et traitements appliqués	68
IV.2.2 Préparation des inocula et inoculation des graines	68
IV.2.3 Récolte et mesure des paramètres mesurés.....	69
IV.2.4 Analyses statistiques	69
IV.3 Résultats	69
IV.3.1 Effet de l'inoculation sur la croissance et la nodulation du haricot au champ	69
IV.3.2 Effet de l'inoculation sur le rendement du haricot	70
IV.4 Discussion	71
Conclusion générale	75
Références bibliographiques	78
Annexes	89
Articles	98

Introduction générale

Le haricot vert (*Phaseolus vulgaris* L.) est une légumineuse très appréciée dans le monde entier et estimée comme une source importante de protéines alimentaires (22% du poids de graines). Cette légumineuse est largement cultivée en Amérique centrale et du Sud, en Asie ainsi que dans de nombreux pays d'Afrique. Parmi les pays africains, le Maroc occupe déjà la deuxième place mondiale dans la production de ce légume, en termes de rendement (188 256 hg/ha) (FAOstat, 2020). Cependant, la production du haricot au Maroc repose principalement sur l'utilisation des engrais chimiques. Bien que cette fertilisation augmente le rendement des cultures et garantie l'obtention d'une meilleure qualité des produits, ces molécules de synthèse sont responsables d'une pollution massive des sols, mais sont surtout la cause majeure de pollution des eaux souterraines, principaux réservoirs d'eau potable (Savci, 2012).

Aujourd'hui, l'agriculture moderne vise l'intensification de la production végétale de manière durable en substituant les intrants chimiques par des pratiques respectueuses de l'environnement telles que l'exploration de la fixation de l'azote atmosphérique (N₂). Or, cette propriété est exclusivement rencontrée chez les espèces de légumineuses qui sont capables d'établir une symbiose avec un groupe de bactéries généralement appelées rhizobium. Cependant, malgré la capacité de *P. vulgaris* à établir une symbiose avec une grande variété de bactéries, ces relations symbiotiques sont souvent inefficaces (Michiels *et al.*, 1998). En effet, on considère depuis longtemps que le pouvoir de fixation de l'azote chez le haricot est moins bon que celui d'autres légumineuses (Peoples *et al.*, 2009) à cause de l'irrégularité de la nodulation chez cette légumineuse due à la grande diversité des rhizobia capables de s'y associer (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2000), d'où la nécessité de sélectionner des symbioses haricot-rhizobia plus performantes.

Ainsi, pour une symbiose réussie du haricot vert dans un sol donné, le choix de souches efficaces et compatibles avec les variétés utilisées doit être fait avec grand intérêt. A cet effet, le criblage de souches de rhizobia natifs les plus efficaces, s'il en existe dans le sol étudié, pour la fixation symbiotique d'azote semble être l'approche la plus prometteuse. Outre la fixation d'azote, certains rhizobia sont dotés d'autres mécanismes grâce auxquels ils peuvent promouvoir la croissance des plantes à savoir : l'amélioration de la nutrition minérale à travers la solubilisation des phosphates, la modulation des taux d'hormones végétales par la production de phytohormone comme des auxines, l'amélioration de la disponibilité du fer aux plantes grâce à la libération de sidérophores bactériens capables de chélater le fer. Ils peuvent aussi améliorer

la réponse des plantes face à différents stress abiotiques grâce à la production de l'ACC désaminase (Backer *et al.*, 2018) .

L'ensemble de ces propriétés bénéfiques pour les plantes font partie de ce qu'on appelle communément des traits PGP (Plant Growth Promotion) et les bactéries qui en possèdent sont nommées PGPB et celles isolées de la rhizosphère PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). L'inoculation avec ce type de micro-organismes (bio-engrais) permettraient d'améliorer la croissance et la production des plantes dans des conditions nutritionnelles déséquilibrées, réduire l'utilisation des engrais chimiques et diminuer de ce fait leurs effets délétères sur l'environnement (O'connell, 1992). Parmi les approches suggérées, l'application combinée des PGPR et des rhizobia s'avère être une voie très prometteuse pour assurer une bonne croissance des légumineuses avec un minimum d'amendements chimiques.

Dans le contexte de cette voie prometteuse, la présente étude a été conçue pour sélectionner des inocula de rhizobium isolés des sols où le haricot vert est cultivé au Maroc et présentant de bonnes capacités symbiotiques et / ou diverses caractéristiques PGP pertinentes. Le but ultime de notre travail étant de prôner une meilleure utilisation de ces microorganismes (rhizobium et PGPR) comme biofertilisants qui contribuent à la nutrition de cette légumineuse en azote et phosphore au détriment des engrais chimiques. Pour ce faire, ce travail de thèse est subdivisé en 4 volets :

- 1- Le premier chapitre est une synthèse générale des connaissances actuelles qui met l'accent sur la culture du haricot vert et les rhizobia associés à cette plante ainsi que les bactéries promotrices de la croissance des plantes.
- 2- Le second chapitre est dédié à l'isolement et la caractérisation *in-vitro* des isolats associés à *P. vulgaris* obtenus à partir des nodules récoltés *in-vivo* et une évaluation du potentiel symbiotique d'un sous-ensemble de souches sélectionnées.
- 3- Le troisième chapitre concerne l'évaluation de l'effet de la co-inoculation de PGPR et de rhizobia sélectionnés sur la croissance et la nodulation du haricot vert dans un sol à faible teneur en P et en N.
- 4- Le quatrième et dernier chapitre présente une étude complémentaire ayant pour but d'évaluer l'utilisation potentielle des combinaisons sélectionnées à améliorer la productivité et le rendement du haricot vert au champ sous déficit phosphaté et azoté.
- 5- Une conclusion générale qui fait le bilan du travail effectué avec des conclusions pertinentes retenues pour chaque étude et des perspectives.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

Les légumineuses représentent une famille d'une grande importance économique à l'échelle mondiale, elles occupent une place très importante tant dans la nutrition humaine (lentille, pois-chiche, haricot...) que dans l'alimentation animal (soja, luzerne, trèfle...). Les légumineuses constituent une composante essentielle dans l'alimentation particulièrement dans les pays en développement où elles représentent la principale source de protéines (Graham and Vance, 2003). En plus de leur importance nutritionnelle, elles interviennent aussi dans le maintien des systèmes de production en préservant la fertilité du sol grâce à la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique à l'aide des nodosités induites par les rhizobia au niveau des racines.

I.1 Haricot vert : aperçu général

I.1.1 Origine et extension de la culture du haricot

La culture du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) est considérée comme une des plus anciennes ; sa domestication date de plus de 8000 ans (Bitocchi *et al.*, 2012). *P. vulgaris* a été localisée dans plusieurs sites en Amérique Centrale, et dans la région Andine de l'Amérique du Sud dans le Nord-Ouest de l'Argentine et dans le Nord du Pérou (Tohme *et al.*, 1995). Le Mexique a été accepté comme étant son lieu d'origine le plus probable, ou du moins, comme étant son principale centre de diversification et ensuite transporté vers d'autres continents depuis le 16^{ème} siècle (Bernal and Graham, 2001). De nos jours l'espèce est bien établie dans de nombreux pays africains et davantage apprécié dans le monde entier.

I.1.2 Description générale

Le haricot est une plante annuelle herbacée largement cultivée et consommée dans le monde entier principalement pour ses graines riches en protéines. Sa contribution à une nutrition humaine équilibrée est particulièrement importante dans certains pays de l'Afrique de l'Est et de l'Amérique latine, où elle constitue une source importante de protéines (65% du total consommé) et de glucides (32% du total consommé) pour plus de 300 millions de personnes (Blair *et al.*, 2010). Le haricot est aussi une source précieuse de fibres diététiques, d'oligo-éléments comme le Fer, le Zinc, la thiamine et l'acide folique (Broughton *et al.*, 2003). Il existe deux classes commerciales majeures : les haricots verts et les haricots secs, la plus connue est le haricot vert cultivé dans toutes les régions tempérées et chaudes du globe.

I.1.3 Production

En 2019, la superficie mondiale récoltée pour le haricot vert était de 33.1 millions d'hectares avec une production qui a dépassé 28 millions de tonnes. Les principaux producteurs étant le Mexique, les Philippines, le Maroc et les États-Unis d'Amérique qui vient en tête de la liste (Nadeem *et al.*, 2021). Le Maroc vient au 4^{ème} rang quant à la production mondiale du haricot et au 3^{ème} rang quant au rendement (188 256 hg/ha). Au Maroc, le haricot vert est cultivé sur 5 813 ha en moyenne en 2020 pour une production de 109 433 tonnes, après un record de 214 000 tonnes en 2009/10 (FAOstat). En 2017, les exportations de haricot vert ont atteint 125 000 tonnes (Figure I-1) et le Maroc était le premier fournisseur de haricot vert au marché européen devant le Kenya, avec 124 400 tonnes écoulées en 2017 pour une valeur de 241 millions de dollars (Harbouze *et al.*, 2019). Les principales zones de production au Maroc sont les régions de Skhirate, Berkane, Beni Mellal et la zone du sud à savoir Chtouka, Agadir et Marrakech.

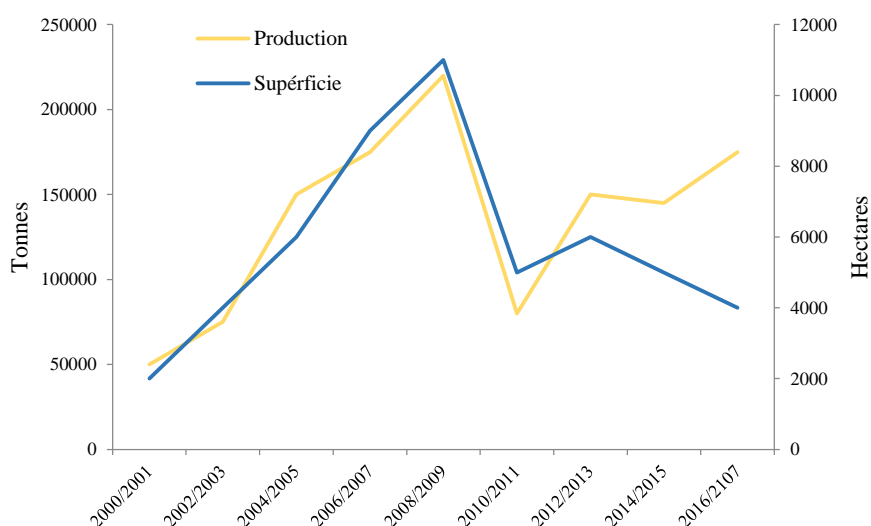


Figure I-1: Superficie et production du haricot vert au Maroc (Harbouze *et al* 2021).

I.1.4 Nutrition azotée chez le haricot

Comme toutes les légumineuses, le haricot vert dispose de deux voies d'alimentation azotée: l'assimilation des nitrates du sol ou des engrais (via la nitrate-réductase de la plante) et la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (via la nitrogénase de la bactérie). Cependant, la contribution de chacune de ces deux voies à l'alimentation en azote (N_2) de la plante varie beaucoup selon les espèces et les conditions de la culture (Kawaka *et al.*, 2014). L'assimilation des nitrates permet, en général, l'obtention de rendements élevés lorsque le mode d'apport de l'azote est optimal. Une augmentation du rendement du haricot vert est observée avec une

addition de 120-140 kg d' N_2 /ha. Cependant, en cas de faibles apports d'azote, les rendements obtenus diminuent et les potentialités des cultivars ne sont pas atteintes. Il faut donc optimiser l'apport de l'azote pour une amélioration de la production. Cette optimisation peut être accomplie grâce à une sélection des génotypes de haricot vert présentant une meilleure capacité de fixation d'azote en présence d'un apport d'engrais azotés réduit (Reinprecht *et al.*, 2020). Ceci permettra de réduire les intrants azotés et de rendre les cultures de haricots moins dépendantes des engrais azotés.

I.2 Symbiose *Rhizobium*-Légumineuse

La symbiose rhizobienne est une association entre les plantes de la famille des légumineuses et des bactéries du type rhizobium. Les racines de la plante hôte s'associent avec les rhizobia pour générer des structures hautement spécialisées: les nodules fixateurs d'azote. Cette relation symbiotique constitue une des plus importantes interactions plante-bactérie aussi bien sur le plan scientifique qu'économique. Elle se met en place grâce à des interactions multiples entre les deux partenaires conduisant à la formation des nodules où se réalisent la fixation d'azote. La symbiose rhizobium-légumineuse est économiquement importante car elle réduit considérablement l'utilisation des engrais synthétiques coûteux et la libération des gaz à effet de serre majeur comme le N_2O .

I.2.1 Le rhizobium

Les rhizobia sont des symbiotes capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote atmosphérique avec les légumineuses. Ces bactéries appartiennent à divers genres et espèces des α et β -Proteobactéries (Chen *et al.*, 2003; MacLean *et al.*, 2007). Les rhizobiums peuvent exister sous deux formes: à l'état libre dans la rhizosphère ou à l'état symbiotique à l'intérieur des nodules racinaires. Ils sont considérés comme un excellent exemple des bactéries du sol capables de fournir un macroélément aux plantes, car ils fixent l'azote atmosphérique et le transfèrent à la plante sous une forme assimilable (NH_3) et reçoivent en contre partie des sources de carbone issues de la photosynthèse des plantes nécessaires à leur développement. Une souche de rhizobium ne peut être considérée efficace que si elle peut fixer l'azote atmosphérique au sein des nodules de sa plante hôte. L'efficacité d'une souche est généralement estimée par la mesure de différents paramètres de croissance de la plante ou bien du pourcentage d'azote de la plante dérivé de la fixation symbiotique après l'inoculation par cette souche.

I.2.2 Classification des rhizobia

L'identification et la classification des rhizobia, comme les autres bactéries, a été pendant longtemps basée uniquement sur des critères morphologiques et biochimiques. Les avancés en biologie moléculaire ont permis de développer des méthodes dont l'intérêt et la finesse se sont accrus au fil des années. Chez les rhizobia la combinaison de différentes méthodes et marqueurs moléculaires ont permis d'améliorer considérablement leur taxonomie durant ces dernières années. A ce jour, un total de 61 espèces de rhizobia répartis en 13 genres à savoir *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Methylobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Cuprivaidus*, et *Devosia* (Dasgupta *et al.*, 2021).

L'étude taxonomique des rhizobia est toujours en évolution, le développement de nouvelles techniques moléculaires et génomiques ainsi que l'étude des légumineuses sauvages pourraient contribuer à la description de nouvelles espèces de rhizobiums révélant une plus grande diversité encore inconnue permettant ainsi une meilleure compréhension de l'origine et l'évolution des symbioses légumineuses-rhizobium. Ceci laisse supposer que les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote sont beaucoup plus diverses que ce qu'ont révélées les études à ce jour.

I.2.3 La nodulation

La symbiose légumineuse-rhizobium est une interaction hautement spécifique et régulée, elle nécessite un dialogue moléculaire très compliqué. Ce processus se réalise via une cascade d'étapes commençant par une colonisation bactérienne de la rhizosphère et l'attachement des bactéries aux poils absorbants racinaires. La plante libère à travers ses exsudats racinaires des flavonoïdes qui attirent les bactéries symbiotiques par chimiotactisme. Les flavonoïdes émis par la plante induisent l'expression de gènes nod et la synthèse de facteurs Nod bactériens. En réponse les bactéries produisent des facteurs de nodulation (facteurs Nod) qui vont induire de nombreuses réponses chez la plante, dont la déformation des poils racinaires, la division des cellules corticales, la formation de primordia nodulaires et ainsi la formation des nodules (Singh *et al.*, 2019b) (Figure I-2). Au sein des nodules, les bactéries bénéficient des produits issus de la photosynthèse de la plante hôte et se différencient en bactéroïdes fixant l'azote atmosphérique.

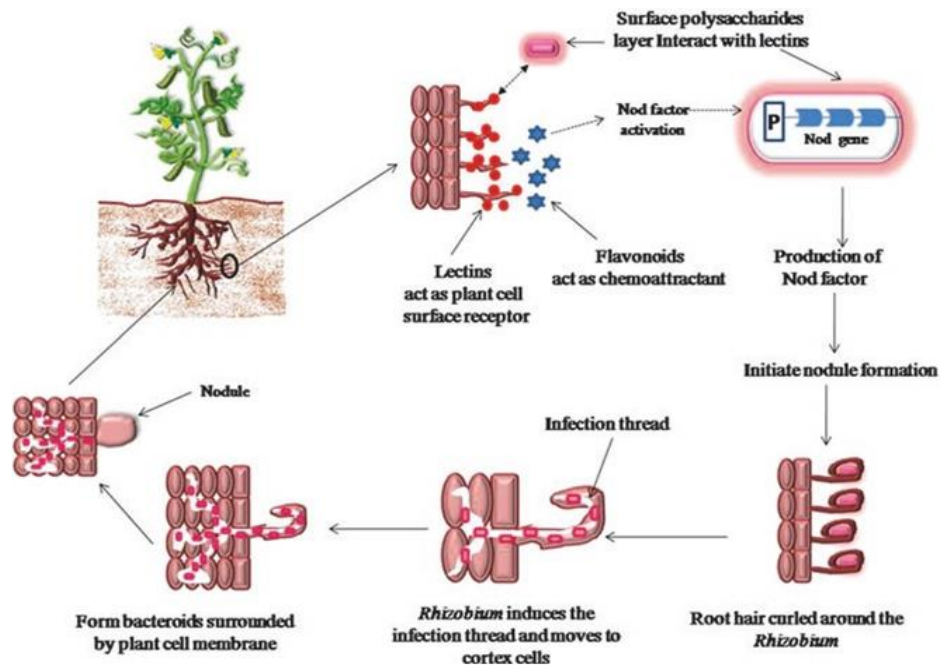


Figure I- 2: Développement du nodule racinaire (Singh *et al.*, 2019b).

I.3 La symbiose rhizobium-haricot

I.3.1 Diversité des rhizobia associés au haricot

La symbiose *Rhizobium* - *P. vulgaris* a été étudiée dans le monde entier, principalement en Amérique latine qui est accepté comme étant le centre de distribution de cette espèce.

Tableau I-1: Espèces de rhizobium isolées à partir des nodules de *P. vulgaris*

Espèces	Pays (souche type)	Symbiovar	Références
<i>Rhizobium aethiopicum</i>	Ethiopie	Inconnu	Aserse <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhizobium acidisoli</i>	Mexique	<i>Phaseoli</i>	Román-Ponce <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhizobium azibense</i>	Tunisie	<i>Gallicum</i>	Mnasri <i>et al.</i> (2014)
<i>Rhizobium chutanense</i>	Chinae	<i>Phaseoli</i>	Huo <i>et al.</i> (2019)
<i>Rhizobium ecuadorensis</i>	Ecuador	<i>Phaseoli</i>	Ribeiro <i>et al.</i> (2015)
<i>Rhizobium etli</i>	Mexique	<i>Phaseoli</i>	Segovia <i>et al.</i> (1993)
<i>Rhizobium esperanzae</i>	Mexique	<i>Phaseoli</i>	Cordeiro <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhizobium freirei</i>	Brazil	<i>Tropici</i>	Ribeiro <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhizobium gallicum</i>	France	<i>Gallicum</i>	Amarger <i>et al.</i> (1997)
<i>Rhizobium hidalgonense</i>	Mexique	<i>Phaseoli</i>	Yan <i>et al.</i> (2017a)
<i>Rhizobium leucaenae</i>	Brazil	<i>Tropici</i>	Ribeiro <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhizobium lusitanum</i>	Portugal	<i>Phaseoli</i>	Valverde <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhizobium mesoamericanum</i>	Mexique	Inconnu	Ribeiro <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhizobium paranaense</i>	Brazil	Inconnu	Ribeiro <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhizobium phaseoli</i>	USA	<i>Phaseoli</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhizobium tropici</i>	Colombia	<i>Tropici</i>	Ormeño-Orrillo <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhizobium vallis</i>	Chine	<i>Phaseoli</i>	Wang <i>et al.</i> (2011)
<i>Pararhizobium giardini</i>	France	<i>Phaseoli</i>	Mousavi <i>et al.</i> (2015)

Plusieurs études ont démontré que le haricot est une plante capable de percevoir les signaux de nodulation de plusieurs rhizobia et ainsi former des nodules efficaces avec des groupes bactériens génétiquement hétérogènes et d'origines différentes (Tableau I-2). Il a été également démontré que le haricot est capable de former des nodules par une beta-Proteobactérie : *Burkholderia phymatum* (Talbi *et al.*, 2010).

I.3.2 Fixation biologique d'azote chez le haricot

La fixation biologique d'azote chez les légumineuses varie selon les espèces. Le haricot figure parmi les espèces ayant une faible capacité de fixation d'azote (Isoi and Yoshida, 1991). Ce phénomène principalement dû à la forte promiscuité de nodulation du haricot, puisqu'il est nodulé par différents symbiovars de rhizobium indigènes qui sont parfois inefficaces en termes de fixation d'azote. De ce fait, la production du haricot est souvent basée sur une fertilisation azotée intense ce qui empêche les rhizobia associés au haricot d'exprimer au mieux leur potentiel de fixation symbiotique.

I.4 Facteurs limitants de la symbiose rhizobium-légumineuses

I.4.1 Les facteurs nutritionnels : le cas du phosphore

Le phosphore (P) est, avec l'azote et le potassium, l'un des trois nutriments indispensables à la croissance des végétaux, c'est un macronutriment indispensable à la croissance et au développement des plantes mais aussi un élément nutritif limitant cette croissance en cas de carence. Il joue un rôle essentiel dans le transfert d'énergie nécessaire à la croissance et l'amélioration de la productivité des végétaux. Le P permet la formation correcte des graines (des quantités importantes de phosphore sont stockées dans les semences sous forme de phytine) et accélère leur maturation. De même il stimule la croissance des racines et améliore la fixation d' N_2 chez les légumineuses.

I.4.1.1 Le phosphore dans le sol

Le P est concentré dans la partie superficielle du sol, sous deux formes principales : minérale ou organique. Le P minéral provient de l'altération des roches, tandis que le P organique résulte de la dégradation des végétaux par la faune et la flore du sol. Il est estimé qu'un sol agricole contient une à trois tonnes de P par hectare dans les 20 premiers centimètres de son profil, cette quantité dépasse largement les besoins annuels d'une culture qui sont de l'ordre de quelques dizaines de kg par hectare (Frossard *et al.*, 2000). Cependant, Plus de 90% du P total est sous forme insoluble et seuls quelques kg sont présents dans la solution du sol sous une forme

instantanément disponible pour la culture (Mengel and Kirkby, 2001). Ainsi, le P est l'un des 6 macronutriments (N, P, K, Ca, Mg et S) les plus inaccessibles à la plante. Certaines formes du P peuvent se retrouver très rapidement dans la solution du sol, alors que d'autres ne vont migrer que très lentement de la phase solide vers la solution du sol et que d'autres ne pourront être libérés que suite à l'activité d'organismes vivants (minéralisation, solubilisation).

I.4.1.2 La biodisponibilité du phosphore

On entend par la biodisponibilité du P, la fraction ou la quantité totale de phosphate dans le sol susceptible d'aboutir dans la solution du sol sous forme d'ions orthophosphates pendant une période équivalente à la durée de croissance de la culture (Frossard *et al.*, 2000). La quantité de P réellement disponible pour la végétation est encore difficile à évaluer compte tenu du nombre possible de mécanismes physico-chimiques et biologiques mises en jeu, de leurs interactions, de la variabilité de leur contribution en fonction de l'échelle et des conditions d'étude et des types de sol (Figure I- 3).

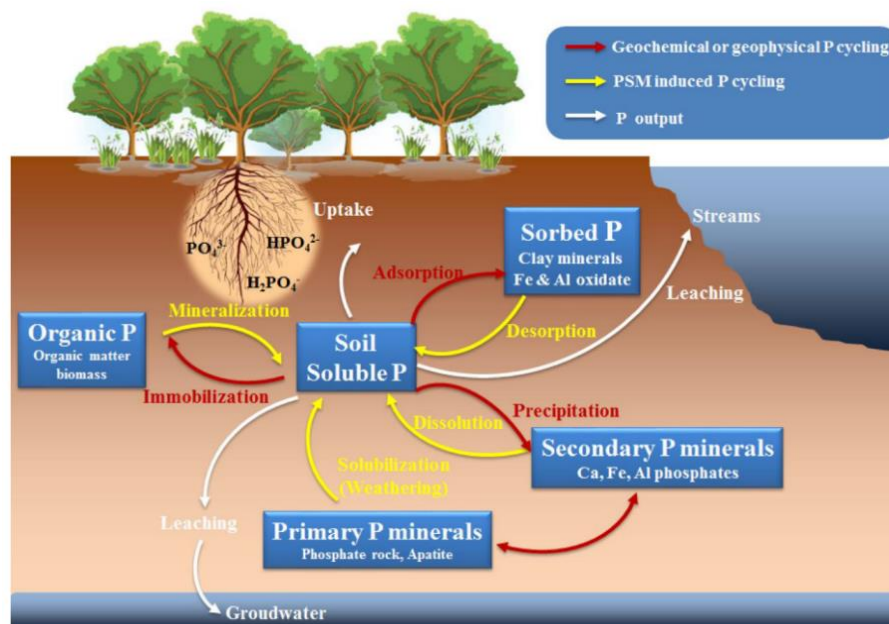


Figure I-3: Présentation schématique du cycle du phosphore montrant la répartition du stock total de P du sol entre les différents pools de P (Tian *et al.*, 2021).

Les plantes absorbent le P soit sous forme d'ions monovalents H_2PO_4^- et bivalents $(\text{HPO}_4)_2^-$ (noté Pi) à partir de la solution du sol (Hansen *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2002). Ce P est soit disponible dans la solution du sol avec des concentrations très faibles en ions orthophosphates libres (de 0.1 à 10 μM), soit sous des formes de P qui vont pouvoir alimenter rapidement le pool de Pi de la solution du sol (Hinsinger, 2001). Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans la biodisponibilité du P dans le sol, à savoir le pH, l'excrétion de composés organiques par les

racines, les micro-organismes et la composition du sol. De ce fait, la biodisponibilité du phosphate dans le sol peut ainsi varier considérablement d'une espèce végétale à l'autre selon plusieurs facteurs.

I.4.1.3 Le déficit en phosphore dans le sol

La déficience en P est l'une des plus grandes contraintes environnementales hébergées dans les sols et nuisent au développement de l'agriculture. Cette contrainte abiotique constitue, à l'échelle mondiale, un handicap pour le développement et l'amélioration des rendements des légumineuses en général et de *P. vulgaris* en particulier (Thung, 1990). Les phosphates sont pour la plupart localisés sur la phase solide du sol où ils sont associés à des cations, à des oxydes et hydroxydes métalliques, aux argiles, au carbone, ou à l'intérieur d'organismes morts ou vivants (Camara *et al.*, 1987). La conséquence majeure de cette capacité du sol à fixer le P, est que cet élément devient moins disponible aux plantes et ainsi sa faible biodisponibilité et sa faible diffusion dans la majorité des sols cultivés (Schachtman *et al.*, 1998). Une déficience en P chez les légumineuses n'affecte pas seulement l'établissement de la culture et sa croissance mais elle peut aussi affecter la nodulation et la fixation biologique de l'azote (Hogh-Jensen *et al.*, 2002; Olivera *et al.*, 2007) ainsi que la croissance racinaire et aérienne des plantes (Li *et al.*, 2009). Par conséquent, la déficience en cet élément peut provoquer des pertes en rendement pouvant atteindre des valeurs allant jusqu'à 15% (Shenoy and Kalagudi, 2005).

I.5 Principaux facteurs physico-chimiques limitant la symbiose rhizobium-légumineuses

Les principaux facteurs limitant l'activité biologique dans les sols sont le déficit hydrique, la salinité, les températures élevées, les pH extrêmes et les carences en éléments nutritionnels. Les interactions fréquentes entre ces différentes contraintes affectent la croissance des plantes et des microorganismes. La salinité et la variabilité du pH du sol sont des facteurs écologiques qui limitent les potentialités des symbioses *Rhizobium*-légumineuses. Ces facteurs peuvent agir à différents niveaux et réduire le taux de croissance ainsi que la capacité de survie des rhizobia. Ils peuvent aussi interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité fixatrice d'azote après établissement de la symbiose.

I.5.1 La salinité

1.5.1.1 Définition

La salinité des sols constitue l'un des principaux stress abiotiques limitant la croissance des plantes cultivées au monde. La salinité des sols et celles des eaux d'irrigation désigne la surcharge de ces derniers en sels minéraux solubles (Nichols and Williams, 2009).

1.5.1.2 Effet du stress salin sur la croissance des plantes

La conséquence générale de la présence de sels dans les sols est une limitation de la croissance des plantes provoquant ainsi une baisse de rendement. Les plantes deviennent plus vulnérables en milieu salin ou lors d'un déséquilibre ionique, une forte salinité peut affecter négativement les paramètres de croissance des plantes à savoir : la germination des graines (Singh *et al.*, 2012), le nombre des feuilles et des fleurs (Alam *et al.*, 2014), le poids sec aérien et racinaire des plantes et même la teneur en chlorophylle et en protéines (Abdul Qados, 2011).

1.5.1.3 Effet du stress salin sur la croissance bactérienne

Les concentrations élevées en sel affectent les microorganismes via deux mécanismes: effet osmotique et effets spécifiques ioniques. Les sels augmentent le potentiel osmotique de l'eau du sol tirant ainsi l'eau des cellules bactériennes causant leur mort par plasmolyse. Cette pression osmotique rend difficile le prélèvement d'eau à partir du sol aussi bien par les microorganismes que par les plantes (Oren, 1999). Les microorganismes peuvent s'adapter au faible potentiel osmotique en accumulant des osmolytes, mais la synthèse de ces derniers nécessite de grandes quantités d'énergie ce qui entraîne une croissance et une activité réduites (Yan *et al.*, 2015). Le stress salin peut affecter le processus d'infection bactérienne (en diminuant le nombre et la déformation des poils racinaires), la croissance et le fonctionnement du nodule (en limitant l'approvisionnement en nutriments par des produits de photosynthèse) en réduisant le métabolisme nodulaire, le contenu en leghémoglobine, la diffusion de l'azote atmosphérique et la respiration nodulaire (Swaraj and Bishnoi, 1999).

1.5.1.4 Effet du stress salin sur la symbiose

Le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-rhizobia indirectement, en réduisant la croissance de la plante hôte en affectant certains de ses processus physiologiques, ou bien directement en inhibant le processus d'infection et le développement des nodules. En effet, la salinité affecte la multiplication et la survie du rhizobia dans le sol et la rhizosphère, inhibe le processus d'établissement de l'infection rhizobienne, entraînant une diminution du nombre de

nodules, réduit leur contenu en léghémoglobine, diminue l'activité de la nitrogénase, altère la diffusion intranodulaire de l'oxygène et modifie le statut ionique (Swaraj and Bishnoi, 1999). Toutefois, la diminution des photosynthétats fournis pour les nodules et la réduction des substrats fournis pour la respiration des bactéroïdes constituent la principale limitation de la fixation symbiotique de l'azote sous contrainte saline (Ferri *et al.*, 2000; Garg and Singla, 2004). L'utilisation des microorganismes spécifiques peut stimuler davantage la croissance des plantes dans les écosystèmes touchés par la salinisation et peut conduire à une amélioration de la fertilité des sols salins par une bonne colonisation de la rhizosphère (Orhan, 2016).

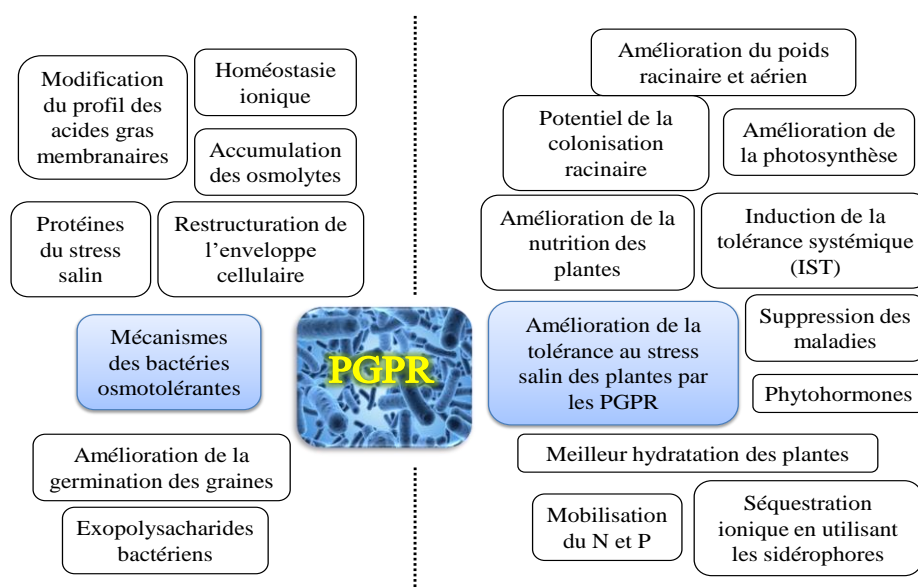


Figure I-4: Mécanismes de contribution des PGPR à l'atténuation du stress salin favorisant la croissance des plantes (Paul and Lade, 2014).

I.5.2 Le pH

Le pH du sol joue un rôle prépondérant aussi bien dans la survie des rhizobactéries, que dans la croissance de leurs plantes hôtes. L'effet néfaste de la variabilité des pH du sol sur la production agricole dans de nombreuses régions du monde est un problème déjà connu depuis de nombreuses années. L'extrême alcalinité et/ou acidité peut limiter la productivité des légumineuses ainsi que le fonctionnement du microsymbionte.

I.5.2.1 Effet du pH sur la croissance des légumineuses

La plupart des plantes légumineuses nécessitent un sol neutre pour leur croissance (Bordeleau and Prévost, 1994), en particulier lorsqu'elles dépendent de la fixation symbiotique d' N_2 .

L'acidité du sol provoque des troubles de la nutrition minérale chez les plantes, elle entraîne des carences en calcium, en potassium, en magnésium, en phosphore et en azote. Quant au pH alcalin du sol, il agit négativement sur la disponibilité de certains minéraux aux plantes tels que le fer et le manganèse (Bordeleau and Prévost, 1994).

I.5.2.2 Effet du pH sur la croissance bactérienne

Le pH du sol a une grande influence sur la survie et la multiplication des rhizobia, ils présentent des réponses variées face aux variations du pH. Le pH optimal pour les diverses phases de la croissance des rhizobiums peut varier mais il est généralement compris entre 6.5 et 7.5. Néanmoins, de nombreuses exceptions des rhizobia tolérant des pH extrêmes ont été indiquées dans plusieurs études (Lei *et al.*, 2011; Shamseldin and Werner, 2005). L'acidité est généralement plus néfaste que ne l'est l'alcalinité. Face à l'acidité, les souches de *Rhizobium* varient largement dans leur tolérance. Ils présentent différents mécanismes de tolérance à savoir : la synthèse de l'enzyme glutathione (Muglia *et al.*, 2007), l'accumulation de teneurs élevées en phosphore et en potassium (Watkin *et al.*, 2003) ainsi que la régulation des gènes spécifiques impliqués dans le fonctionnement de différentes cellules (Hellweg *et al.*, 2009).

I.5.2.3 Effet du pH sur la symbiose légumineuse-*Rhizobium*

Les pH extrêmes affectent les deux partenaires symbiotiques en limitant la persistance des souches de *Rhizobium* dans le sol ainsi que la nodulation et par conséquent la fixation symbiotique de l'azote (Yang *et al.*, 2001). Les pH alcalins et acides du sol agissent négativement sur la disponibilité des minéraux indispensables autant pour le *Rhizobium* que pour la plante hôte tel que le fer, le manganèse, l'aluminium et le phosphore (Zheng, 2010). Ceci peut conduire à une inhibition de la croissance racinaire, une réduction considérable du nombre des nodosités et même l'ultrastructure nodulaire se trouve très affectée (Ferguson *et al.*, 2013).

I.6 Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

Certaines bactéries du sol, et particulièrement celles occupant la rhizosphère des plantes, sont capables d'influencer de manière bénéfique la croissance des plantes, sous forme de bactéries endophytiques ou à l'état libre dans le sol rhizosphérique et ceci à travers divers mécanismes. On peut distinguer les mécanismes directs qui facilitent l'acquisition des nutriments par les plantes (bactéries solubilisatrices du phosphate inorganique ou du potassium, production des phytohormones etc.) et les mécanismes indirects tels que leur pouvoir compétitif à l'égard des

autres communautés microbiennes, la production des sidérophores, la production de composés organiques volatils, l'induction d'une résistance systémique, la promotion de la symbiose bénéfique plante-microbe. Ces bactéries de rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Figure I- 5).

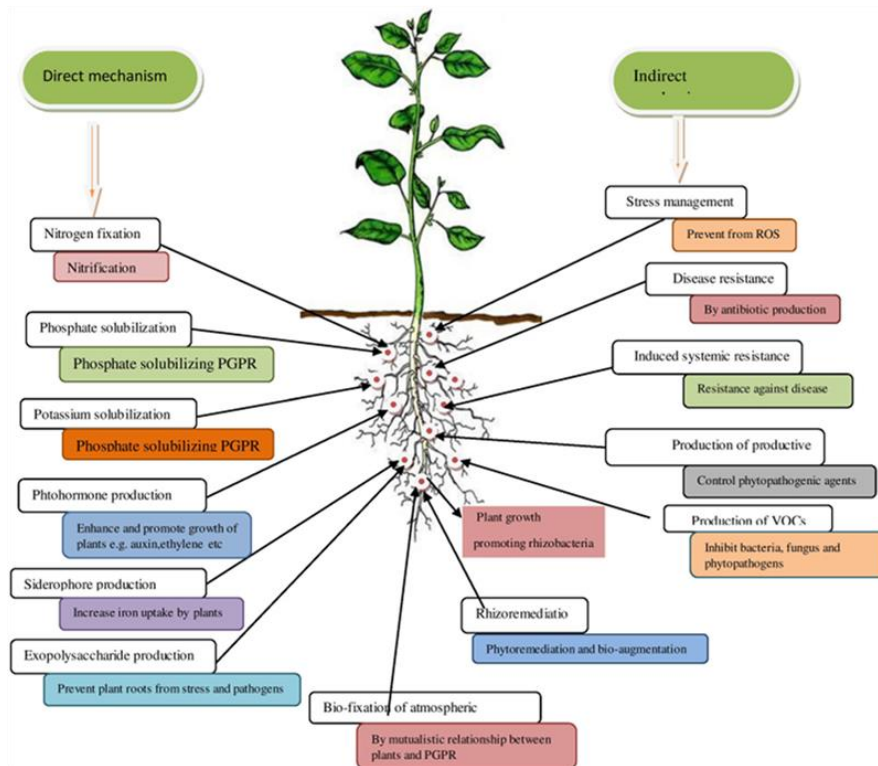


Figure I- 5: Modes d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (Chauhan *et al.*, 2022).

I.6.1 Principaux mécanismes d'action des PGPR

I.6.1.1 Fixation d'azote

Parmi les mécanismes les plus importants, on retrouve la fixation de l'azote atmosphérique (N_2). Les organismes fixateurs d'azote peuvent être classés en trois catégories : les fixateurs d'azote libres, les fixateurs d'azote associatifs et les fixateurs d'azote symbiotiques. Les deux derniers groupes se trouvent dans la rhizosphère des plantes légumineuses et non légumineuses. Les frankia et rhizobia sont les PGPR les plus importants qui, via la symbiose, ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique et le rendre disponible pour la plante. On observe aussi des bactéries dites « fixatrices libres de l'azote atmosphérique » qui enrichissent la rhizosphère en azote dans les agrosystèmes sans passer par la formation d'organes symbiotiques (Orr *et al.*, 2011). Les bactéries les plus fréquemment signalées pour leur fixation d' N_2 atmosphérique dans le sol appartiennent au genres *Rhizobium* sp., *Azoarcus* sp., *Beijerinckia* sp., ainsi que *Pantoea agglomerans* et *Klebsiella pneumoniae* (Chauhan *et al.*, 2022). Il a été démontré dans plusieurs

études que l'inoculation par des PGPR fixatrice d'azote peut améliorer la croissance et l'assimilation de l'azote conduisant à un meilleur rendement. A titre d'exemple, Bargaz *et al.* (2018) ont rapporté que l'inoculation des graines avec des bactéries fixatrices d'azote déclenche la croissance des plantes par la fixation d' N_2 , la solubilisation du phosphore et la production d'hormones favorisant la croissance des plantes.

I.6.1.2 Solubilisation bactérienne du phosphate

Même dans les sols riches la plupart du phosphate n'est pas disponible pour les plantes. De ce fait, un amendement en engrais phosphaté peut pallier l'insuffisance en cet élément et fournir tout le P requis par la plante. Cependant, il est communément admis que les tentatives d'amélioration par l'ajout d'engrais phosphatés sont économiquement et écologiquement défectueuses. Ainsi, plusieurs rapports suggèrent la capacité de différentes espèces microbiennes à solubiliser des composés de phosphate inorganique insoluble, tels que le phosphate tricalcique, le phosphate dicalcique, l'hydroxyapatite et le phosphate de roche (Khan *et al.*, 2009; Sashidhar and Podile, 2010). Ces bactéries permettent la disponibilité du P pour les plantes par minéralisation du phosphate organique du sol et par solubilisation des phosphates précipités (Toro, 2007; Wani *et al.*, 2007). Les solubilisations de différents types de phosphates insolubles varient selon le type de microorganismes, les conditions environnementales et les sources disponibles de carbone et de phosphate (Khan *et al.*, 2010; Richardson and Simpson, 2011; Zaidi *et al.*, 2009) (Figure I- 6). Parmi les différentes stratégies adoptées par ces bactéries, la sécrétion d'acides organiques de faible masse moléculaire est une théorie bien reconnue et largement acceptée comme principal moyen de solubilisation phosphate. Ces acides sécrétés augmentent la teneur en P disponible en diminuant l'adsorption des composés de phosphate dans le sol (Bolan *et al.*, 1990).

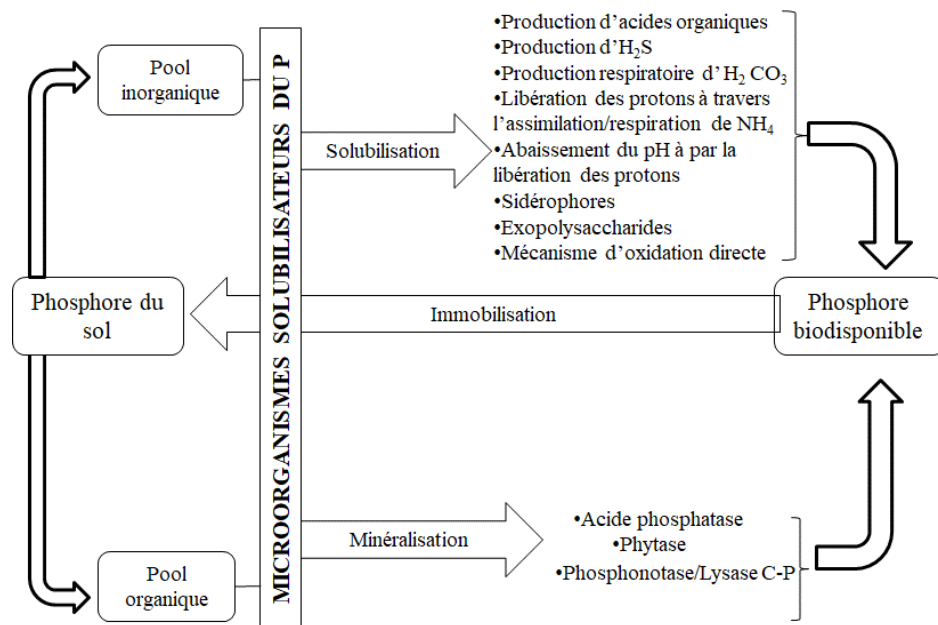


Figure I- 6: Représentation schématique des mécanismes de la solubilisation/minéralisation et immobilisation du phosphore (Sharma *et al.*, 2013).

I.6.1.3 Solubilisation du potassium (K)

Le potassium (K) est considéré comme un nutriment essentiel et un constituant majeur de toutes les cellules vivantes. Naturellement, les sols contiennent du K en plus grande quantité que tout autre élément nutritif. Cependant, la majeure partie du K est présente en forme non assimilable par les plantes. Ainsi, les bactéries solubilisatrices du potassium (BSK) peuvent assurer une meilleure disponibilité de cet élément en solubilisant les minéraux porteurs de K et convertir les formes insolubles en formes solubles et assimilables par les plantes. De nombreuses bactéries telles que *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Paenibacillus* spp., *Bacillus mucilaginosus*, *B. edaphicus* et *B. circulans* ont la capacité de solubiliser les minéraux porteurs de K (Meena *et al.*, 2016). Les BSK sont généralement présents dans tous les sols, bien que leur nombre, leur diversité et leur capacité de solubilisation du K varient en fonction du sol et des conditions climatiques. Les BSK peuvent dissoudre les minéraux silicatés et libérer du K par la production d'acides organiques et inorganiques, l'acidolyse, les polysaccharides, la complexolyse, la chélation et les réactions d'échange (Lodi *et al.*, 2022).

I.6.1.4 Production des sidérophores

Les sidérophores sont des métabolites secondaires d'un poids moléculaire faible et d'une très haute affinité aux ions ferriques dont le rôle est de solubiliser, chélater et d'extraire le fer (III) de nombreux complexes minéraux ou organiques et le rendre ainsi accessible aux plantes. Les sidérophores sont produits par les PGPR en réponse à des conditions de carence en fer

permettant ainsi aux plantes l'acquisition de quantités suffisantes en fer (Ahmed and Holmström, 2014). En plus de leur capacité à assurer une nutrition en fer des plantes, les bactéries produisant les sidérophores peuvent avoir des actions antagonistes contre les déléteurs et les champignons phytopathogènes en inhibant leur croissance par compétition et séquestration du fer libre (Sayyed *et al.*, 2013). Bien que les sidérophores soient généralement considérés comme présentant une spécificité élevée pour le fer, il a également été rapporté qu'ils se lient à divers ions métalliques et métalloïdes. Cette capacité unique permet aux sidérophores de solubiliser et de mobiliser les métaux lourds et les métalloïdes du sol, facilitant ainsi leur bioremédiation (Roskova *et al.*, 2022).

I.6.1.5 Production d'Auxine

Les phytohormones produites par les bactéries de la rhizosphère (ex : Auxines, Gibbérellines, Cytokinines) peuvent intervenir efficacement dans plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes telles que l'élongation, la division cellulaire et la différenciation tissulaire. En particulier, la production d'auxine semble être une propriété de la promotion de la croissance des plantes la plus répandue parmi les PGPR. L'Acide indole-3-acétique (AIA) fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogénèse, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes (Patten and Glick, 2002; Zhao, 2010). L'effet positif de l'inoculation par des bactéries productrices d'auxine sur le poids sec aérien et racinaire et aussi sur la nodulation des plantes est largement connu. Jusqu'à présent, Deux voies principales de la biosynthèse de l'IAA ont été proposées: dépendantes et indépendantes du Tryptophane (Trp) (Mano and Nemoto, 2012). Parmi toutes les voies de synthèse proposées, celle dépendante du Trp est la mieux étudiée et expliquée. Il a été clairement démontré que la biosynthèse d'auxine dépendante de Trp est essentielle pour l'embryogénèse, la croissance des graines, la floraison et d'autres processus de développement (Cheng *et al.*, 2006, 2007; Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008).

I.6.2.6 Production de l'ACC désaminase

Outre l'auxine, la production de l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase est sans doute l'une des caractéristiques bactériennes essentielles pour la stimulation de la croissance des plantes (Glick, 2012). En réponse à des contraintes comme la salinité, la sécheresse et la température, les PGPR produisant l'ACC désaminase stimulant la croissance des plantes par la régulation de la production massive d'éthylène qui est produit de

manière endogène par les plantes et agit comme molécule secondaire de signal dans l'induction des défenses de la plante (Glick, 2012; Van de Poel and Van Der Straeten, 2014).

I.7 L'inoculation bactérienne comme moyen d'allègement des stress nutritionnels et abiotiques affectant la symbiose rhizobium-légumineuses

I.7.1 Inoculation par les rhizobia

L'utilisation des rhizobia autant qu'inoculum bactérien constitue une approche écologique très prometteuse. L'inoculation par des rhizobia permet d'améliorer la croissance et le rendement des plantes en conditions de déficit nutritionnel et salines élevées et induire également une tolérance au stress de déficit hydrique (El-Akhal *et al.*, 2013; Ullah *et al.*, 2017). Les rhizobia ont été également utilisés pour favoriser la croissance des plantes dans des sols contaminés par des métaux lourds. Notamment, Duan *et al.*, (2022) ont montré que la symbiose *Rhizobium*-Alfalfa a atténué l'inhibition de la croissance induite par le Cu en augmentant la teneur en chlorophylle, la hauteur et la biomasse des plantes, en plus des teneurs en azote et en phosphore. De plus, Chen *et al.* (2018) ont rapporté que la symbiose plante-*Rhizobium* peut favoriser la croissance des plantes et réguler l'activité enzymatique antioxydante. Par conséquent, l'utilisation des rhizobia comme inoculum constitue une approche possible pour surmonter les effets délétères de l'environnement sur la croissance végétale.

I.7.2 Effet de l'inoculation avec les PGPR

Actuellement, les approches biotechnologiques respectueuses de l'environnement offrent plusieurs alternatives à l'application d'engrais et des produits chimiques pour l'amélioration de la productivité et pour la lutte chimique contre les maladies et les ravageurs des plantes. Parmi ces alternatives, le développement des inoculants de bactéries rhizosphériques stimulatrices de la croissance des plantes (PGPR) est l'exemple le mieux connu et étudié. En effet, les PGPR peuvent améliorer l'acquisition de l'eau et des nutriments minéraux par la plante, suite aux effets de stimulation bactérienne du développement du système racinaire. Cet effet se matérialise par une augmentation du nombre et/ou de la longueur des racines, avec une élongation des poils racinaires suite à l'inoculation (Vacheron *et al.*, 2013). Ces bactéries peuvent aussi améliorer la réponse des plantes inoculées aux facteurs de stress externes tels que les stress salin et hydrique (Mellidou and Karamanoli, 2022). Il a été également démontré que les PGPR peuvent réduire les effets toxiques du métal vis-à-vis de la plante par une amélioration de biomasse végétale dans des sols contaminés par les métaux lourds (He *et al.*, 2020). Les PGPR peuvent également être exploités comme biopesticide efficace pour un système agricole

durable. En effet, elles peuvent inhiber la croissance de plusieurs phytopathogènes via différents mécanismes comme la compétition pour l'espace et les nutriments, production des bactériocines, des enzymes lytiques, des antibiotiques ou des sidérophores (Beneduzi *et al.*, 2012).

I.7.3 Co-inoculation des légumineuses avec les rhizobia et les PGPR

Une des symbioses les plus étudiées à l'heure actuelle est l'association entre les bactéries symbiotiques, fixatrices d'azote (*Rhizobium*) et les légumineuses qui a pour principale objectif l'amélioration de la croissance des plantes en réduisant ou minimisant les apports d'engrais azotés. Cependant, cet effet favorable peut être amélioré par la présence de bactéries phytostimulatrices (PGPR). A cet effet, plusieurs chercheurs s'intéressent à l'étude de l'effet combiné des bactéries fixatrices d'azote et des PGPR sur la croissance et le développement des plantes. Plusieurs expérimentations conduites sur différentes espèces indiquent que cette double inoculation se montre plus efficace qu'une simple inoculation. En ce sens, Korir *et al.* (2017) ont rapporté que la co-inoculation du haricot vert (*P. vulgaris* L.) avec la PGPR *Bacillus megaterium* associée au *Rhizobium* a amélioré la croissance de la plante de 34% par rapport à l'inoculation avec le *Rhizobium* seul. Une autre étude a démontré que la double inoculation par des rhizobia et des souches PGPR *Enterobacter cloacae* et *Pseudomonas* sp. pourrait aider à atténuer le stress du cuivre dans des conditions hydroponiques (Fatnassi *et al.*, 2015). De plus, les PGPR peuvent affecter positivement la performance symbiotique des rhizobia en améliorant la nodulation, la fixation symbiotique d'azote et l'acquisition des nutriments (Tu *et al.*, 2021). Ainsi, la double inoculation rhizobium-PGPR peut s'avérer importante pour l'amélioration de la productivité agricole et présente donc un grand intérêt économique vue qu'un grand nombre de ces plantes sont cultivées à des fins alimentaires.

***Chapitre II : Isolement et caractérisation des
isolats des nodules du haricot***

II.1 Introduction

Le haricot vert, à l'image des autres légumineuses, est capable d'établir des symbioses fixatrices d'azote avec des bactéries du sol du type *Rhizobium*. D'autant plus, il peut s'associer avec des groupes bactériens génétiquement hétérogènes d'origines différentes (García-Fraile *et al.*, 2010; Mostasso *et al.*, 2002). Cependant, ces relations symbiotiques sont souvent moins ou non efficaces (Michiels *et al.*, 1998). Le haricot est également caractérisé par une faible efficacité de fixation d'azote en comparaison avec d'autres légumineuses (Farid and Navabi, 2015; Hardarson, 1993). Cette faible efficacité de fixation d'azote qui caractérise le haricot est attribuée principalement à sa nodulation promiscueuse (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2000). En effet, le haricot vert peut être nodulé par différents symbiovars de rhizobium indigènes et inefficaces. Par conséquent, la production du haricot repose principalement sur une fertilisation azotée intensive qui empêche en retour l'expression optimale de la nodulation et de son potentiel symbiotique.

Le criblage de souches rhizobiennes efficaces et compatibles avec les cultivars du haricot vert, reste alors le moyen le plus efficace pour réussir l'inoculation et accroître la contribution de la fixation symbiotique d'azote et la nutrition azotée de cette légumineuse. Outre leur potentiel de fixation symbiotique d'azote, certaines souches de *Rhizobium* sont capables de promouvoir la croissance des plantes par d'autres mécanismes notamment l'amélioration de la nutrition minérale par la solubilisation du phosphate (Singh *et al.*, 2014), la modulation des niveaux d'hormones végétales par la production de phytohormones telles que les auxines (Zahir *et al.*, 2010), l'augmentation de l'absorption de fer par la libération de sidérophores capables de chélater le fer avec une très haute affinité (Neilands, 1995) ou d'atténuer différents stress des plantes telles que la salinité, l'acidité ou l'alcalinité (Habib *et al.*, 2016; Inagaki *et al.*, 2015). Ainsi, pour une inoculation réussie, de nombreux rapports indiquent que la meilleure approche serait d'isoler des souches symbiotiques natives et efficaces à partir des sites locaux de la production du haricot vert (Hungria *et al.*, 2003; Mostasso *et al.*, 2002).

Dans le but de sélectionner des inoculants efficaces pour le haricot vert, ce travail a été conçu pour isoler et caractériser des souches rhizobiennes natives du haricot vert présentant différents traits PGP et capables de tolérer certains types de stress. La première partie a concerné la caractérisation *in-vitro* de toutes les souches isolées à partir des nodules du haricot vert prélevés de différents sites de production suivie d'une évaluation du potentiel symbiotique des souches les plus performantes sous conditions contrôlées.

II.2 Matériel et méthodes

II.2.1 Collecte des plantes du haricot et isolement des bactéries symbiotiques

Pour constituer la collection de rhizobia nodulant le haricot vert (*Phaseolus vulgaris* L.), des collectes de plantes ont été menées pendant différentes campagnes de production. Les prospections ont couvert les zones de production les plus importantes du haricot vert au Maroc: la région de Rabat Salé Zemmour Zaer (13 sites), la plaine du Gharb (18 sites), la région de Tadla Azilal (13 sites) et la région de l'Oriental (18 sites). L'ensemble des sites de collecte des plantes du haricot figure dans la figure II-1.

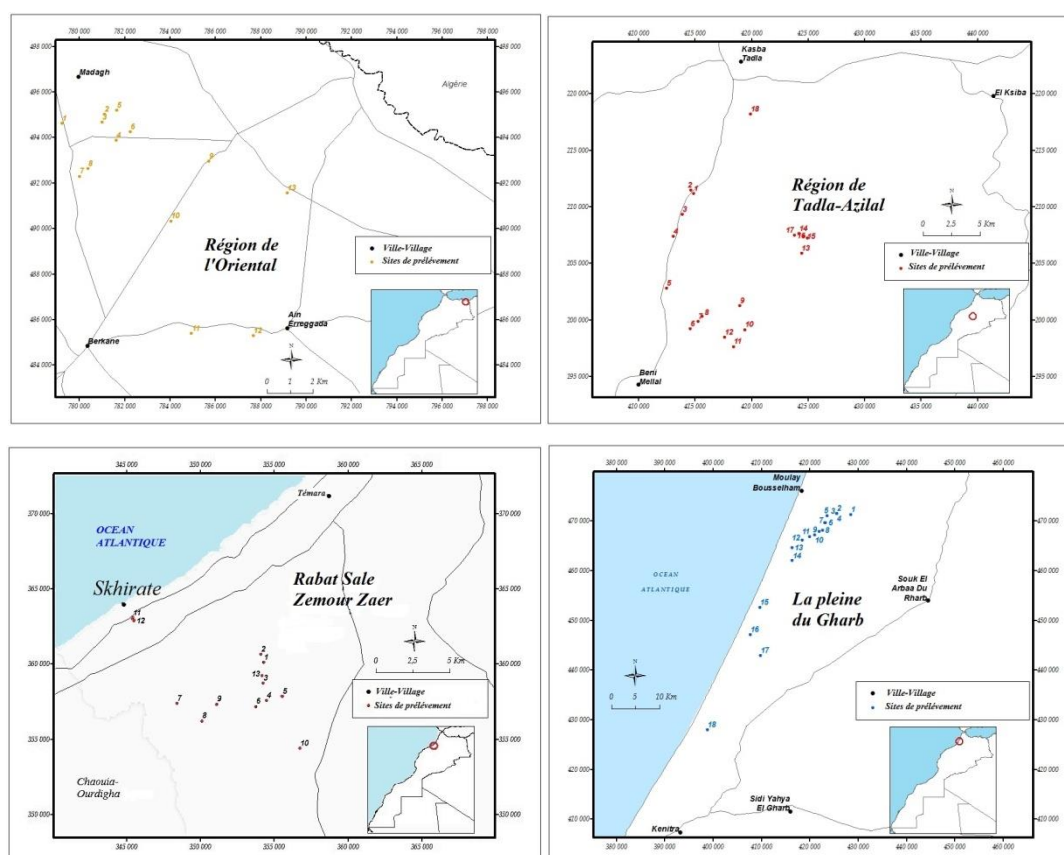


Figure II- 111 : Positions géographiques des zones de prospection

II.2.2 Collecte des nodules

Les plantes du haricot ont été collectées en début de la phase de floraison. La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par Somasegaran and Hoben (2012) et Vincent (1970). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm en profondeur pour extraire la plante avec son appareil racinaire entier. Au laboratoire, les racines des plantes ont été lavées

délicatement à l'eau de robinet pour les débarrasser des grains de terre et d'autres déchets sans endommager les nodules qui sont par la suite prélevés et stérilisés.

II.2.3 Désinfection des nodules

La désinfection des nodules a été faite selon la méthode décrite par Vincent (1970). Les nodules sont prélevés au niveau des racines et trempés dans l'éthanol absolu à 90% pendant 5 min puis transférés dans une solution de Chlorure de Mercure (HgCl_2) acidifié à 0.1% (p/v) pendant 10 secondes ensuite ils sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile.

II.2.4 Isolement bactérien à partir des nodules

Les nodules désinfectés sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile et la partie de la zone centrale rouge indiquant la présence de la leghémoglobine est prélevée à l'aide d'une anse et est étalée sur milieu Yeast Extract Mannitol (YEM) additionné de rouge Congo (Annexe 1). A partir du dépôt, des stries d'épuisement sont effectuées sur le milieu gélosé de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser. Les boîtes de Petri sont mises en incubation à 28°C pendant 48h.

II.2.5 Purification des isolats

Après 48h d'incubation, les colonies ayant peu absorbé le rouge Congo et d'aspect gommeux, translucide et de couleur rose clair, caractéristiques des souches de rhizobium, sont isolées et purifiées par repiquages successifs sur milieu YEM gélosé. Les isolats ainsi purifiés et nommés sont stockés à -80°C dans du Glycérol à 20% et une autre copie de chaque isolat a été conservée au réfrigérateur (4°C) en vue de leur caractérisation.

II.2.6 Caractérisation physiologique et criblage des isolats

Ce type de caractérisation est considéré comme une étape primordiale pour le criblage et l'étude des isolats nouvellement isolés et constituent la base de la description bactérienne. Ces descriptions font appel principalement aux caractéristiques physiologiques (la tolérance à certains facteurs de l'environnement telle que la salinité) et symbiotiques (la capacité infective, effective et compétitive) des bactéries en utilisant des techniques standardisées. Les critères retenus dans notre travail sont des critères physiologiques basés sur l'aptitude des souches à croître en présence de différents niveaux de certains types de sel à savoir NaCl , KCl et CaCl_2 et du pH. Aussi, la présence d'une activité phytobénéfique (la production d'auxine ou de sidérophores et la solubilisation du phosphate).

II.2.6.1 Préparation des cultures bactériennes

Pour la réalisation de toutes les manipulations, des pré-cultures bactériennes sont préparées à partir de colonies pures dans des tubes contenant le milieu YEM liquide stérile. Après incubation sous agitation à 28°C, les cultures en phase exponentielle ont été ajustées à une densité optique (OD_{600nm}) égale à 0.05.

II.2.6.2 Tolérance à la salinité

La tolérance à la salinité des isolats est déterminée par une estimation visuelle de leur croissance sur YEM solide renfermant des teneurs croissantes (0.17, 0.35, 0.51 et 0.64 M) en NaCl, KCl ou CaCl₂. Les différents types de sel ont été ajoutés séparément au milieu de culture avant autoclavage et les boîtes de Petri sont inoculées à partir des pré-cultures bactériennes fraîchement préparées à raison de trois répétitions. La croissance de chaque isolat est estimée après 24, 48 et 72h d'incubation à 28°C. La lecture des résultats consistait à noter la présence ou l'absence de croissance sur un milieu donné en comparaison à un témoin inoculé sur milieu YEM dépourvu de sel.

II.2.6.3 Tolérance au pH

L'évaluation de la croissance bactérienne à différents pH a été étudiée sur milieu YEM. Le milieu de culture est ajusté à différentes valeurs de pH : 4-5-7-8 et 9. Les pH acides (4 et 5) ont été ajustés par l'ajout du tampon HOMOPIPES (Homopiperazine-N,N'-bis (acide éthanosulfonique), alors que le tampon TAPS (N-Tris (hydroxyméthyl) méthyl-3- acide aminopropane sulfonique, SIGMA Aldrich) a été utilisé pour obtenir les pH alcalins (8 et 9). Les deux tampons ont été ajoutés à une concentration de 25 mM. Dans le cas des pH acides, le milieu est autoclavé séparément de la solution tampon afin d'éviter l'hydrolyse de l'agar.

II.2.7 Evaluation des activités PGPR

L'objectif principal de cette partie est de déterminer *in-vitro* si les bactéries isolées possèdent la capacité de production de métabolites susceptibles d'améliorer la croissance des plantes. Ce screening permettra par la suite le choix des souches les plus performantes à tester avec la plante. Différentes activités PGP sont testées : celles ayant un rôle de biofertilisation comme la solubilisation du phosphate, la fixation d'azote ou la production de NH₃, celles considérées comme biostimulatrices telle que la production de phytohormones (principalement l'AIA) et enfin celles impliquées dans le biocontrôle des phytopathogènes comme la production des sidérophores, qui joue également un rôle majeur dans l'acquisition du fer. Par ailleurs, nous

avons mesuré l'activité de l'ACC désaminase, qui joue un rôle majeur de la tolérance des plantes aux conditions stressantes.

II.2.7.1 Solubilisation du phosphate

Le potentiel des bactéries isolées à solubiliser le phosphate inorganique a été évalué sur milieu liquide. Les pré-cultures sont préparées dans le milieu YEM liquide dans les mêmes conditions décrites précédemment et sont utilisées pour ensemercer 100 mL du milieu Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948) contenant 0.05g de roche phosphatée broyée comme source de phosphate (Annexe 1). La densité optique à 600 nm initiale du mélange à l'instant T_0 est de 0.05. Après incubation des cultures bactériennes, la quantité de phosphate libre en ppm est déterminée par la méthode colorimétrique utilisant le réactif Vanadate- molybdate (Tandon *et al.*, 1968) à partir d'une courbe étalon standard qui représente la DO à 405 nm en fonction de concentrations connues de phosphate soluble (KH_2PO_4). Un premier criblage pour repérer les isolats capables de solubiliser le phosphate inorganique a été fait après 48h d'incubation des cultures bactériennes, avec mesure du pH du milieu et du phosphate libéré. Dans un deuxième temps, la cinétique de solubilisation du phosphate par des isolats sélectionnés a été déterminée en opérant des prélèvements après 24, 32 et 48h d'incubation, avec la mesure du pH et de la quantité de phosphate libéré.

Pour le dosage du phosphate soluble, 2 mL de la culture sont centrifugés à 13 000 rpm pendant 14 min, ensuite le surnageant est transféré dans de nouveaux micro-tubes et stocké à $-20^{\circ}C$. Pour le dosage, on dépose dans les puits d'une plaque de microtitration 200 μL de chaque surnageant et 800 μL de réactif Vanadate- molybdate. Après incubation du mélange réactif-surnageant pendant 2h, la DO à 405 nm est mesurée.

II.2.7.2 Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

La production de l'AIA a été évaluée dans un premier temps qualitativement sur boîtes de Petri contenant le milieu YEM auquel est ajouté 0.5 mg /mL du tryptophane (Trp) afin de repérer les bactéries productrices de cette phytohormone. Un volume de 10 μL de chaque culture bactérienne est déposé à la surface du milieu YEM+Trp puis incubé à $28^{\circ}C$ pendant 24h. La présence d'AIA a été déterminée visuellement après incubation en déposant un filtre membranaire imbibé du réactif Salkowski (Ehmann, 1977) (Annexe 2). La production d'AIA est notée par le virage de la coloration jaune du filtre à une couleur rose foncé.

Après avoir repéré les isolats producteurs d'AIA sur milieu solide, une deuxième évaluation quantitative de leur potentiel à produire l'AIA a été réalisée. Le milieu de culture YEM+Trp liquide a été ensemencé par des pré-cultures fraîchement préparées de chaque souche (DO_{600nm} finale est de 0.05) et incubé à 28°C pendant 24h sous agitation. Des prélèvements sont réalisés après 24, 48 et 72h d'incubation. Les échantillons prélevés sont centrifugés à 13 000 tours/mn pendant 14 min et le surnageant est filtré à travers un filtre millipore 0.2 μm stérile pour s'assurer de l'absence de bactéries qui risqueraient de fausser la lecture de la DO. Pour le dosage, on mélange dans des cuves semi-micro (2.5 mL) 200 μL de surnageant et 800 μL du réactif de Salkowsky. Le mélange réactionnel est ensuite mis à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min avant de mesurer la DO à 540 nm. Les concentrations d'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe étalon construite à partir de différentes mesures de DO_{540nm} en fonction des concentrations croissantes d'AIA (de 0 à 125 $\mu g/mL$).

II.2.7.3 Production des sidérophores

La production des sidérophores a été déterminée tout d'abord qualitativement sur milieu solide suivi d'une évaluation semi quantitative sur milieu liquide. La détermination de la capacité de nos isolats à produire les sidérophores a été réalisée selon la méthode décrite par Schwyn et Neilands (1987). Le milieu utilisé est le milieu Modi (Mayuranki *et al.*, 1985) (Annexe 1) étant donné sa composition exempte de fer, il est préconisé pour mettre en évidence la production de sidérophores. Un volume de 10 μL de chaque culture bactérienne est déposé à la surface du milieu et les boîtes de Petri sont incubées à 28°C pendant 24h. Pour la mise en évidence de la présence de sidérophores dans le milieu ensemencé, la gélose au réactif Chrome Azurol-S (CAS) (Annexe 2) est coulée à la surface de la culture bactérienne. Après contact de quelques heures, le changement de la couleur bleu du réactif en orange qui est dû au transfert des ions ferriques du CAS vers les sidérophores apparaît autour de la colonie indiquant la présence de sidérophores dans le milieu.

Les isolats qui ont révélés une capacité à produire les sidérophores sur boîtes de Petri sont évalués sur milieu Modi liquide pour une estimation semi quantitative de la quantité produite des sidérophores. Le milieu est ensemencé par un volume précis des cultures bactériennes de façon à avoir une DO_{600nm} finale de 0.05 ensuite les tubes sont incubés à 28°C. Après 7 jours d'incubation, Les cultures sont centrifugées à 13 000 tours/mn pendant 14 min et leur pH est ajusté à 7. Pour la révélation, 1 mL de surnageant est mis dans un tube à hémolyse et mélangé avec 1 mL du réactif CAS. Après incubation à l'obscurité et à température ambiante la couleur

bleu vire vers le rouge-orangé selon le taux de production des sidérophores. La DO est mesurée par spectrophotométrie à 630 nm après 2h d'incubation. Le pourcentage de sidérophores est calculé selon la formule suivante $[(Ar - As) / A_r] \times 100 = \% \text{ unité de sidérophores}$ où, 'Ar' représente l'absorbance du témoin (Milieu Modi+CAS) et 'As' représente l'absorbance de l'échantillon (surnageant+CAS) (Machuca and Milagres, 2003). Ce calcul permet de comparer les différences de production entre les isolats bactériens.

II.2.7.4 Production d'ACC-désaminase

L'existence d'une activité ACC désaminase est déterminée par la capacité des isolats bactériens à utiliser l'ACC comme seule source d'azote. Les cultures bactériennes fraîchement préparées sont centrifugées puis le culot récupéré et lavé plusieurs fois à l'eau physiologique (0.9%). Les suspensions bactériennes sont ajustées à une même densité optique et sont inoculées dans des puits microplaque. Trois types de puits sontensemencés : l'ACC, le sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ (témoin positif) ou le sulfate de magnésium $(MgSO_4)7H_2O$ (témoin négatif). Le milieu minimum de DF (Dworkin and Foster, 1958) (Annexe 1) utilisé est réparti dans une microplaque à 96 puits à raison de 120 μ L par puits. Dans les 4 premiers puits de la microplaque on ajoute 12 μ L d'une solution de $MgSO_47H_2O$ (0.1 M), dans les 4 puits qui suivent 12 μ L de $(NH_4)_2SO_4$ (0.1 M) et en fin 12 μ L de la solution d'ACC (3.0 mM) dans les 4 derniers puits. La densité optique à 600 nm est mesurée à T_0 et après 7 jours d'incubation. La croissance bactérienne est comparée dans les trois milieux utilisés. L'activité ACC désaminase est considérée positive pour les souches ayant une DO supérieure à celle de la solution de $MgSO_47H_2O$ se traduisant par une utilisation de l'ACC comme source de carbone et d'azote.

II.2.7.5 Production d'ammoniac (NH_3)

Ce test qualitatif est réalisé selon la méthode de Cappuccino and Sherman (1992). Il consiste à inoculer des tubes contenant 5 mL d'eau peptonée (25.5 g/l) par les précultures bactériennes. Après incubation à 28°C pendant 48h, 250 μ L du réactif de Nessler (Annexe 2) sont ajoutés dans chaque tube. Le développement d'une couleur jaune indique la production de petites quantités de NH_3 produit ou d'orange à marron indiquant un maximum de production.

II.2.8 Evaluation de l'efficience symbiotique des isolats de la collection

II.2.8.1 Préparation de culture bactérienne et semi

Dans cette expérience et dans toutes les expérimentations d'inoculation réalisées sous serre, nous avons choisi la variété «*Tania*». Cette variété est l'une des variétés du haricot filet fin

dominantes du marché marocain et conseillée pour l'exportation. Les récoltes peuvent s'étaler jusqu'à 70 à 90 jours après les semis offrant ainsi un bon rendement d'où l'importance de cette variété pour les agriculteurs. Les semences nous ont été fournies par l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).

Les graines du haricot ont été désinfectées superficiellement par l'alcool à 90% tout en agitant manuellement pendant 10 min puis transférées dans une solution de chlorure de mercure à 0.2% (HgCl_2) pendant 10 secondes. A la fin, les graines sont rincées 5 à 7 fois à l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace de chlorure de mercure. Ces graines sont ensuite mises à pré-germer sur un milieu semi-gélosé (0.7% d'agar) dans des boîtes de Petri et placées dans un incubateur à l'obscurité à 28°C pendant 48h. Les graines pré-germées sont semées dans des pots de 17 cm de diamètre et 15 cm de hauteur contenant de la perlite autoclavée (à raison de six graines par pot). Après quelques jours de semis, le nombre de plantes a été réduit à 4 plantules par pot.

II.2.8.2 Inoculation et conduite de l'essai

Les isolats sélectionnés pour tester leur infectivité et leur efficacité ont été cultivés séparément dans du milieu YEM liquide dans les mêmes conditions d'incubation citées précédemment. La suspension bactérienne qui servira d'inoculum est récupérée en phase exponentielle de croissance. Chaque graine est inoculée avec un volume précis de la suspension pour obtenir une concentration d'environ 10^9 UFC /graine. L'inoculation est faite par application directe de la suspension bactérienne sur les graines pré-germées aseptiquement lors du semis. Les plantes ont été arrosées par une solution nutritive proposée par Broughton et Dilworth (1971) (Annexe 3). L'essai a été réalisé selon le dispositif Bloc Aléatoire Complet (BAC) et a été conduit durant les périodes de culture du haricot vert (Avril et Septembre) dans des conditions contrôlées : une température de 28/19°C (jour/nuit) et une humidité relative de 55/75%. Le témoin azoté est constitué de plantes non inoculées mais arrosées avec de la solution nutritive additionnée de KNO_3 à 0.05% comme source d'azote. Après 40 jours de croissance, les parties aériennes, racinaires et les nodules des plantes ont été séparés et les biomasses sèches ont été déterminées après séchage à 60°C pendant 48 heures.

II.2.9 Identification moléculaire des souches nodulant le haricot vert

Après avoir testé l'infectivité des isolats issus des nodosités prélevées sur *P. vulgaris*, seuls les isolats qui ont réussi à former des nodules sur leur plante hôte ont été retenus pour une identification moléculaire suite au séquençage du gène ribosomal ADNr 16S.

II.2.9.1 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique a été conduite selon la méthode phénol/chloroforme décrite par Chen and Kuo (1993). Cette méthode est adaptée aux bactéries Gram négatif, notamment celles qui produisent des exopolysaccharides.

A partir d'une culture bactérienne pure, quelques colonies sont prélevées à l'anse et ensemencées dans un tube à essai contenant du milieu TY liquide (Annexe 1), puis incubées jusqu'à la phase de croissance exponentielle. Un volume de 2 mL de chaque préculture est transféré dans un tube Eppendorf et soumis à centrifugation à 12 000 rpm pendant 3 minutes à température ambiante. Le surnageant est éliminé en gardant le culot bactérien auquel 400 µL du tampon de lyse sont ajoutés (Annexe 4) et 100 µL de NaCl (5M) qui permet de précipiter les protéines. Le tout est homogénéisé au vortex puis incubé à 37°C pendant 30 min. Les étapes qui suivent l'incubation se déroulent comme suit :

- Sous une hotte chimique, ajouter un volume de phénol/chloroforme équivalent au volume du mélange puis agiter énergiquement jusqu'à ce que les phases se mélangent ensuite centrifuger 10 minutes à 13 000 rpm.
- Toujours sous hotte chimique, récupérer et transférer la phase supérieure dans un nouveau tube Eppendorf et y ajouter un volume égal de phénol/chloroforme. Agiter énergiquement puis centrifuger à 13 000 rpm pendant 10 nouvelles minutes.
- Récupérer la phase supérieure et y ajouter 900 µL d'Ethanol absolu (ice-cold) et 50 µL d'Acétate de Sodium (3 M), agiter doucement le tube par retournement jusqu'à l'apparition des filaments d'ADN puis incuber 30 minutes à -20°C pour une précipitation de l'ADN.
- Après incubation, centrifuger l'ensemble pendant 10 minutes à 12 000 rpm, éliminer le surnageant et rincer l'ADN formant le culot avec de l'éthanol à 70% puis centrifuger à nouveau à 12 000 rpm pendant 1 minute.
- Éliminer à nouveau le surnageant avec précaution et laisser sécher l'ADN génomique à température ambiante.
- Re-suspendre l'ADN dans 55 µL d'eau déionisée stérilisée, filtrée et traitée à l'UV. Le tube est ensuite gardé pendant une nuit à 4°C.

La quantité, la qualité et la pureté de l'ADN extrait est vérifiée par spectrophotométrie (NanoDropR ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc.) puis il est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation. Après extraction et dosage de l'ADN, si nécessaire une dilution est réalisée pour obtenir une concentration de 50 ng/mL qui est utilisé dans les amplifications

d'ADN. La préparation d'ADN ainsi obtenue peut être utilisée dans toutes les expériences préconisées pour la caractérisation moléculaire des rhizobia du haricot.

II.2.9.2 Amplification de l'ADN ribosomal 16S

L'ADNr 16S des isolats a été amplifié par un couple d'amorces spécifiques décrit par Herrera-Cervera *et al.* (1999), l'amorce forward41 F (5- GCTCAGATTGAACGCTGGCG -3') et reverse 1488 (5-CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC-3'). Ces amorces ont été utilisées à la fois pour la PCR et les réactions de séquençage. Le mélange réactionnel d'un volume final de 25 µL est présenté dans le Tableau II-1. L'amplification de l'ADN se déroule comme suit : après une première phase de dénaturation (5 mn à 94°C), 35 cycles comprenant chacun trois étapes de variation de température : Dénaturation de 45 s à 94°C, Hybridation de 1 mn à 55°C et une Extension de 2 mn à 72°C. A la fin du dernier cycle, une élongation finale de 7 mn à 72°C permet d'achever les synthèses de l'ADN en cours.

Tableau II- 1: Mélange réactionnel utilisé dans la PCR de l'ADNr 16S

Réactifs	Volume (µL)	Concentration finale
MyTaq Mix (Bioline)*	12.5	-
Amorce 41f (10 pmol/µL)	1	0.4 pmol
Amorce 1488r (10 pmol/µL)	1	0.4 pmol
H ₂ O déionisée stérile	9.5	-
ADN génomique	1	-

*MyTaq Mix (Bioline) contient la Taq polymérase, les dNTPs, le MgCl₂ et le tampon de réaction à des concentrations optimales pour la PCR.

L'amplification des fragments a été vérifiée par migration sur gel d'électrophorèse d'agarose 1%. La taille de la séquence d'ADN amplifiée a été évaluée sur gel grâce à un marqueur de poids moléculaire connu (Invitrogen). Après visualisation du gel, les amplifiats ont été séquencés par la société Genoscreen (Lille, France).

II.2.9.3 Analyse des séquences nucléotidiques, correction et alignement

Les séquences nucléotidiques ont été vérifiées et corrigées manuellement à l'aide de Chromas LITE (version 2.1), les alignements ont été recorrectés manuellement à l'aide de GeneDoc (version 2.7) (Nicholas *et al.*, 1997).

II.2.9.4 Analyse phylogénétique

L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode de Neighbour-joining method (NJ) en utilisant le logiciel MEGA version 7 (Saitou and Nei, 1987) suivant le modèle de Kimura 2-paramètres (Kimura, 1980). Le bootstrap de chaque nœud a été évaluée avec 1000 répliqués.

L'arbre phylogénétique comporte également des séquences de référence apparentées à nos isolats récupérées par BLASTN de la base de données GenBank. Les séquences obtenues sont déposées dans la base de données GenBank et les numéros d'accessions de chaque isolat sont indiqués sur l'arbre phylogénétique.

II.2.10 Analyses statistiques

A l'aide du programme statistique XL STAT, différentes analyses des données obtenues ont été effectuées afin de déterminer la significativité des effets et des différences observées. Une ANOVA (analyse de la variance) a été réalisée, les tests de comparaison multiple post hoc Tukey et LSD ont été utilisés pour comparer les moyennes de chaque expérience. La différence entre toutes les comparaisons faites est significative à 95% d'intervalle de confiance. Une transformation des données est faite si nécessaire.

Les coefficients de corrélation de Pearson ont été calculés pour établir les relations associatives entre les différents paramètres étudiés. Afin d'évaluer les différents paramètres de croissance observés lors des essais conduits, les données ont été analysés pour appréhender la significativité des différences intra et inter-traitements.

Pour étudier la relation entre les différents paramètres étudiés chez les isolats et leur origine de prélèvement, une Analyse Factorielle de Correspondance (AFC) a été réalisée en tant qu'analyse exploratrice des données (Benzecri, 1992). Cette analyse est une méthode qui permet de comparer les relations qui existent entre les individus et les variables en fonction d'un critère. Pour tester l'indépendance entre les variables, un test d'indépendance du Chi-carré de Pearson a été effectué. Les résultats sont présentés sous forme de valeur du khi-deux (χ^2), le degré de liberté du test (ddl) et la probabilité de commettre l'erreur alpha (P).

II.3 Résultats

II.3.1 Collecte des plantes et isolats bactériens

Au cours des prospections effectuées, une bonne nodulation des plantes du haricot vert dans la plaine de Gharb a été constatée suivi par la région de Tadla-Azilal où la nodulation était moins importante. Dans la région de l'Oriental et de Salé Zemour Zaer la nodulation était totalement absente chez la majorité des plantes sauf quelques exceptions avec un taux très faible de nodulation. De plus, les nodules présents étaient de petite taille et d'une couleur blanchâtre, signe d'une mauvaise capacité de fixation d'azote. La collecte des nodules a été faite

directement dans des champs de haricot au niveau de 31 sites répartis entre la région de Tadla-Azilal et la plaine du Gharb (Tableau II-2). Cette collecte a permis l'isolement de 133 isolats bactériens constituant le matériel biologique de base de la présente étude.

Tableau II-2: Sites de collecte

	Sites	Isolats	Localités	Latitude N	Longitude W
Pleine du Gharb	1	17	Delalha	34°50.538'	006°10.905'
	2	7	Ouled Mesbah	34°47.766'	006°17.456'
	3	7	Khennache	34°45.486'	006°18.842
	4	7	Ahmiri	34°50.683'	006°12.794'
	5	4	Merja Zerga	34°50.384'	006°14.143'
	6	20	Tifelt	33°49.681'	006°14.297'
	7	29	Lgnafda	34°49.650'	006°14.429'
	8	12	Zwaka	33°46.868'	006°36.834'
	9	10	Mghayten	34°48.092'	006°16.458'
Tadla-Azilal	10	4	Fem El Ansar	32°22.25.1'	006°16.00.6'
	11	6	Tagzirt	32°27.43.6'	006°12.04.4'
	12	10	EL Khamsa	32°23.36.0'	006°18.01.4'

II.3.2 Caractérisation physiologique et criblage des souches

II.3.2.1 Tolérance à la salinité

L'évaluation de la tolérance des souches au sel (NaCl, KCl et CaCl₂) a permis de mettre en évidence différents niveaux de tolérance au sel selon l'isolat et le type de sel appliqué. La limite de tolérance au sel est comprise entre 0.17 et 0.68 M pour KCl et NaCl et 0.51 M pour CaCl₂.

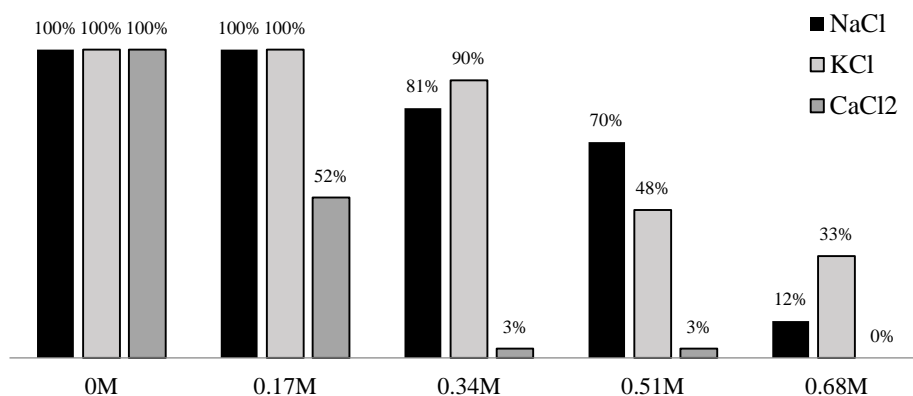


Figure II-2: Diagramme représentant le pourcentage d'isolats tolérants les différentes concentrations de NaCl, KCl et CaCl₂.

La totalité des isolats bactériens ont présenté une croissance statistiquement équivalente au témoin (0 M) à 0.17M de NaCl et KCl. De plus, une diminution graduelle du nombre d'isolats capables de croître est observée au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en sel. Toutefois, quelques isolats ont été capables de tolérer des concentrations extrêmes en NaCl et KCl (jusqu'à 0.68 M). Par ailleurs, KCl s'est avéré moins toxique que NaCl pour la croissance bactérienne. En effet, à 0.68 M de KCl, 33% des isolats ont pu croître alors que seulement 12% ont toléré cette concentration en NaCl. Cependant, CaCl₂ s'est avéré plus toxique car à 0.17 M seulement la moitié des isolats (52%) arrivent à se développer alors qu'au-delà de cette concentration seulement 3% ont pu croître tandis qu'aucune souche ne tolère 0.68 M (Figure II-2). Suite à ces résultats, il convient de retenir que des souches hautement tolérantes pouvant croître jusqu'à 0.68 M de sel ont été identifiées.

II.3.2.2 Tolérance au pH

Les isolats testés se développent sur une large gamme de pH allant de 4 à 9 avec un optimum de croissance à la neutralité (pH 7). La figure II-3 montre que l'alcalinité affecte moins la croissance bactérienne que l'acidité. A pH 9, seuls 19% des isolats étaient incapables de croître alors que 43% des isolats ont pu croître à pH 4.

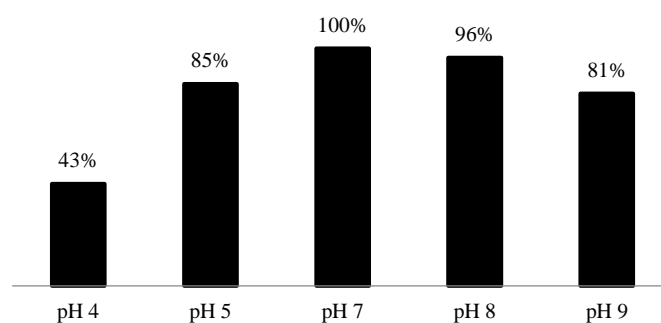


Figure II-3: Diagramme représentant le pourcentage d'isolats tolérants les pH appliqués.

II.3.2.3 Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

Sur milieu solide

Le test qualitatif sur milieu YEM solide additionné de Tryptophane a permis de mettre en évidence la production de cette phytohormone chez 55% des isolats testés. La révélation de cette production est traduite par le changement de la couleur du disque du filtre membranaire en rose suite à l'addition du réactif Salkowski. L'intensité de la coloration rose était plus ou moins vive selon les isolats testés.

Sur milieu liquide

La quantité d'AIA produite par chaque isolat sur milieu YEM+Trp a été déterminée en se référant à une courbe étalon obtenue à partir des concentrations connues d'AIA. Selon les résultats obtenus, les isolats testés ont montré une capacité variable de synthèse d'AIA qui oscille entre 3 et 78 µg/mL (Tableau II-3). Cependant, seulement 28% des isolats ont montré des degrés élevés de production allant de 30 à 78 µg/mL. Tandis que le restant des isolats a montré une production comprise entre 3 et 29 µg/mL.

Tableau II-3: Fréquence de la production d'AIA chez les isolats.

Sites de prélèvement	Nombre total d'isolats	Isolats capables de produire l'AIA	Intervalle de production (µg/mL)
Site 1	17	7	9 - 55
Site 2	7	3	17 - 49
Site 3	7	6	5 - 28
Site 4	7	5	5 - 70
Site 5	4	2	4 - 57
Site 6	20	12	3 - 73
Site 7	29	12	8 - 67
Site 8	12	8	3 - 27
Site 9	10	7	3 - 78
Site 10	4	3	8 - 26
Site 11	6	4	4 - 59
Site 12	10	5	8- 56

II.3.2.4 Solubilisation du Phosphate

La capacité de solubilisation des isolats a été déterminée par la mesure de la quantité du phosphate libéré par des cultures bactériennes en milieu PVK contenant de la roche phosphatée broyée. La quantité de phosphate solubilisé est déterminée à partir d'une courbe étalon à une DO_{450nm} en fonction de concentrations déterminées en phosphate soluble (K₂HPO₄)

Tableau II-4: Fréquence de solubilisation du phosphate naturel chez les isolats.

Sites de prélèvement	Nombre total d'isolats	Isolats capables de solubiliser le P inorganique	Intervalle de production (µg/mL)
Site 1	17	11	9 -16
Site 2	7	3	12 - 14
Site 3	7	4	9 - 13
Site 4	7	5	9 - 24
Site 5	4	1	8 - 11
Site 6	20	20	9 - 25
Site 7	29	24	9 - 28
Site 8	12	6	11 - 24
Site 9	10	9	9 - 18
Site 10	4	4	11 - 62
Site 11	6	4	9 - 20
Site 12	10	10	9- 51

Environ 66% des isolats testés ont été capables de solubiliser le phosphate inorganique mais à des taux de production très variables. Cette variation de solubilisation s'étend de 9 à 62 µg/mL, les isolats ayant une solubilisation inférieure à 9 µg/mL sont considérés comme non solubilisateurs. Seuls 13 isolats ont été capables de produire un taux supérieur ou égal à 20 µg/mL suivi par 48 isolats qui solubilisent modérément le phosphate avec des taux compris entre 12 et 19 µg/mL alors que le restant des isolats présentaient des taux de production situés entre 9 et 11 µg/mL (Tableau II-4).

II.3.2.5 Production des sidérophores

Le test qualitatif nous a permis d'identifier 77 isolats capables de produire des sidérophores. Suite aux résultats obtenus, une estimation semi-quantitative de la production des sidérophores produits a été faite sur milieu liquide. Ce test a montré des taux de production variant entre 7 et 89%, avec plus de 60 isolats ayant des taux supérieurs ou égal à 50%, tandis que les taux libérés par les autres isolats oscillent entre 11 et 48%. Par ailleurs, l'analyse statistique a montré que l'estimation de la production des sidérophores par les isolats est significativement variable ($P < 0.0001$) (Tableau II-5).

Tableau II-5: Fréquence de la production des sidérophores chez les isolats.

Sites de prélèvement	Nombre total d'isolats	Isolats capables de produire des sidérophores	Intervalle de production (%)
Site 1	17	8	16 - 76
Site 2	7	5	16 - 88
Site 3	7	5	46 - 85
Site 4	7	3	11 - 83
Site 5	4	4	53 - 88
Site 6	20	15	33 - 89
Site 7	29	21	31 - 88
Site 8	12	10	51 - 80
Site 9	10	6	26 - 78
Site 10	4	2	7 - 13
Site 11	6	3	15 - 34
Site 12	10	5	13 - 58

II.3.3 Analyse Factorielle de Correspondance (AFC)

Dans le but d'étudier les relations éventuelles entre les résultats des différents paramètres testés (activités PGP et tolérance aux stress salin et pH) et l'origine des souches, une AFC a été réalisée. Pour ce faire, les isolats ont été divisés en différents groupes selon leur performance dans chaque test (Tableau II-6).

Tableau II-6: Groupes des variables utilisés dans l'Analyse Factorielle de Correspondance

	Haut	Moyen	Faible	No
Production d'auxine (µg/mL)	21-78	11-20	2-9	0
Solubilisation du phosphate (µg/mL)	16-62	12-14	10-11	7-9
Production des siderophores (%)	62-89	39-59	7-34	0
Tolérance à NaCl (M)	0.51-0.64	0.34	0.17	-
Tolérance à KCl (M)	0.51-0.64	0.34	0.17	-
Tolérance à CaCl ₂ (M)	0.51-0.64	0.34	0.17	-
Tolérance au pH	4-9	4-7	7-9	7-8

*No : pas de production

La capacité des isolats à tolérer KCl ($\chi^2 = 33.366$; ddl = 16; $P < 0.05$) et NaCl ($\chi^2 = 32.262$; ddl = 16; $P < 0.05$) a été liée aux sites de prélèvement. Les isolats venant des sites Ahmiri et Dlalha se caractérisent par une forte tolérance à KCl (Figure II-4 a). Dans le cas de NaCl, les isolats venant de Zwaka, Merja Zerga et Ahmiri forment un groupe hautement tolérant à NaCl (Figure II-4b) alors que les isolats venant de ces mêmes régions sont distingués par une tolérance moyenne à KCl. Tandis que, les isolats de la région de Lgnafda sont particulièrement distingués par une faible tolérance aux deux types de sel. Il est à noter que, les analyses de sol des sites de prélèvement ont révélées que les valeurs de la conductivité électrique (CE) variaient entre 0.1 et 0.3 mS/cm. Cependant, les eaux d'irrigation de ces sites ont montré des niveaux différents de salinité exprimés en CE (dS/m) (Dlalha: 1.176; Ouled Mesbah: 0.92; Merja Zarka: 1.176; Lgnafda: 0.496; Zwaka: 1.244; Ahmiri: 1.102; Khennache: 0.707 ; Mghayten: 1.03 et Tifelt: 0.83).

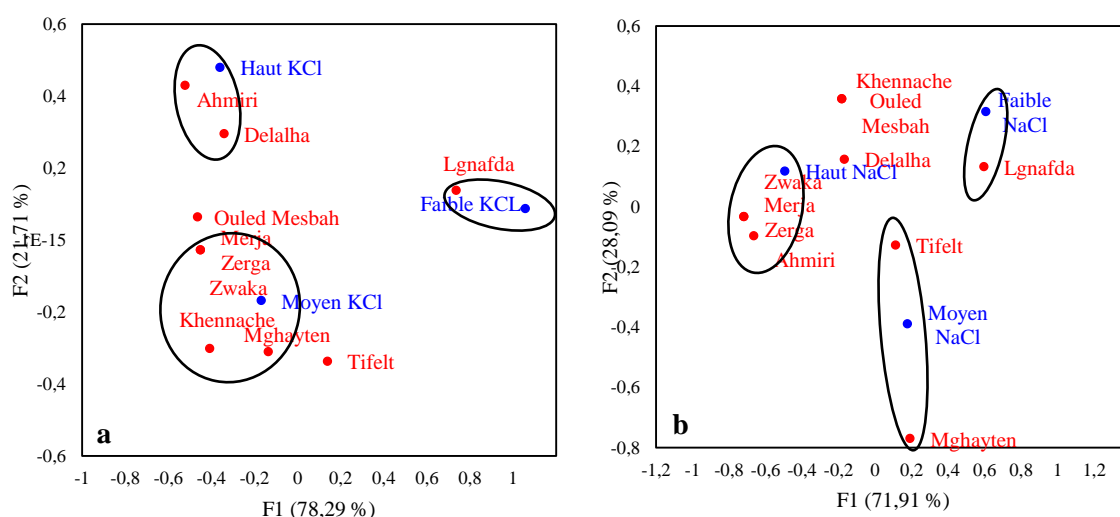


Figure II-4: Biplot de la relation entre les sites de prélèvement des isolats et leur tolérance à KCl (a) et NaCl (b).

La capacité des isolats à solubiliser le phosphate inorganique a été également lié aux sites de prélèvement ($\chi^2 = 42.798$; ddl = 24; $P < 0.05$) (Figure II-5). Le groupe de Lgnafda, Zwaka et

Mghayten se distinguent par une faible capacité de solubilisation du P suivi par Tifelt avec une solubilisation moyenne tandis qu'aucune capacité à solubiliser le P n'a été observée chez les isolats de Dlalha et Merja Zerga. Il est intéressant à noter que les isolats de la région Ahmiri possèdent à la fois une forte tolérance à la salinité ainsi que les meilleurs taux de solubilisation du P.

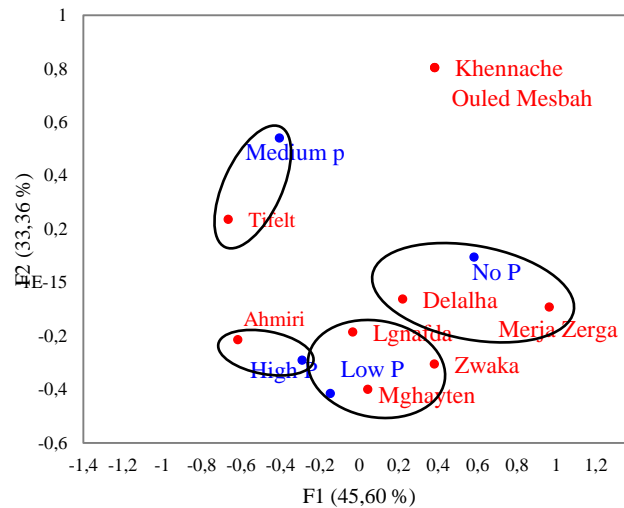


Figure II- 5: Biplot de la relation entre les sites de prélèvement des isolats et leur capacité à solubiliser le phosphate inorganique.

Les biplots de la relation établis entre la production des sidérophores et la tolérance à KCl et NaCl montrent la même distribution des variables entre la tolérance aux deux types de sel et la production des sidérophores (Figure II-6). En effet, les isolats distingués par une forte capacité à tolérer la salinité ont été incapables de produire les sidérophores, tandis que les isolats produisant des quantités élevées de sidérophores ont montré une tolérance moyenne à la salinité. Ce résultat suggère une interaction possible entre ces différents paramètres.

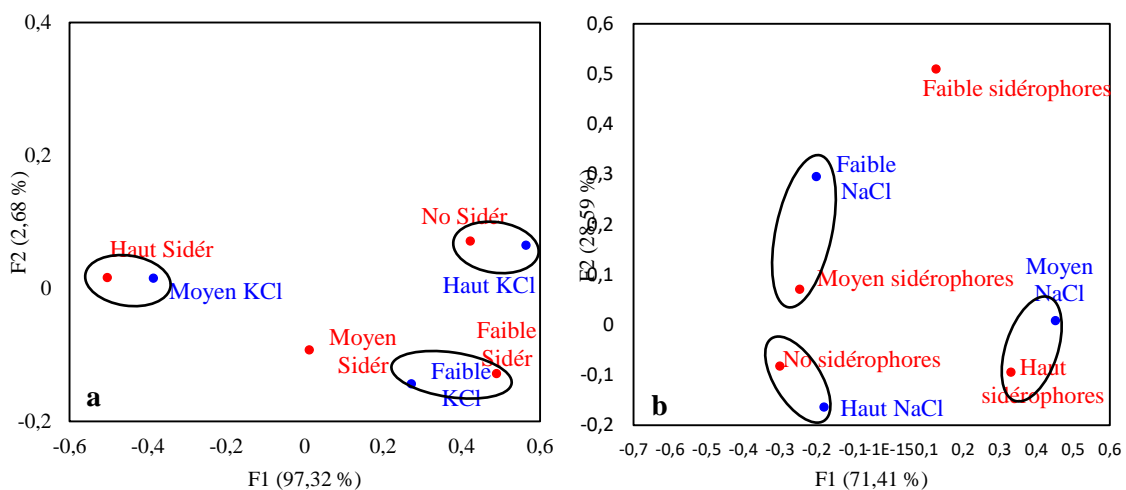


Figure II- 6. Biplot de la relation entre la capacité des isolats à tolérer KCl (a) et NaCl (b) et la production des sidérophores.

Par ailleurs, une relation significative s'est établie entre la capacité des isolats à tolérer le pH ($\chi^2 = 16.919$; ddl = 9; $P < 0.001$), NaCl ($\chi^2 = 14.325$; ddl = 6; $P < 0.05$) et KCl ($\chi^2 = 16.934$; ddl = 6; $P < 0.01$) et la production des sidérophores (Figure II-7). En revanche, la distribution des variables entre la tolérance au pH et la production des sidérophores n'était pas alignée avec celle de la tolérance au sel. Les isolats distingués par une forte capacité de production des sidérophores sont peu tolérants aux différents pH alors que les mieux tolérants sont liés à une production moyenne des sidérophores.

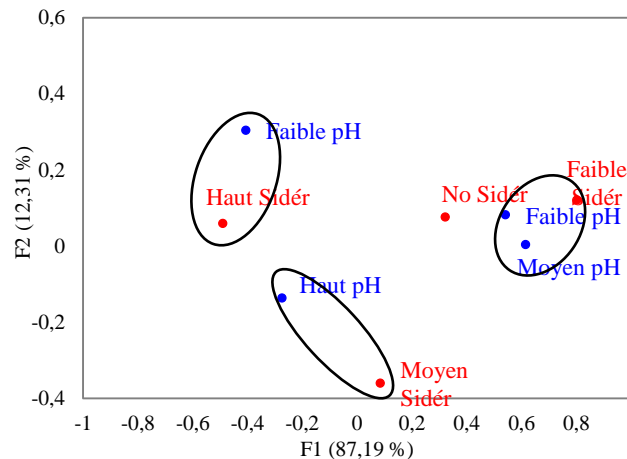


Figure II-7: Biplot de la relation entre la capacité des isolats à tolérer le pH et la production des sidérophores.

II.3.4 Evaluation de l'efficacité symbiotique des isolats de la collection

Faisant suite aux différents tests de tolérance et d'activités PGP réalisés sur l'ensemble de la collection de bactéries isolées des nodules du haricot prélevés, 45 isolats ont été retenus pour un essai d'inoculation du haricot. Les isolats testés ont été choisis sur la base des résultats de leur tolérance à NaCl, KCl, CaCl₂, et au pH, de même que des niveaux élevés d'activités PGP (Tableau, Annexe 6). Ce test avait pour but d'évaluer l'infektivité et l'efficacité des isolats en symbiose avec leur plante hôte (Annexe 7). Dix-huit parmi les 45 isolats évalués ont formé des nodules rougeâtres sur les racines du haricot. La mesure des paramètres de nodulation et de croissance des plantes a permis de mettre en évidence les trois meilleurs « LMR676, LMR670 et LMR674 » présentant des efficacités relative de 97, 70 et 50% respectivement. Malgré le faible nombre de nodules obtenu par ces trois isolats, les poids sec nodulaires étaient les plus élevés parmi tous les autres isolats. De plus, le poids sec des parties aériennes des plantes inoculées par LMR676 et LMR670 étaient très élevés et n'étaient pas statistiquement différents du témoin azoté (Tableau II-7). Cependant, il a été observé que certains isolats ont diminué le poids sec aérien à un niveau inférieur à celui du témoin non azoté ce qui indique un effet négatif sur la croissance de la plante du haricot vert.

Tableau II-7: Effet de l'inoculation sur le poids sec aérien, racinaire, nodulaire et sur le nombre de nodules des plantes du haricot vert sous conditions contrôlées.

Traitement	NN/plante	PSN (g/plante)	PSA (g/plante)	PSR (g/plante)	ER (%)
N120	0 f	0 e	0.201 a	0.152 a	100
N0	0 f	0 e	0.482 de	0.304 de	35
LMR676	38 c	0.066 a	0.415 ab	0.235 bc	97
LMR670	13 cd	0.017 ab	0.224 ab	0.172 cd	70
LMR674	68 b	0.059 a	0.241 bc	0.278 ab	56
LMR663	24 ef	0.016 de	0.223 cd	0.180 cd	49
LMR667	11 cde	0.006 cd	0.164 cd	0.215 cd	48
LMR659	106 a	0.049 a	0.180 de	0.124 cd	43
LMR666	10 f	0 e	0.124 de	0.143 cd	40
LMR672	6 cd	0.004 cd	0.132 de	0.189 cd	38
LMR665	13 cd	0.007 de	0.167 de	0.232 cd	35
LMR662	11 cd	0.006 de	0.148 de	0.128 f	34
LMR673	7 de	0.004 e	0.153 e	0.207 cd	33
LMR660	11 de	0.015 bc	0.121 de	0.096 de	32
LMR671	21 f	0.014 e	0.215 de	0.178 cd	32
LMR668	18 cd	0.011 de	0.128 e	0.125 ef	30
LMR661	41 de	0.057 e	0.347 e	0.215 cd	29
LMR675	40 de	0.042 de	0.215 e	0.197 f	25
LMR664	6 de	0.004 e	0.139 e	0.198 ef	19
LMR669	7 de	0.003 e	0.234 e	0.142 cd	19

NN: Nombre de nodules PSN : Poids sec des nodules PSA: Poids sec des parties aériennes
 PSR : Poids sec racinaire ER : Efficience relative N120 : Témoin azoté N0 : Témoin non azoté
 Les moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes

II.3.5 Identification moléculaire des souches

Selon les résultats du BLASTN (base de données NCBI), les 18 isolats qui ont été capables de former des nodules sur les racines de *P. vulgaris* peuvent être classés en deux groupes principaux. Le premier groupe contient deux souches appartenant au genre *Rhizobium* : LMR671 et LMR673 qui ont montré des similarités avec deux souches types *R. miluonense* CCBAU 41251 et *R. yanglingense* CCBAU 71623 respectivement. Tandis que le deuxième groupe contient 16 isolats appartenant au genre *Agrobacterium*. Parmi ces isolats, 8 ont été étroitement liés à *A. radiobacter* et 1 liés à *A. deltaense* YIC4121. Le reste des isolats (7) a formé un sous-groupe isolé au sien du genre *Agrobacterium* (Figure II-8).

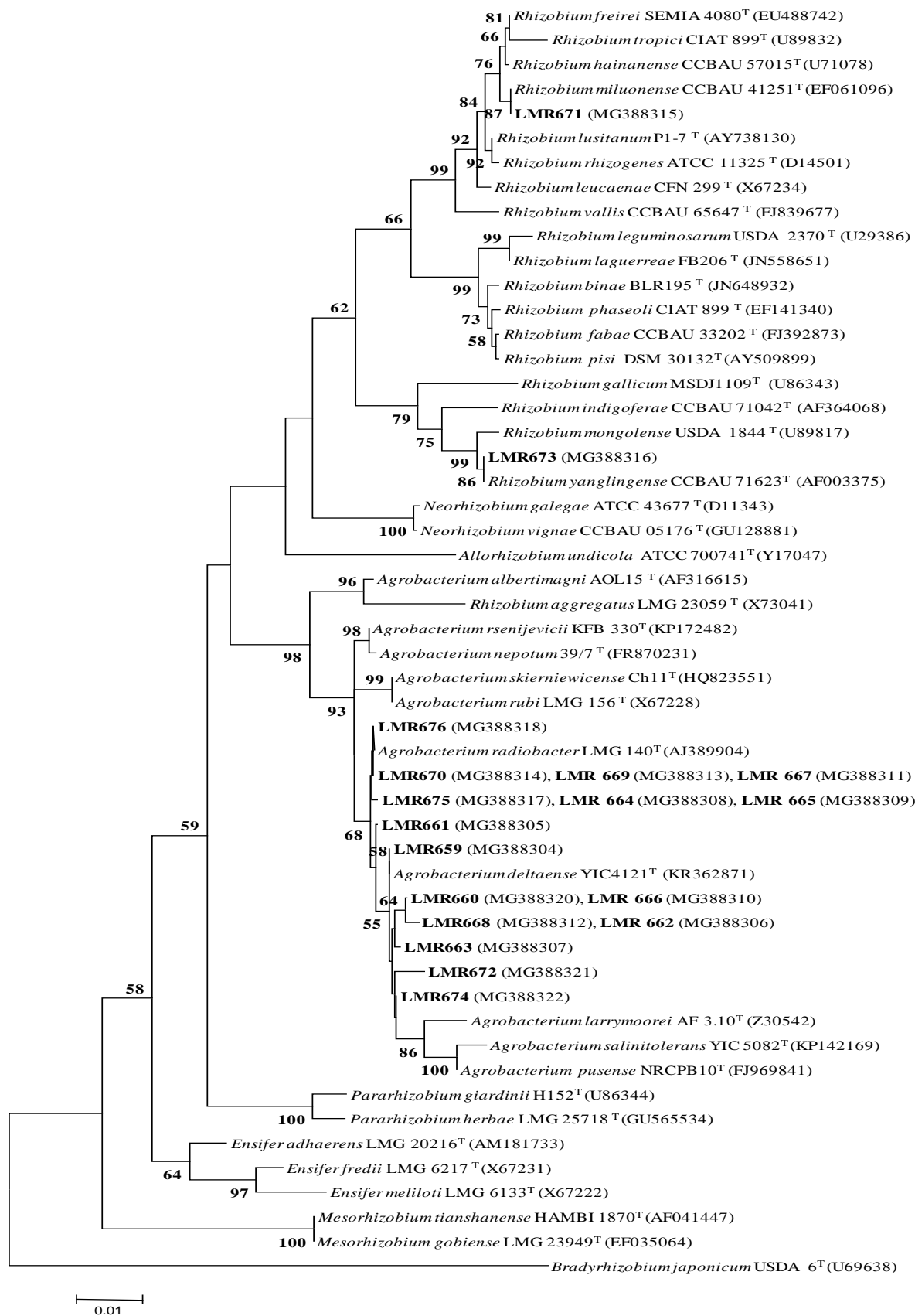


Figure II-8: Arbre phylogénique généré par l'analyse des séquences du gène ADNr 16S des souches nodulant le haricot vert.

II.3.6 Caractérisation des souches sélectionnées pour les tests de la double inoculation

Tenant compte des résultats de la caractérisation symbiotique des meilleures souches, 3 isolats d'*Agrobacterium* (LMR670, LMR674 et LMR676) ont été retenus pour les essais d'inoculation du haricot. Au préalable nous avons mené une caractérisation plus approfondie de leurs activités PGP. De plus, des souches de PGPR choisies à partir d'une collection du LMBM (P4S9, P1S6 et M131) ont été incluses dans certaines caractérisations (Tableau II-8). Ces souches ont été par la suite utilisées dans les expériences d'inoculation simple et/ou combinée du haricot.

Tableau II-8: Origine et identité des souches PGPR sélectionnées pour le test de co-inoculation

Souches	Site de prélèvement	Plante hôte	Espèces	Code d'accension
P4S9	Settat	Rhizosphère de la lentille	<i>Bacillus</i> sp.	MT560201
P1S6	Settat	Rhizosphère de la lentille	<i>Enterobacter</i> sp.	MT560199
M131	Merchouch	Nodules de pois chiche	<i>Bacillus</i> sp.	MT560200

II.3.6.1 Production de NH₃

La production d'ammoniac a été déterminée par le développement d'une couleur orange à marron après l'ajout du réactif de Nessler dans des cultures d'eau peptonée. Les résultats ont été enregistré sous forme de (+) quand la coloration développée est jaune, (++) pour l'orange, (+++) quand il y a un virage vers le marron et (-) lorsque la couleur du milieu de culture ne change pas. Dans notre cas, tous les isolats testés ont été capables de produire l'ion ammonium mais à des taux variables selon l'intensité du virage de la couleur à l'exception de la souche LMR674 (Tableau II-9).

Tableau II-9: Production d'ammoniac par les isolats testés

	Production
LMR670	+
LMR676	+++
LMR674	-
P4S9	+++
M131	++
P1S6	+++

- Pas de production ++ Production moyenne
+ Faible production +++ Forte production

II.3.6.2 Cinétique de solubilisation du phosphate inorganique

L'activité de solubilisation chez tous les isolats apparaît dès les premières heures d'incubation, elle atteint son maximum à 24h puis l'activité reste plus ou moins constante chez LMR676 et LMR670 tandis qu'elle continue à augmenter légèrement chez LMR674 jusqu'à ce qu'elle atteigne le taux de solubilisation le plus élevé (32.748 µg/mL). Par contre, les souches PGPR ont

montré des schémas de solubilisation variables : M131 et P1S6 possèdent une forte activité de solubilisation pendant les premières 24h, la valeur maximale de production étant atteinte par la souche M131 (54.743 µg/mL) au deuxième jour (32h), suivi d'une faible baisse pendant les 16h qui suivent. La souche P4S9 a montré le plus faible taux de solubilisation, ne dépassant pas les 20 µg/mL (Figure II-9).

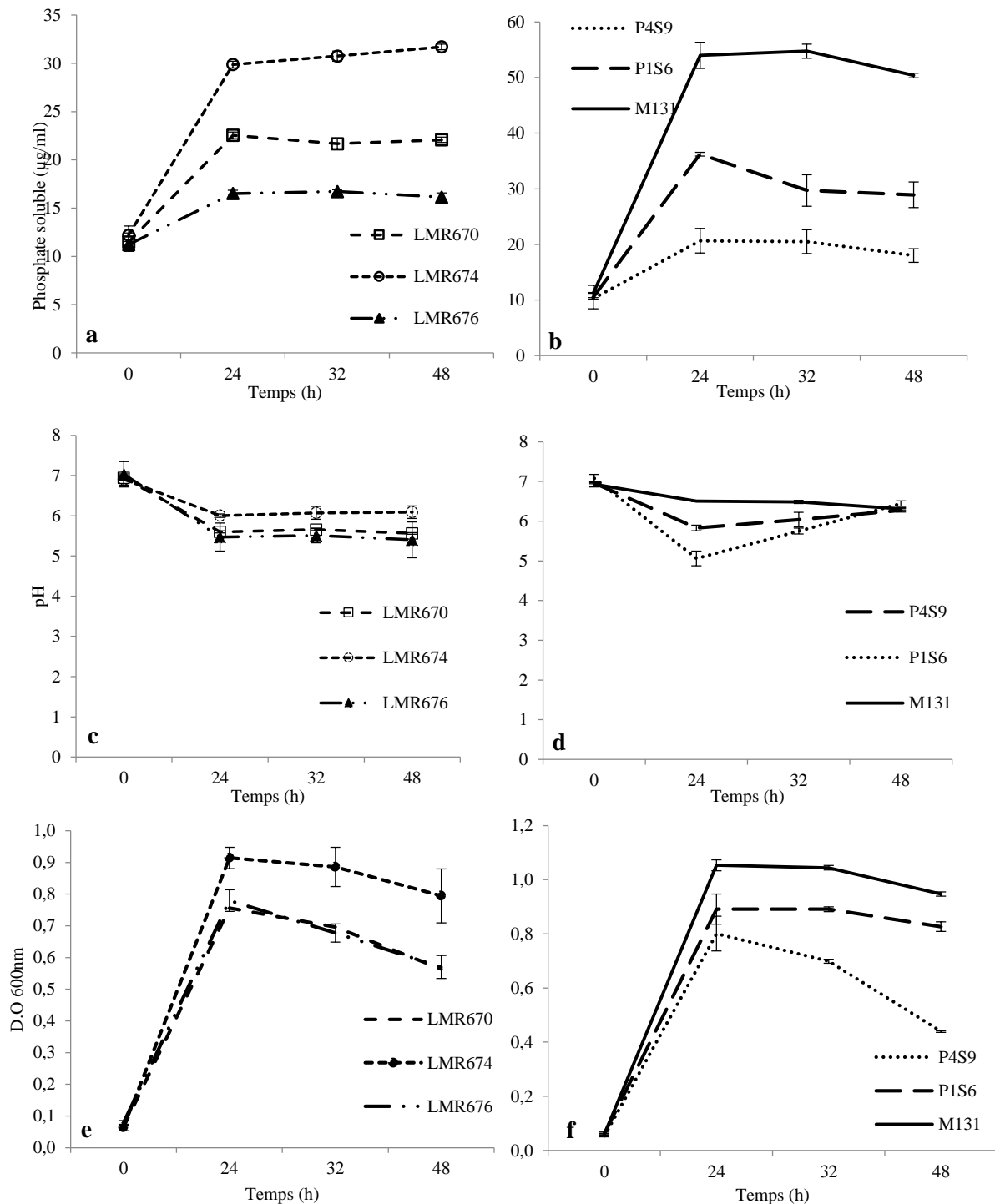


Figure II-9: Suivi de 72h de la croissance bactérienne, de la solubilisation du phosphate et du pH des milieux de culture des souches de rhizobia a, c, e:et de PGPR (b, d, f).

Une forte corrélation négative significative a été trouvée entre le taux de phosphate solubilisé et le pH du milieu de culture (Figure 1, Annexe 5): LMR670 ($P < 0.001$, $r = -0.79$), LMR674 ($P = 0.004$, $r = -0.64$), LMR676 ($P < 0.001$, $r = -0.91$), P4S9 ($P < 0.001$, $r = -0.91$), P1S6 ($P < 0.001$, $r = -0.84$). La souche *Bacillus* sp. M131 fait exception, car la production maximale de phosphate n'est pas corrélée avec une forte diminution du pH du milieu. D'autre part, une forte corrélation positive a été trouvée entre la croissance bactérienne et l'activité de solubilisation (Figure 2, Annexe 5): LMR670 ($P < 0.001$, $r = 0.84$), LMR674 ($P < 0.001$, $r = 0.97$), LMR676 ($P < 0.001$, $r = 0.84$), P4S9 ($P = 0.009$, $r = -0.59$), P1S6 ($P < 0.001$, $r = 0.97$) et M131 ($P < 0.001$, $r = 0.95$).

II.3.6.3 Cinétique de production d'AIA

Différentes courbes de production ont été observées : LMR676 à atteint son maximum de production (124.20 $\mu\text{g/mL}$) à 48h puis a connu une forte baisse de production, tandis que LMR670 a atteint le maximum de production (131.84 $\mu\text{g/mL}$) à 72h (Figure II-10 a).

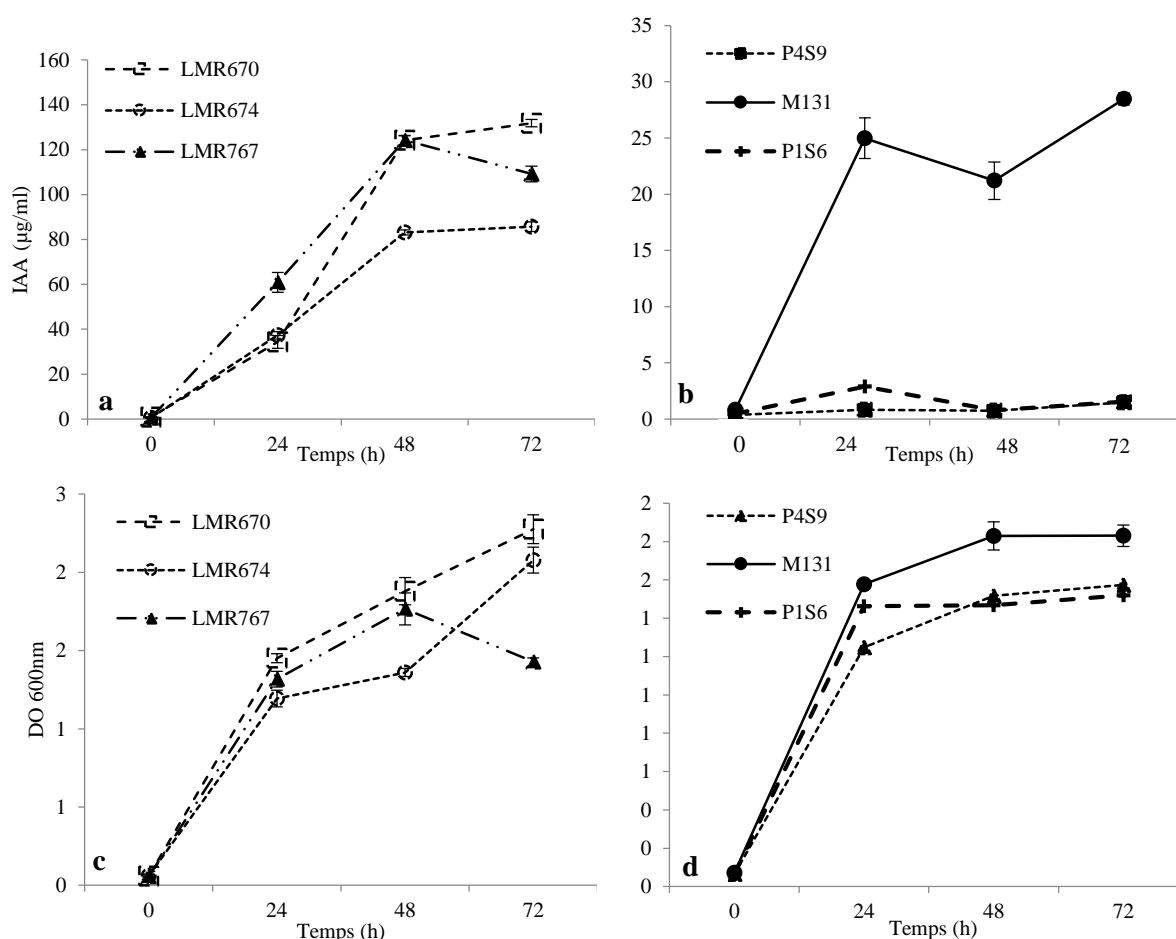


Figure II-10: Suivi pendant 72h d'incubation de la production d'AIA (a-b) et croissance bactérienne (c-d) des rhizobia (LMR670, LMR676 et LMR674) et souches PGPR (P4S9, P1S6 et M131).

Il est à noter que les taux d'AIA produit par les rhizobia étaient beaucoup plus importants que ceux produits par les PGPR. Le plus grand taux d'AIA produit chez les PGPR était obtenu par la souche M131 (28.48 µg/mL) alors que P4S9 et P1S6 ont montré une production très faible (1.47 µg/mL, 2.9 µg/mL et 1.35 µg/mL respectivement). Par ailleurs, les souches productrices d'AIA ont montré une augmentation graduelle de la production parallèlement à la croissance (Figure II-10 b) à l'exception de la souche M131 qui a enregistré une légère diminution à 48h suivi d'une augmentation de la production à 72h.

II.3.6.4 Activité ACC désaminase

Les résultats affichent un taux de croissance significativement élevé de certaines souches notamment P1S6, P4S9, et LMR676 dans le milieu additionné d'ACC par rapport à la croissance en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Les souches LMR670 et M131 ont une capacité moyenne d'utilisation de l'ACC avec des valeurs de DO relativement faibles en présence d'ACC en comparaison à leur croissance en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En fin, la souche LMR674 serait incapable d'utiliser l'ACC, car la valeur de DO en présence d'ACC n'est pas très différente de celle obtenue en présence de MgSO_4 (Figure II-11).

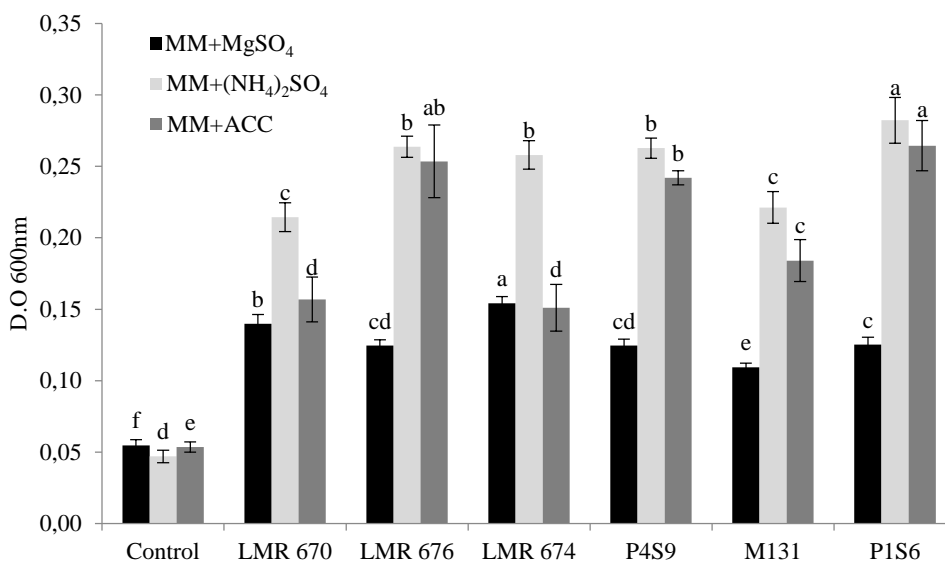


Figure II-11: Croissance bactérienne en présence de MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et ACC

MM: Milieu Minimum

Control: Témoin négatif inoculé par MgSO_4

II.4 Discussion

Dans la présente étude, nous avons constitué une collection de 133 isolats bactériens issus des nodules de *P. vulgaris* récoltés à travers différentes zones de production au Maroc. Une étude

des caractéristiques physiologiques et phytobénéfiques de ces souches a été réalisée en vue de sélectionner les meilleurs candidats pour l'inoculation du haricot vert.

Caractérisation globale des souches de la collection

Les tolérances à la salinité et au pH, ont constituées les premiers critères retenus pour le criblage des isolats de notre collection. Les niveaux de tolérance au sel enregistrés variaient selon le type de sel appliqué. La majorité des isolats ont été capables de croître à des concentrations élevées de NaCl et KCl alors que le spectre de tolérance des isolats au CaCl₂ était très limité. Cet effet inhibiteur sur la croissance bactérienne a été observé par plusieurs chercheurs qui ont rapporté des variations de la croissance bactérienne en réponse à différents types de sel appliqués dont le CaCl₂ était le plus toxique (Abdelmoumen *et al.*, 1999; Yadav and Vyas, 1971; Yaganza *et al.*, 2009). En plus et pareillement à notre étude, des niveaux de tolérance élevés à NaCl par des isolats obtenus des nodules de différentes espèces ont été signalés dans plusieurs études (Boukhatem *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2000; Gal and Choi, 2003). L'existence de bactéries halotolérantes dans un site donné peut être le résultat d'une adaptation au stress salin dû à une forte augmentation de la concentration en sel dans le sol durant les périodes sèches (Yaish *et al.*, 2016). A cet effet la forte tolérance au sel observé chez nos isolats pourrait être attribuée aux taux élevés de salinité de l'eau d'irrigation des sites de prélèvement.

Quant à la tolérance au pH, les isolats étaient majoritairement tolérants à une large gamme de pH allant de 4 à 9, tandis que certains ont été fortement affectés aux pH extrêmes surtout acides. La capacité à tolérer différents pH varie d'une espèce à une autre et même parfois d'une souche à l'autre appartenant à la même espèce. Les rhizobias sont généralement moins tolérants aux pH extrêmes sauf quelques exceptions comme le cas d'une souche de *R. etli* isolée d'un sol égyptien qui s'est avérée fortement tolérante à des pH très acides ainsi qu'à de fortes concentrations en sel (Shamseldin and Werner, 2005). De plus, d'autres chercheurs ont isolé à partir des nodules de légumineuses, des espèces bactériennes autres que les rhizobiums capables de se développer à des pH extrêmes (Dakora, 2012; Kan *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2013). Ainsi, selon nos résultats et ceux rapportés dans la littérature, les isolats issus des nodules de *P. vulgaris* ont pour leur majorité une tolérance moyenne vis-à-vis la salinité ou des variations du pH. Cependant des souches peuvent faire l'exception et tolérer de fortes concentrations en sel ou des pH extrêmes. Ces résultats mettent également en évidence la grande diversité phénotypique qui pourrait être rencontrée chez les isolats provenant de différents nodules ou d'un même broyat nodulaire chez la même espèce de légumineuse.

Le premier trait PGP évalué chez nos isolats était la production d'AIA qui était très variable entre les isolats provenant de différents sites et même au sein du même site tandis que certains isolats se sont distingués par des quantités élevée d'auxine produites. La variation du taux de synthèse de l'AIA entre les souches de différentes espèces peut être attribuée à des voies de biosynthèse différentes chez les isolats, à la disponibilité du substrat dans le milieu et au stade de croissance des souches (Mirza *et al.*, 2001).

La deuxième activité biologique étudiée concerne la capacité des souches à solubiliser une source de phosphate inorganique (la poudre de roche phosphatée). La roche phosphatée a été utilisée dans nos tests vue son effet positif démontré sur l'amélioration du rendement en biomasse et de la teneur en azote accumulé par les légumineuses (Somado *et al.*, 2006). La solubilisation du phosphate est un trait fréquent chez les bactéries rhizosphériques et plus particulièrement chez les bactéries isolées à partir des nodules de *P. vulgaris*. Certaines études ont démontré la capacité des bactéries solubilisatrices de phosphate à améliorer, en inoculation, la croissance des plantes du haricot dans des conditions de déficience en phosphate, de salinité et même dans des sol acides (Abdelmoteleb and Gonzalez-Mendoza, 2020; Collavino *et al.*, 2010; Korir *et al.*, 2017).

La production des sidérophores était le deuxième trait le plus fréquent chez nos isolats après la solubilisation du phosphate. Plus du tiers des isolats ont produit des taux supérieurs à 60%, ce qui pourrait conférer à ces isolats la possibilité de contribuer à l'amélioration de la nutrition ferrique des plantes et d'agir comme un moyen de biocontrôle de certains agents phytopathogènes, constituant ainsi une bonne alternative aux molécules chimiques de synthèse (Ahmed and Holmström, 2014).

Etude des relations entre les résultats des différents paramètres étudiés

L'ensemble des paramètres étudiés nous ont permis d'avoir une idée sur la tolérance à la salinité et au pH, de même que le potentiel PGP de la collection de souches isolées des nodules du haricot poussant dans différentes zones de production au Maroc. Il nous a semblé alors intéressant de chercher les éventuelles relations entre ces différents paramètres. Une analyse factorielle de correspondance a permis une bonne visualisation et interprétation des corrélations entre les différentes variables. Ainsi, malgré la grande variabilité au niveau de tolérance des isolats aux différents types de sels appliqués, des associations ont été révélées entre la tolérance à KCl et NaCl et les sites d'échantillonnage des isolats. Ceci a été également mentionné dans plusieurs autres études, notamment Kulkarni *et al.* (2000), Keneni *et al.* (2010) et Brígido *et al.*

(2012), qui ont indiqué que la fréquence de tolérance des isolats était liée à leurs sites de prélèvement. Cependant, dans notre cas les échantillons de sol analysés ont montré une faible CE (allant de 0.1 à 0.3 mS/cm), par contre les eaux d'irrigation présentaient des niveaux de salinité assez élevés, ce qui permettrait de mieux expliquer les résultats obtenus. D'après ces différentes constatations, il apparaît donc que ces associations confirment l'importance que constitue l'eau d'irrigation dans l'adaptation des bactéries à la salinité et dans la sélection des isolats halotolérants.

De même, la capacité des isolats à solubiliser le P était également liée à leur origine de prélèvement. Cette association peut être due à la différence des propriétés du sol du site de prélèvement (propriétés physiques et chimiques, teneur en matière organique et en P) et même aux pratiques agricoles (Kim *et al.*, 1997). Par ailleurs, la disponibilité du P peut être affectée par le pH du sol vu que l'alcalinité le rend moins disponible et aussi en formant des complexes avec le fer et l'oxyde d'aluminium dans les sol acides (Oburger *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que la capacité des isolats à solubiliser le phosphate peut être liée aux caractéristiques du sol d'origine qui peut agir comme une pression sélective.

Des associations ont été également établies entre la production des sidérophores et la capacité des isolats à tolérer les stress appliqués (sel et pH). La coexistence de ces deux traits (résistance au stress et production des sidérophores) au sein du même isolat a été déjà signalée dans plusieurs études. A titre d'exemple, Damodaran *et al.* (2013) et Tank and Saraf (2010) ont mis en évidence la capacité de certains rhizobactéries tolérantes au stress salin à produire de fortes concentrations en sidérophores. De plus, la littérature semble suggérer une relation entre le pH et la formation du complexe Fe(III)-sidérophores qui peut exister en raison de la concurrence entre le fer et les protons envers les sidérophores libres (Albrecht-Gary and Crumbliss, 1998). Cependant, les résultats actuels ne semblent pas suffisants pour expliquer clairement la relation entre la production des sidérophores et la tolérance aux stress. Toutefois et selon nos résultats, un lien potentiel entre ces différents traits semble plausible.

Caractérisation des souches sélectionnées pour l'inoculation.

L'observation des courbes de production d'auxine et croissance bactérienne, a montré qu'elles avaient la même allure générale. L'augmentation des taux d'AIA produit par certains isolats dans le milieu est parallèle à l'augmentation de la densité optique de la culture et les deux courbes s'arrêtent en même temps. Selon une étude faite par Sridevi and Veera Mallaiah (2007), la croissance bactérienne et la production d'AIA dépendaient des sources de carbone et d'azote

utilisées. Dans notre cas, cette évolution parallèle peut être expliquée par une bonne utilisation de la source de carbone (mannitol) par les isolats et aussi par la quantité adéquate fournie du L-Tryptophane. Par ailleurs, le léger déclin de synthèse d'AIA observé chez *Bacillus* sp. M131 après 48h d'incubation peut être dû à l'utilisation de L-Tryptophane comme source de carbone ou d'azote pour la croissance de la souche (Leveau and Lindow, 2005). De plus, le taux de solubilisation le plus élevé a été atteint par cette souche. Les souches du genre *Bacillus* sont parmi les plus performantes en solubilisation du phosphate (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2000).

Dans notre étude, nous avons constaté que pour la majorité des souches les pics de production correspondent aux pH les plus bas, ce qui suggère la production d'acides organiques dans le milieu. Cette voie est la plus citée dans la littérature scientifique. Toutefois, la souche *Bacillus* sp. M131 qui a l'activité solubilisatrice la plus élevée n'obéit pas à ce schéma général, d'autres modes de solubilisation pourraient donc être impliqués. En effet, d'autres mécanismes de solubilisation du phosphate, autre que la libération des acides organiques, sont rapportés dans la littérature comme la libération des acides inorganiques (tels que les acides sulfurique, nitrique et carbonique), production de substances chélatrices ou la libération d'enzymes ou enzymolyse (Alori *et al.*, 2017).

Dans la présente étude, l'évaluation *in-vitro* de l'activité ACC désaminase a révélé la capacité de tous les isolats testés à croître dans le milieu minimum en utilisant l'ACC comme seule source d'azote (Figure II-11). L'utilisation de ce genre de souches PGPR en combinaison avec des rhizobia pourrait améliorer la nodulation dans les conditions de stress à travers la modification de l'architecture des racines ou encore la suppression de la biosynthèse de l'éthylène au niveau racinaire (Grover *et al.*, 2021). En effet, cette enzyme baisse le niveau de l'éthylène endogène de la plante, qui joue le rôle de molécule de signal lors d'un stress, entraînant ainsi l'élongation des racines (Glick, 2014). De ce fait, les bactéries rhizosphériques capables de produire cette enzyme offrent l'avantage d'améliorer le taux de la rhizo-remédiation des sols en stimulant le système racinaire des plantes offrant aussi un meilleur accès au sol (Singh *et al.*, 2015).

Quant à l'ammoniac (NH_3) produit par les rhizobactéries, c'est une source d'azote supplémentaire dans le sol qui contribue dans l'alimentation azotée des plantes par l'ammonification. En effet, la bactérie décompose le matériau azoté complexe et libère de l'ammoniac dans le sol qui est absorbé par la plante comme source nutritive (Singh *et al.*, 2019a). La production d'ammoniac peut également favoriser l'élongation des racines et des

parties aériennes des plantes ainsi que leur biomasse (Marques *et al.*, 2010). Dans notre cas, les isolats présentaient une variabilité de production d' NH_3 avec une forte production observée chez les bactéries PGP. D'une manière générale, la production de NH_3 est fréquente chez des isolats testés provenant de différentes rhizosphères (Goswami and Deka, 2020; Singh *et al.*, 2019a).

Potentiel symbiotique des isolats de la collection

Dans le but d'évaluer l'efficacité symbiotique des 45 isolats sélectionnés pour leurs caractères phénotypiques pertinents et leurs traits PGP. Un test d'infectivité et d'efficacité a été réalisé sous conditions contrôlées. Seuls 18 isolats ont été capables de former des nodules efficaces, le reste serait constitué de bactéries non symbiotiques, déjà signalées par de nombreux auteurs. A titre d'exemple, Rajendran *et al.* (2012) ont isolé des bactéries non symbiotiques d'environ 15% des nodules traités. La mise en évidence des endophytes à l'intérieur des nodules a été également démontrée chez les plantes du haricot vert comme le cas de Kawaka *et al.* (2018) qui ont rapporté la présence de 4 genres bactériens (*Bacillus*, *Pantoea*, *Klebsiella* et *Enterobacter*) autres que le *Rhizobium* à l'intérieur des nodules du haricot. Les bactéries non symbiotiques seraient des endophytes qui arrivent à migrer le long du cordon d'infection formé par le *Rhizobium* et se localisent dans les nodules racinaires (Pandya *et al.*, 2013).

Il est à noter qu'en termes d'efficacité, trois isolats (LMR676, LMR670 et LMR674) présentaient les efficacités relatives les plus élevées (97, 70 et 56% respectivement) avec un rendement en matière sèche aérienne qui n'est pas statistiquement différents du témoin azoté. Ces souches peuvent ainsi contribuer à l'amélioration de la culture du haricot vert tout en permettant de réduire les intrants chimiques et remplacer en majorité les engrais azotés. Toutefois, certains rhizobia ont réduit ou affecté négativement la croissance des plantes du haricot en comparaison avec le témoin non azoté. En effet de très nombreuses espèces de rhizobium sont capables de noduler le haricot sans pour autant pouvoir fixer l'azote (Shamseldin and Velázquez, 2020).

Identification des souches nodulant le haricot dans les sols prospectés

L'isolement des rhizobia à partir des nodules de *P. vulgaris* et l'étude de leur diversité génétique a été faite presque partout dans le monde. Ces études ont mis en évidence l'existence d'une large diversité au sein des rhizobia nodulant le haricot. Selon Michiels *et al.* (1998), *P. vulgaris* est un hôte non sélectif pour la nodulation ce qui pourrait être due à la capacité de cette plante

à percevoir des signaux de nodulation de plusieurs espèces de *Rhizobium*. Ceci a été prouvé ultérieurement dans plusieurs rapports où les chercheurs ont pu identifier environ 30 espèces nodulant *P. vulgaris* (Efstathiadou *et al.*, 2021). Au Maroc, Mouhsine *et al.* (2007) ont mené une étude sur la diversité génétique d'une collection de rhizobia nodulant le haricot vert isolés du Nord-Ouest du Maroc. Cinq espèces ont été identifiées *R. etli*, *R. tropici*, *R. gallicum*, *R. leguminosarum* et *S. meliloti*. Tandis que dans les sols de Marrakech-Tensift-Al Haouz les souches nodulant *P. vulgaris* sont étroitement liées à *Rhizobium etli*, *Rhizobium phaseoli*, *R. gallicum sv gallicum* et *R. tropici* (Faghire *et al.*, 2012).

Dans notre étude, l'analyse moléculaire basée sur le gène ADNr 16S a montré que deux isolats appartenaient au genre *Rhizobium* : LMR673 qui est apparenté à *R. yanglingense* et LMR 671 à *R. miluonense*. Ces deux espèces ont été auparavant isolées de différents nodules racinaires de légumineuses et formaient des nodules inefficaces sur *P. vulgaris* (Gu *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2001). Le reste des souches symbiotiques de notre collection est apparenté au genre *Agrobacterium*. Il est à noter que de nombreuses souches d'*Agrobacterium* ont été isolées par plusieurs auteurs à partir des nodules racinaires de *P. vulgaris* (Aguilar *et al.*, 2016; Mhamdi *et al.*, 2005) et de différentes autres légumineuses (Chen *et al.*, 2000; de Lajudie *et al.*, 1999). Leur capacité à noduler les légumineuses pourrait être due à l'acquisition de gènes symbiotiques par transfert latéral de gènes, comme suggéré dans plusieurs études (García-Fraile *et al.*, 2010; Moulin *et al.*, 2004). De plus, il a été démontré que certaines souches d'*Agrobacterium* portent des gènes symbiotiques (*nodA*) et des gènes de fixation (*nifH*) similaires aux gènes présents chez des symbiotes de différentes légumineuses (Cummings *et al.*, 2009; Rincón-Rosales *et al.*, 2009; Youseif *et al.*, 2014).

Dans le groupe des agrobacteriums identifiés dans notre étude, 8 isolats étaient étroitement apparentés à *A. radiobacter*. Cette espèce autrefois considérée comme non symbiotique a été signalée par Ribeiro *et al.*, (2013) comme étant capable de noduler le haricot vert. Ces auteurs ont étudié les affiliations taxonomiques des bactéries isolées à partir des nodules racinaires du haricot vert et ont constaté que quatre souches étaient affiliées au sein du clade d'*A. radiobacter*. D'un autre côté, la nodulation de différentes légumineuses par des souches d'*A. radiobacter* a été signalée dans plusieurs études, telles que *Acaciella angustissima* (Rincón-Rosales *et al.*, 2009) et *Sesbania cannabina* (Cummings *et al.*, 2009) *Vicia faba* (Youseif *et al.*, 2014) et *Glycine max*L. (Chen *et al.*, 2000). Parmi les espèces identifiées dans notre étude, 1 isolat a été regroupé avec *A. deltaense* (YIC4121T), une nouvelle souche type récemment décrite par Yan *et al.* (2017b) et qui a été isolé à partir de nodules racinaires de *Sesbania cannabina*. Les études

de tolérance ont révélé que cette souche est capable de croître dans un pH allant de 5 à 10 et de tolérer jusqu'à 4% de NaCl. Ces caractéristiques sont conformes à celles obtenues dans la présente étude. Ces résultats confirment encore une fois la grande diversité des rhizobia nodulant le haricot au Maroc et partout dans le monde.

L'identification de souches agrobactériennes marocaines indigènes capable de former des nodules efficaces sur les racines du haricot vert est un résultat nouveau et potentiellement précieux qui mérite certainement d'autres études. Il serait également judicieux d'approfondir les études de diversité génétique en ciblant des gènes de ménage (RecA, glnII et atpD), des gènes symbiotiques (NodC, NodA) et des gènes de fixation (nifH), ce qui permettrait une analyse plus fine de la phylogénie et du statut symbiotique de ces espèces bactériennes.

***Chapitre III : Evaluation de de l'effet de
l'inoculation par des souches sélectionnées
sur la croissance du haricot vert dans un sol
pauvre sous conditions contrôlées***

III.1 Introduction

Le phosphore (P) est un élément qui est largement distribué dans la nature. Il est considéré, avec l'azote (N) et le potassium (K), comme un constituant fondamental et un élément limitant pour la croissance et le développement des plantes. Il joue un rôle central dans une série de fonctions du métabolisme de la plante à savoir la photosynthèse, la respiration et d'autres fonctions qui influent directement ou indirectement sur la fixation de l'azote par les légumineuses (Olivera *et al.*, 2004). Cependant, les quantités disponibles dans le sol des formes de P assimilables par les racines sont insuffisantes pour assurer une croissance optimale des plantes (de l'ordre du micromolaire) (Frossard *et al.*, 2000). De ce fait, l'intensification des systèmes de production agricole rend nécessaire l'apport d'engrais phosphatés synthétiques afin d'améliorer le statut phosphaté du sol et d'assurer une croissance optimale des plantes ainsi que des rendements adéquats. Néanmoins, le coût élevé des engrais chimiques, ainsi que les dangers indéniables liés à leur mauvaise utilisation, rendent nécessaire la recherche de solutions de fertilisation alternative et durable. Ainsi, de nombreux moyens biologiques qui concilient les exigences économiques et environnementales sont proposés par les chercheurs afin de pallier aux carences en phosphate assimilable dans les sols, tels que l'utilisation de géotypes de plantes plus efficaces pour l'absorption du P ou bien l'utilisation des micro-organismes solubilisant les phosphates inorganiques. Ces derniers font partie d'une large gamme de microorganismes bénéfiques pour les plantes, qui comprennent des champignons et des bactéries.

Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) et en particulier les bactéries solubilisatrices du phosphate inorganique (BSP) suscitent un intérêt croissant chez les chercheurs partout dans le monde, car leur utilisation serait très avantageuse pour l'agriculture. Ainsi de nombreux travaux de recherche ont signalé que l'inoculation des plantes avec des BSP sélectionnées peut mobiliser le P à partir des sources peu disponibles et donc améliorer la nutrition des plantes (Guiñazú *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2009).

Ces bactéries rhizosphériques procurent un large spectre d'activités phytostimulatrices mais sont pour leurs majorités incapables de couvrir pleinement les besoins nutritifs de la plante, en particulier pour l'azote. Pour les légumineuses, le problème peut être résolu en inoculant les plantes avec des consortiums combinant des souches sélectionnées de PGPR avec des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote atmosphérique. Cependant, une sélection rigoureuse des combinaisons de PGPR/*Rhizobium* à utiliser est nécessaire afin d'assurer de façon efficace la

croissance des plantes et d'améliorer la santé et la durabilité de nos systèmes agricoles. C'est dans ce contexte que se situe le présent chapitre de notre thèse, dont l'objectif principal est d'évaluer l'effet de l'inoculation avec des souches sélectionnées de PGPR et d'*Agrobacterium* sur la croissance et la nodulation du haricot vert dans un sol à faible teneur en P assimilable. Pour ce faire deux essais d'inoculation du haricot avec des inocula simples et/ou combinés ont été réalisés sous serre dans différentes conditions de fertilisation phosphatée.

III.2 Matériel et méthodes

III.2.1 Premier essai d'inoculation du haricot par des souches sélectionnées d'*Agrobacterium* et de PGPR sous différents traitements de phosphate

III.2.1.1 Souches bactériennes utilisées

Les souches d'*Agrobacterium* utilisées dans ce test ont été sélectionnées pour leur interaction symbiotique efficace avec le haricot (efficacité relative élevée), alors que pour les PGPR nous avons retenus celles qui présentaient des niveaux d'activités biologiques supérieures. Les principales caractéristiques de ces souches sont récapitulées dans le tableau III-1.

Tableau III-1: Origine et principaux traits PGP des souches sélectionnées pour le test de co-inoculation

Souches	Organe/Plante	P produit ($\mu\text{g/mL}$)	Auxine ($\mu\text{g/mL}$)	Sid (%)	ACC	RE (%)	Genre/Espèce (basé sur 16S rRNA)
LMR676	Nodules du haricot vert	16.72	122.20	50	+++	89	<i>A. radiobacter</i>
LMR670	Nodules du haricot vert	22.55	124.23	27	++	74	<i>A. radiobacter</i>
LMR674	Nodules du haricot vert	31.70	85.74	88	+++	56	<i>Agrobacterium</i> sp.
P4S9	Rhizosphère de la lentille	20.66	-	55	++	-	<i>Bacillus</i> sp.
P1S6	Rhizosphère de la lentille	36.89	-	49	+++	-	<i>Enterobacter</i> sp.
M131	Endophyte des nodules de pois chiche	54.74	21.20	30	+++	-	<i>Bacillus</i> sp.

P: Quantité de phosphate solubilisé
Auxine: Quantité d'auxine produite

Sid: Sidérophore produit
ACC: Activité ACC désaminase

ER: Efficacité relative

III.2.1.2 Test d'antagonisme entre souches de PGPR et d'agrobacteriums

Avant l'application des inocula mixtes *Agrobacterium* et PGPR, il était nécessaire de s'assurer qu'aucune des bactéries ne manifeste une activité antagoniste envers l'autre. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode de la double couche (Vidaver *et al.*, 1972) qui permet de mettre en évidence la présence de substances antibactériennes/antifongiques qui diffusent dans le milieu de culture et inhibent fortement la croissance microbienne. Les cultures bactériennes ont été déposées dans des boîtes de Petri contenant le milieu de culture YEM (sans rouge Congo) à raison de 3 gouttes par boîte. Après 48h d'incubation à 28°C, la culture bactérienne est grattée

à l'aide d'un étaloir en verre stérile (par flambage) et les cellules bactériennes restantes sont tuées en exposant la surface du milieu aux vapeurs de chloroforme pur (99.7%) durant 2h dans un dessiccateur. Les boîtes ainsi traitées sont gardées ouvertes dans une zone stérile (sous la hotte) pendant environ une demi-heure pour permettre l'élimination de l'excès des vapeurs de chloroforme. Le milieu est ensuite couvert d'une fine couche d'agar molle stérile (0.3%), puis la 2^{ème} suspension bactérienne est étalée au-dessus du milieu. Après ré-incubation pendant 48h, l'absence ou la présence de la croissance de la deuxième souche ensemencée dans le milieu a été observée.

III.2.1.3 Préparation du dispositif expérimental

Préparation du sol

Le sol choisi pour cet essai a été prélevé dans un site non cultivé se trouvant à Douar Zili situé entre Sidi Allal el Bahraoui et Tifelt (coordonnées GPS : N 33°56 '57.4" et W 006°28'04.4"). Des analyses physicochimiques ont été réalisées pour confirmer l'état de fertilité de ce sol. Le sol est tamisé pour éliminer les gros débris de végétaux, d'animaux et les cailloux. Il est ensuite lavé et séché, puis réparti dans les mêmes pots en plastique, décrits précédemment, préalablement lavés et séchés.

Préparation des pré-cultures et inoculation des plantules

Les suspensions bactériennes ont été préparées dans du milieu YEM liquide et utilisées au semis avec 1 mL de culture contenant 10^9 cellules/mL de chaque souche bactérienne (*Agrobacterium* et/ou PGPR). L'inoculum a été appliqué directement sur les graines à l'aide d'une micropipette au moment du semis. Deux traitements phosphatés ont été adoptés dans cet essai.

Traitement 1 : Phosphate soluble à raison de 80 kg/ha

Traitement 2 : Roche phosphatée broyée ajoutée à raison de 20% (Pins)

Ils ont été appliqués aux différents inocula simples et combinés. Des pots témoins ont été prévus pour toutes les combinaisons et tous les traitements (Tableau III-2). Le phosphate soluble a été appliqué sous forme de K_2HPO_4 (1M) selon les traitements et l'azote sous forme de KNO_3 pour les témoins azotés à raison de 120 kg/ha. Les pots ont été placés dans une serre dans les mêmes conditions citées précédemment en Bloc Aléatoire Complet.

Tableau III-2: Traitements et inoculations appliquées pour le premier test d'inoculation

	P (80kg/ha)	Pins (20%)
Témoins	Témoin N120 Témoin N0	Témoin N120 Témoin N0
Inoculations simples	LMR670 / LMR676/ LMR674 P4S9/ M131/ P1S6	LMR670 / LMR676/ LMR674 P4S9/ M131/ P1S6
Inoculations combinées	LMR670+ P4S9/ M131/ P1S6 LMR676+ P4S9/ M131/ P1S6 LMR674+ P4S9/ M131/ P1S6	LMR670+ P4S9/ M131/ P1S6 LMR676+ P4S9/ M131/ P1S6 LMR674+ P4S9/ M131/ P1S6

Arrosage et entretien des plantes

Durant la première semaine, la fréquence d'arrosage était d'un jour sur deux, de même que l'apport d'azote pour les témoins azotés et du phosphate selon les traitements. Pendant toute la période de culture l'arrosage a été fait à raison de 350 mL voir 400 mL par pot. Tout en tenant compte de la quantité des solutions azotées et phosphatées ajoutées.

Récolte des plantes et mesure des paramètres de croissance

Après 40 jours de culture sous serre, les plantes sont déterrées traitement par traitement. Les racines sont soigneusement lavées afin d'éviter la perte les nodules. Les nodules de chaque plante sont comptés et les parties aériennes et racinaires sont séparées et placées dans l'étuve à 60°C pour le séchage durant 48h. Ensuite les poids secs des parties aériennes et racinaires sont déterminés.

III.2.2 Deuxième essai d'inoculation du haricot sous différents traitements phosphatés

Les résultats du premier essai d'inoculation ont permis d'identifier les inocula bactériens les plus performants. Les meilleurs inocula ont fait l'objet d'un deuxième essai dont le but était de confirmer le potentiel réel des souches retenues en inoculation simple ou combinée en termes d'infectivité et d'efficience. En plus un traitement témoin négatif déficient en P a été rajouté.

III.2.2.1 Traitements phosphatés et inoculation bactérienne

Les inoculations simples ou doubles avec *Agrobacterium* et/ou des PGPR ont été sélectionnées suite aux résultats de l'étude antérieure. Parmi les 3 souches d'*Agrobacterium* testées, seule LMR670 a été choisie pour un deuxième essai de confirmation (Tableau III-3). Les deux traitements de fertilisation phosphatée précédemment appliqués ont été adoptés et un témoin sans rajout de phosphate (P0) a été rajouté.

Tableau III- 3: Traitements et inoculations appliquées pour le deuxième test d'inoculation

	P (80 kg/ha)	Pins (20%)	P(0)
Témoins	Témoin N120	Témoin N120	Témoin N120
	Témoin N0	Témoin N0	Témoin N0
Inoculations simples	LMR670/ P4S9/ M131/ P1S6	LMR670/ P4S9/ M131/ P1S6	LMR670/ P4S9/ M131/ P1S6
	Inoculations combinées	LMR670+ P4S9/ M131/ P1S6	LMR670+ P4S9/ M131/ P1S6

Dans le but de se rapprocher des conditions agricoles réelles, les apports du phosphate assimilable Super Triple Phosphate (STP) ont été appliqués sous forme d'engrais de fond à un taux de 80 kg/ha avant le semis. La roche phosphatée broyée a été appliquée de la même façon à un taux de 20%. Tandis que l'azote a été divisé en deux applications à un taux total de 120 kg/ha: la première avant le semis sous forme d'Urée (46%) suivie d'une deuxième application 15 jours après le semis sous forme d'Ammonitrate (33.5%). Concernant les inocula testés, des inoculations simples avec les PGPR ont été appliquées et les plantes ont reçu une fertilisation azotée. Les pots ont été placés dans une serre dans les mêmes conditions cités précédemment. L'arrosage, le prélèvement ainsi que paramètres mesurés ont été conduits de la même façon que le test précédent.

III.3 Résultats

III.3.1 Test d'antagonisme entre souches de PGPR et d'agrobacterium

La méthode de la double couche a montré qu'il n'y avait pas d'effets antagonistes des isolats d'*Agrobacterium* vis-à-vis des PGPR et vice versa. Ceci a permis l'utilisation de ces souches dans des inocula combinés pour inoculer le haricot sans aucune crainte.

III.3.2 Premier essai d'inoculation du haricot sous différents traitements de phosphate

III.3.2.1 Analyse du sol

Le sol utilisé dans cet essai avait un pH proche de la neutralité et une faible conductivité. Le niveau de P disponible et de matière organique étaient aussi faibles (Tableau III-4). Selon le triangle textural notre sol a été classé en tant que sol sableux.

Tableau III-4 : Analyse du sol utilisé dans les essais d'inoculation sous serre

pH eau	pH KCl	Conductivité (ms/cm)	Phosphore (ppm)	Matière organique(%)	Potassium (ppm)	Azote total (%)
6.72	5.12	0.283	2.97	0.63	39	0.03

III.3.2.2 Paramètres de nodulation et de croissance

A 80 kg/ha de phosphate soluble, le poids sec aérien des plantes du haricot a été significativement amélioré par l'application des doubles inoculations par rapport aux inoculations simples. Parmi toutes les inoculations appliquées, le poids sec aérien le plus élevé a été produit par la combinaison LMR674-P4S9 (0.665 g/plant) suivi par LMR670-M131 (0.536 g/plant) et LMR676-M131 (0.515 g/plant) (Tableau III-5). La combinaison LMR676-M131 a également produit le nombre de nodules le plus élevé (263 nodules/plante), contre 22 nodules/plante pour les plantes ayant reçu de la roche phosphatée (Tableau III-6). Tandis que le poids sec des nodules le plus élevé a été produit par l'inoculation simple avec LMR670 (1.517 g/plant) alors qu'aucune différence significative n'a été obtenue entre tous les poids sec des nodules produits par les autres inocula.

En considérant les deux types de traitement appliqués, une augmentation significative du nombre de nodules et du poids sec aérien a été obtenue pour certaines doubles inoculations en comparaison aux inoculations simples. Cependant, la souche LMR674 a enregistré un nombre de nodules significativement plus élevé en inoculation simple que quand elle est combinée aux PGPR et ceci quel que soit le traitement phosphaté utilisé. De plus, la nodulation des plantes inoculées (simples ou combinées) était supérieure par rapport aux témoins non inoculés et plus précisément le témoin azoté qui a montré le nombre le plus faible de nodules.

Tableau III-5. Effet de l'inoculation simple et combinée sur les différents paramètres de la croissance du haricot vert amendé avec 80 kg/ha du P soluble.

Traitement	NN/plante	PSN (g/plante)	PSA (g/plante)	PSR (g/plante)
N120	0 f	0.000 c	1.144 a	0.701 a
N0	14 e	0.046 b	0.161 fg	0.169 cd
LMR676	75 cde	0.038 b	0.273 fg	0.355 bcd
LMR670	53 def	1.517 a	0.336 def	0.271 bcd
LMR674	137 b	0.059 b	0.258 efg	0.272 bcd
M131	4 f	0.000 c	0.137 g	0.436 b
P1S6	26 def	0.013 b	0.135 g	0.410 bc
P4S9	38 def	0.016 b	0.139 g	0.356 bcd
LMR676-M131	263 a	0.115 b	0.515 bcd	0.405 bc
LMR676-P1S6	103 bc	0.034 b	0.377 cde	0.468 b
LMR676-P4S9	85 bcd	0.036 b	0.132 g	0.194 cd
LMR670-M131	64 cde	0.083 b	0.536 bc	0.500 ab
LMR670-P4S9	36 def	0.015 b	0.402 cd	0.411 bc
LMR670-P1S6	84 bcd	0.055 b	0.464 cd	0.424 b
LMR674-M131	85 bcd	0.089 b	0.460 cd	0.364 bcd
LMR674-P1S6	77 bcd	0.020 b	0.175 fg	0.152 d
LMR674-P4S9	32 def	0.021 b	0.665 b	0.369 bcd

PSA : Poids sec aérien, N120 : Témoin azoté, NN : Nombre de nodules, PSR : poids sec racinaire, N0 : Témoin non azoté. Les moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes

L'effet de l'inoculation combinée *Agrobacterium*-PGPR était beaucoup plus prononcé par rapport à l'inoculation simple. Cependant, l'effet positif induit par les PGPR sur la nodulation ainsi que sur le poids sec aérien variait selon la souche d'*Agrobacterium* associée et le type de traitement phosphaté appliqué.

Tableau III-6. Effet de l'inoculation simple et combinée sur les différents paramètres de la croissance du haricot vert fertilisé avec 20% de la roche phosphatée

Traitement	NN/plante	PSN (g/plante)	PSA (g/plante)	PSR (g/plante)
N120	2 e	0.001 e	0.665 ab	0.435 abc
N0	15 de	0.008 de	0.173 fg	0.440 abc
LMR676	15 de	0.004 de	0.287 df	0.242 def
LMR670	12de	0.001 e	0.233 def	0.289 efg
LMR674	60 b	0.036 a	0.258 def	0.291 efg
M131	63 b	0.015 cde	0.142 g	0.131 h
P1S6	28 cde	0.013 de	0.154 fg	0.204 fgh
P4S9	18 de	0.001 e	0.193 efg	0.184 fgh
LMR676-M131	22 de	0.003 de	0.242 def	0.405 abc
LMR676-P1S6	53 bc	0.012 de	0.500 c	0.402 abc
LMR676-P4S9	1 e	0.000 e	0.142 g	0.387 bcd
LMR670-M131	69 b	0.030 abc	0.527 c	0.525 a
LMR670-P1S6	122 a	0.032 ab	0.746 a	0.460 ab
LMR670-P4S9	116 a	0.000 e	0.563 bc	0.339 bcd
LMR674-M131	42 bcd	0.018 bcd	0.624 abc	0.368 cde
LMR674-P1S6	19 de	0.000 e	0.335 d	0.258 def
LMR674-P4S9	4 e	0.000 e	0.325 de	0.155 gh

PSA : Poids sec aérien, PSR : poids sec racinaire, NN : Nombre de nodules, N120 : Témoin azoté, N0 : Témoin non azoté. Les moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes

Dans le cas du traitement amendé par la roche phosphatée, la souche d'*Agrobacterium* LMR670 a induit une nodulation abondante et un poids sec aérien important lorsqu'elle était combinée avec la PGPR P1S6 (122 nodules et 0.746 g/plant) qui est équivalent au témoin azoté (0.665 g/plant). La combinaison LMR676-P4S9 quant à elle, n'a pas eu d'effet sur la croissance des plantes, poids sec aérien équivalent au témoin non azoté et ceci sous les différents traitements phosphatés (Tableau III-6).

Un effet positif de la co-inoculation du haricot avec certaines souches a été noté au niveau de la partie racinaire des plantes, en comparaison avec les inoculations simples et les témoins non inoculés. Ainsi, concernant le traitement amendé par 20% de roche phosphatée, seulement 4 combinaisons ont eu un effet phytostimulateur sur la partie racinaire en produisant le poids sec le plus élevé (LMR670-M131, LMR670-P4S9), tandis que les autres combinaisons ont réduit la masse racinaire en comparaison aux témoins non inoculés. De même, à 80 kg/ha de P soluble la combinaison LMR670-M131 a produit le poids racinaire le plus important en comparaison à LMR670-P4S9 et LMR676-P4S9 qui ont produit le poids sec le plus faible (Tableau III-5).

III.3.3 Deuxième essai d'inoculation du haricot sous différents traitements phosphatés

La comparaison des poids secs des parties aériennes obtenues des plantes cultivées sous conditions de déficience en phosphore (P0) ou amendées avec la roche phosphatée (Pins), montre qu'ils sont similaires. Il a été également observé qu'elles ont engendré pratiquement le même nombre de nodules (Tableau III-7,8). De plus, pour ces mêmes traitements les poids sec des parties aériennes des plantes du témoin positif (N120) sont presque 50% plus faibles que celui des plantes qui ont reçu du P soluble (80 kg/ha) (Tableaux III-7,8 et 9). Par ailleurs, nous avons constaté que chez les plantes des traitements déficients en P (P0), les inoculations simples n'ont pas amélioré de façon notable les paramètres de croissance des plantes. Par contre chez les plantes ayant reçu des inocula combinés, le poids sec des parties aériennes a été significativement amélioré par la combinaison LMR670-P1S6 dans les deux traitements et par les 3 combinaisons testées pour le sol ayant reçu la roche phosphatée (Tableau III-8).

Au niveau du système racinaire, il est important de noter tout d'abord que les poids secs des témoins azotés des traitements P0 et Pins sont équivalents et sont largement plus élevés que les poids sec des plantes inoculées. D'autres parts, chez les plantes inoculées quel que soit le traitement de P appliqué, on distingue une nette diminution du poids sec du système racinaire par rapport aux plantes du témoin azoté à l'exception de certaines inoculations qui ont pu entraîner une bonne prolifération du système racinaire. Notamment, dans le cas des plantes sous

déficit en phosphore (P0). L'inoculation avec LMR670-P4S9 a induit une masse racinaire chez le haricot significativement similaire à celle des plantes du témoin azoté. De plus, chez les plantes amendées avec 20% de la RP la combinaison LMR670-P4S9 a entraîné un nombre plus élevé de nodules par rapport au traitement P0 avec une nette amélioration du poids sec aérien mais qui ne diffère pas significativement des 2 autres combinaisons.

Tableau III-7 : Effet de l'inoculation simple et combinée sur les différents paramètres de la croissance du haricot vert amendé avec 20% de la roche phosphatée

Traitement	NN/plante	PSN (g/plante)	PSA (g/plante)	PSR (g/plante)
N120	12 f	0.003 d	0.869 a	0.802 a
N0	27 c	0.013 b	0.549 c	0.399 de
LMR670	36 ab	0.013 b	0.430 d	0.674 b
M131	17 e	0.004 d	0.304 e	0.322 e
P1S6	5 g	0.003 d	0.419 d	0.632 b
P4S9	22 d	0.010 c	0.454 d	0.504 c
LMR670-M131	33 b	0.019 a	0.450 d	0.392 de
LMR670-P1S6	38 a	0.010 c	0.704 b	0.505 c
LMR670-P4S9	13 f	0.003 d	0.465 d	0.465 cd

PSA : Poids sec aérien PSR : poids sec racinaire NN : Nombre de nodules N120 : Témoin azoté
N0 : Témoin non azoté. Les moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes

Tableau III-8. Effet de l'inoculation simple et combinée sur les différents paramètres de la croissance du haricot vert sans amendement phosphaté (P0).

Traitement	NN/plante	PSN (g/plant)	PSA (g/plant)	PSR (g/plant)
N120	11 f	0.003 fg	0.879 a	0.782 a
N0	28 d	0.006 de	0.508 e	0.680 b
LMR670	43 b	0.021 b	0.546 e	0.609 c
M131	6 g	0.003 ef	0.456 f	0.298 f
P1S6	10 f	0.001 fg	0.557 e	0.574 c
P4S9	5 g	0.000 g	0.616 d	0.372 e
LMR670-M131	21 e	0.006 d	0.692 b	0.497 d
LMR670-P1S6	38 c	0.011 c	0.676 bc	0.592 c
LMR670-P4S9	64 a	0.025 a	0.638 cd	0.780 a

PSA : Poids sec aérien, PSR : poids sec racinaire, NN : Nombre de nodules, N120 : Témoin azoté,
N0 : Témoin non azoté. Les moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes

Par ailleurs. Pour le traitement à 80 kg/ha de P, les plantes inoculées avec LMR670-P1S6 présentaient un poids sec aérien statistiquement équivalent à celui des plantes témoins non inoculées mais azotées. Une amélioration moins importante mais significative a été observée aussi chez les plantes inoculées par LMR670 et M131 individuellement. De plus ces inocula intéressants ont permis d'augmenter la biomasse aérienne jusqu'au 50% par rapport aux plantes correspondantes amendées par la roche phosphatée (Tableau III-9).

En revanche, certaines plantes amendées avec du P soluble (80 kg/ha) ont montré une meilleure performance au niveau racinaire par rapport aux plantes du témoin azoté. C'est le cas du mélange bactérien LMR670-P4S9 qui a produit le poids sec le plus élevé du traitement suivi par P4S9 appliqué individuellement (Tableau III-9). Cependant, certaines inoculations (simples ou mixtes) ont eu un effet négatif sur le développement racinaire des plantes en comparaison aux plantes témoins quelques soit le traitement phosphaté qu'elles aient reçu.

En ce qui concerne la nodulation des plantes fertilisées par le STP, une amélioration remarquable a été observée chez certaines plantes. Ainsi le nombre de nodules observé même chez les plantes témoins non azotés est passé de 27 nodules/plante en P0 à 61 nodules/plante. De même la nodulation a presque doublé lorsque les plantes ont été inoculées par la souche LMR670 seule produisant ainsi 81 nodules/plante au lieu de 36 et 43 nodules/plante sous les traitements P0 et P1S6 respectivement. La nodulation des plantes s'est vue améliorée également en combinant cette souche aux PGPR M131 et P4S9.

Tableau III-9. Effet de l'inoculation simple et combinée sur les différents paramètres de la croissance du haricot vert amendé avec 80 kg/ha du STP

Traitement	NN/plante	PSN (g/plante)	PSA (g/plante)	PSR (g/plante)
N120	4 f	0.000 e	1.447 a	0.828 cd
N0	61 c	0.023 d	0.853 d	0.481 f
LMR670	81 a	0.065 b	1.197 b	0.720 de
M131	11 e	0.002 e	1.198 b	0.840 cd
P1S6	5 f	0.000 e	1.031 c	0.677 e
P4S9	9 ef	0.005 e	0.857 d	1.273 b
LMR670-M131	64 c	0.091 a	0.874 d	0.632 e
LMR670-P1S6	55 d	0.048 c	1.404 a	0.877 c
LMR670-P4S9	75 b	0.092 a	0.699 e	1.531 a

PSA : Poids sec aérien, PSR : poids sec racinaire, NN : Nombre de nodules, N120 : Témoin azoté
 N0 : Témoin non azoté. Les moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes

III.4 Discussion

Sous les conditions déficientes en phosphate et en présence de la roche phosphatée comme seule source de P, la stimulation de la symbiose du haricot par les inocula qui associent LMR670 avec P1S6 s'est traduite par le développement d'une partie aérienne présentant des valeurs de poids sec aérien assez proches de celles du témoin azoté. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par des études antérieures notamment par Araújo *et al.* (2008) et Mandri *et al.* (2012) qui ont conclu qu'une carence phosphorique augmente l'activité des phosphatases dans les nodules de *P. vulgaris* et que pourrait constituer un mécanisme d'adaptation pour les légumineuses à cette contrainte en augmentant la solubilisation et la mobilisation du phosphore. Par ailleurs, les paramètres de croissance mesurés chez les plantes co-inoculées sont dans la majorité des cas supérieurs à celles recevant une inoculation simple. En effet, la stimulation de la croissance des légumineuses et plus particulièrement du haricot vert par la co-application des rhizobia et des PGPR est largement documentée (Hungria *et al.*, 2013; Korir *et al.*, 2017; Yadegari *et al.*, 2008). Néanmoins, ces inoculations peuvent dans certains cas s'avérer plutôt nocives en réduisant significativement la croissance des parties aériennes et racinaires des plantes même à des niveaux inférieurs aux témoins dépourvus d'azote. Dans nos conditions d'expérimentation, cet effet est retrouvé même avec les plantes inoculées uniquement avec les souches PGPR malgré la nodulation importante par les souches indigènes observé chez ces plantes. Lucas Garcia *et al.* (2004) suggèrent que la co-application des rhizobia et des rhizobactéries peut affecter positivement ou négativement la relation symbiotique établie avec la plante hôte selon l'isolat appliqué.

Malgré la capacité de toutes les souches inoculées à solubiliser le P et à produire différents métabolites connues pour leur effet PGP remarquables, leur effet sur la croissance du haricot sous conditions contrôlées n'était pas exclusivement positif. Ceci indiquerait que les traits PGP observés *in-vitro* ne sont pas toujours liés à une amélioration de la croissance végétale *in-vivo* ou bien que ces bactéries peuvent être bénéfiques uniquement dans leur habitat naturel où elles sont en équilibre avec les autres communautés microbiennes.

En outre, la croissance de la plante peut être affectée également par le développement de sa partie racinaire. Dans cette étude, l'inoculation a eu un effet positif sur le poids sec racinaire de certaines plantes qui était proche de celui des plantes ayant poussé dans les conditions optimales (témoin azoté). Le développement racinaire observé chez les plantes peut être attribué aux mécanismes indirects comme la production de phytohormones (Dodd *et al.*, 2010) ou la capacité des bactéries à modifier l'équilibre hormonal de la plante (Vacheron *et al.*, 2013). Or, l'une des hypothèses les

plus vraisemblables serait l'implication de l'ACC désaminase synthétisée par nos souches. vu que cette enzyme joue un rôle important dans la diminution des taux d'éthylène responsable de l'inhibition de la croissance racinaire (Glick. 2014) et permettant ainsi le développement des plantules avec des racines plus longues et donc une biomasse racinaire plus élevée (Nukui *et al.*, 2000). De même, le développement des poils absorbants permet une meilleure exploitation du sol et par conséquent l'acquisition du P en dehors de la zone d'appauvrissement du phosphore autour des racines (Föhse *et al.*, 1991).

D'autre part, il semblerait que les mêmes PGPR utilisés dans les inocula ne stimulent pas ou inhibent la nodulation du haricot lorsqu'ils sont associés à d'autres souches de rhizobia en comparaison à l'inoculation simple avec chacune de ces souches qui stimulent la production de nodules par les souches indigènes du sol. Ceci voudrait dire que l'effet des PGPR sur la formation des nodules peut varier en fonction du rhizobium qui lui est associé dans l'inoculum mixte et qu'il pourrait être aussi affecté par la disponibilité du P dans le sol. Un effet similaire un été rapporté par Korir *et al.* (2017) dans leur étude de co-inoculation de *P. vulgaris* où ils indiquent qu'une réponse variable des PGPR vis-à-vis des rhizobia associés a été observée. Par ailleurs, l'application des PGPR semblent favoriser la nodulation par les souches natives du sol qui sont généralement incapables de répondre aux besoins nutritionnels de la plantes. Les populations indigènes tirent profit de la disponibilité du P dans le sol en augmentant la densité de rhizobia dans le sol entourant la racine ce qui aurait un effet positif sur l'amélioration de la nodulation (Bashir *et al.*, 2011).

***Chapitre IV : Etude de l'effet de l'inoculation
sur la croissance et la productivité du haricot
vert au champ***

IV.1 Introduction

L'amélioration du rendement et de la production du haricot vert destinée à l'exportation est le résultat de plusieurs années de mise en œuvre et d'effort menés dans le cadre du Plan Maroc Vert. Cette stratégie adoptée par le Maroc depuis 2008 visait principalement de faire de l'agriculture un véritable moteur de croissance et de développement socio-économique du pays. Parallèlement, en 2011 le gouvernement marocain a affirmé sa volonté de dynamiser l'agriculture biologique.

Le secteur de production biologique développé par le pays est fort diversifié comportant plusieurs cultures y compris les cultures maraîchères et plus particulièrement le haricot vert. Cependant, le mode de production biologique se traduit généralement par des rendements inférieurs à ceux de l'agriculture conventionnelle. Compte tenu des enjeux majeurs de la réduction des impacts négatifs sur l'environnement auxquels fait face l'agriculture aujourd'hui, des travaux de recherche intensifs sont donc nécessaires pour mettre au point des alternatives efficaces aux intrants de synthèse.

L'une des stratégies adoptées pour l'amélioration de la santé et la durabilité des systèmes agricoles est l'utilisation des microorganismes phytobénéfiques (PGPR). Les associations entre ces bactéries et des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote a fait l'objet d'importants travaux de recherche dans le but de mettre en œuvre des solutions biologiques de fertilisation. Des études d'inoculation combinée au champ des rhizobium/PGPR ont déjà été réalisées à grande échelle pour un grand nombre de légumineuses (Malik and Sindhu, 2011; Rajendran *et al.*, 2008; Wani *et al.*, 2007) et plus particulièrement pour le haricot vert (Figueiredo *et al.*, 2008; Korir *et al.*, 2017). Cependant, les résultats obtenus sont très variables compte tenu des difficultés inhérentes à un milieu aussi complexe que le sol. En effet, les effets bénéfiques de l'inoculation bactérienne ne se manifestent que si certaines conditions sont réunies. Des interactions complexes impliquant les plantes, les conditions météorologiques, les caractéristiques du sol, les souches indigènes, les souches inoculées et plus particulièrement leur compétence et adaptation rhizosphérique peuvent affecter leur croissance et leurs performances (Vocciante *et al.*, 2022). Ce qui suggère que la sélection des combinaisons efficaces ne peut se baser seulement sur des études *in-vitro* ou sous conditions contrôlées car dans les conditions naturelles plusieurs facteurs limitant majeurs peuvent intervenir et doivent être pris en considération pour atteindre un effet optimal.

C'est dans ce contexte que les essais d'inoculation présentés dans le chapitre précédent ont été conduits sous serre. Ils ont permis de mettre en évidence certaines combinaisons de souches capables d'améliorer la croissance du haricot sous déficit en phosphore. Le présent essai a donc

été conçu en plein champ afin d'évaluer l'utilisation potentielle de la souche d'*Agrobacterium* symbiotique et/ou des deux PGPR, sélectionnées précédemment, comme inoculum susceptible d'améliorer dans les conditions du champ la croissance et le rendement du haricot vert cultivé dans des conditions déficientes en phosphore.

IV.2 Matériel et méthodes

IV.2.1 Installation de l'essai et traitements appliqués

L'essai a été conduit dans un site sans histoire d'inoculation bactérienne au niveau d'une exploitation agricole à Skhirate dans la région de Rabat-Salé-Kénitra. L'essai a été réalisé selon le dispositif Blocs Aléatoires Complets avec trois répétitions. Chaque parcelle mesurait 2 × 2 m et était divisée en 4 rangées avec un espacement inter et intra-rangée de 0.5 m et 0.2 m respectivement. La variété commerciale de haricot *Tania* a été utilisée. Quatre binages ont été réalisés manuellement à l'aide d'une binette afin de maintenir la culture exempte de mauvaises herbes. Deux traitements phosphatés ont été testés, le premier avec 80 kg/ha du P sous forme de superphosphate simple et le deuxième sans fertilisation phosphatée (Tableau IV- 2) En plus du phosphate, du sulfate de potassium a été ajouté à raison de 80 kg/ha de potassium (K). Les traitements fertilisés à l'azote ont reçu l'engrais azoté à raison de 120 kg/ha d'azote sous forme d'urée (46% N₂) divisé en trois fractions identiques: à la plantation, 20 jours après l'ensemencement et le restant à la floraison.

Tableau IV-1: Traitements appliqués au champ

	P (80kg/ha)	P (0)
Témoins	Témoin N120	Témoin N120
	Témoin N0	Témoin N0
Inoculations simples	LMR670	M131
		P1S6
		LMR670+ M131
Inoculations combinées	-	LMR670+ P1S6

N120: Fertilisation azoté à un taux de 120 kg/ha de N ; N0: Aucun ajout de N ; P: Fertilisation avec du super simple phosphate à un taux de 80 kg/ha de P ; P0: Aucun ajout de P.

IV.2.2 Préparation des inocula et inoculation des graines

Les souches d'*A. radiobacter* LMR670 et des PGPR *Bacillus* sp. M131 et *Enterobacter* sp. P1S6 ont été cultivées sur milieu YEM liquide dans les mêmes conditions citées précédemment. Elles ont été récoltées en fin de phase exponentielle. Des inocula à base de tourbe ont été utilisés dans cet essai. Des cultures bactériennes contenant 10⁸ UFC/mL ont été injectées dans 100 g de tourbe stérilisée préemballée et incubées pendant 6 jours à 30°C. La teneur en humidité finale des inocula

à base de tourbe a été ajustée à 30%. Au moment du semi les inocula ont été mélangés avec les graines à raison de 10^9 cellules/graine.

Les parcelles prévues pour les inoculations simples avec les souches PGPR M131 et P1S6 ont reçu de l'engrais azoté car, contrairement aux souches symbiotiques, les PGPR utilisées sont incapables de fixer l'azote atmosphérique, alors que celles prévues pour l'inoculation simple avec la souche LMR670 ont reçu de l'engrais phosphaté pour assurer une performance symbiotique optimale sans facteur limitant.

IV.2.3 Récolte et mesure des paramètres mesurés

Les évaluations au champ ont eu lieu à la floraison et un échantillonnage des plantes a été effectué dans un carré de 1 m × 1 m de chaque parcelle afin de mesurer la nodulation des plantes, leurs poids sec aérien et racinaire. Pour déterminer le rendement en gousse, les plantes ont été récoltées manuellement à maturité physiologique 2.5 mois après le semis, suivies d'une seconde récolte une semaine plus tard. Le rendement en gousse indiqué est la somme des deux récoltes.

IV.2.4 Analyses statistiques

Les données ont été vérifiées pour la normalité des erreurs et l'homogénéité des variances avant les analyses statistiques. Une ANOVA unidirectionnelle a été utilisée pour déterminer les différences entre les traitements. Lorsque les effets du traitement étaient significatifs au niveau de probabilité de 0.05, des comparaisons de moyennes ont été effectuées à l'aide de Tukey LSD comme test de comparaisons multiples avec un seuil alpha de 0.05 ($\alpha = 0.05$) à l'aide du logiciel XLSTAT.

IV.3 Résultats

L'essai au champ pour l'évaluation dans des conditions naturelles du potentiel des souches bactériennes sélectionnées précédemment a été mené dans la région de Skhirate, sur des parcelles dont le sol est peu fertile caractérisé par une faible teneur en azote et en phosphore. Les caractéristiques du sol étaient les suivantes: pH (H₂O) 7.3, pH (KCl) 6.62, Matière organique 0.89%, N total 0.03%, P total 0.14 mg/kg, K total 3.3 mg/kg et conductivité électrique 0.14 ms/Cm.

IV.3.1 Effet de l'inoculation sur la croissance et la nodulation du haricot au champ

L'inoculation bactérienne a généralement amélioré la nodulation du haricot vert par rapport aux témoins non inoculés (Tableau IV-2). L'inoculation des plantes du haricot avec M131 et LMR670 individuellement a abouti à une amélioration significative de tous les paramètres de croissance

mesurés par rapport au témoin azoté non inoculé. La combinaison de ces deux souches a également entraînée une augmentation du poids sec aérien significativement équivalamment à celui obtenu chez les plantes du témoin azoté. Tandis que la combinaison de P1S6 avec LMR670 a montré un effet négatif aussi bien sur les paramètres de croissance que sur le rendement total en gousse.

La biomasse racinaire a été également améliorée par inoculation des plantes du haricot. Ceci est observée chez les plantes inoculée par les souches LMR 670 et M131 et leur combinaison qui ont entraîné un pois sec racinaire dépassant celui des plantes du témoin azoté. Cet effet n'était pas observé chez les plantes inoculées par P1S6 encore moins dans le cas de P1S6 en combinaison avec LMR670, qui a entraîné une réduction drastique de la biomasse racinaire.

En termes de nombre de nodules, l'inoculation a significativement amélioré la nodulation par rapport aux témoins non inoculés. Les nombre de nodules le plus élevé a été observé chez les plantes inoculées par la souche d'*Agrobacterium* LMR670 (33 nodules/plante) suivi par sa combinaison avec *Bacillus* sp. M131 (23 nodules/plante) et l'inoculation par M131 seule (18 nodules/plante). Il est à noter que les différences entre les nombres de nodules produits par ces trois inocula ne sont pas significatives.

Tableau IV-2: Effet de l'inoculation simple et combinée sur les différents paramètres de la croissance du haricot vert inoculé au champ.

Traitements	NN (nod/plante)	PSN (g/plante)	PSA (g/plante)	PSR (g/plante)	Rdt (t/ha)	Rdt en % augmt
N120/P80	2d	0.047bcd	52.757bc	5.803bc	12.24abc	100
N0/P80	2d	0.021d	46.693cd	1.970f	12.63abc	82
N120/P0	5cd	0.09abc	41.487cd	4.77cde	10.02cd	103
N0/P0	3cd	0.023d	37.48d	3.653def	8.93d	73
LMR670	33a	0.095ab	69.78a	7.653ab	13.07ab	107
M131	18abc	0.042cd	64.057ab	9.283a	14.02a	115
P1S6	4cd	0.002d	52.94bc	5.203cd	12.35abc	101
LMR670/M131	23ab	0.128a	52.207bc	7.32ab	11.43abc	93
LMR670/P1S6	16bc	0.083abc	40.62cd	3.063ef	10.70cd	87

NN : Nombre de nodules ; PSN : Pois sec nodulaire ; PSA : Pois sec aérien ; PSR : Pois sec racinaire ; Rdt : Rendement total ; Rdt en % augmt : rendement en % d'augmentation.

Les moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes

IV.3.2 Effet de l'inoculation sur le rendement du haricot

En plus de son effet positif sur tous les paramètres de croissance mentionnés précédemment, l'inoculation des plantes du haricot avec la souche M131 a permis d'avoir une amélioration importante du rendement qui a atteint la valeur la plus élevée (14.02 t/ha). Des résultats similaires ont également été observés chez des plantes inoculées avec la souche LMR 670 seule et fertilisées avec 80 kg/ha de P. Soit un pourcentage d'augmentation de 1.15 et 1.07% obtenu par les

inoculations simples de M131 et LMR670 respectivement suivie de l'inoculation simple par P1S6 avec 1.01%.

Les plantes inoculées avec LMR 670/P1S6 ont montré une faible production par rapport aux autres traitements d'inoculation mais les différences ne sont pas significatives à l'exception de l'inoculation simple avec M131 qui a produit 14.02 t/ha de gousses de haricot vert. Ce niveau est même supérieur au traitement témoin dont les plantes ont reçu les doses optimales des engrais N et P. Les valeurs de rendement les plus basses ont été obtenues par les plantes témoins non inoculées sans amendement en phosphore ou en azote tandis qu'aucune différence significative n'a été observée entre les autres traitements (Tableau IV-2).

IV.4 Discussion

Pour répondre à l'objectif ultime fixé à cette thèse, un essai d'inoculation du haricot vert a été conduit au champ sous deux régimes phosphatés. La souche symbiotique retenue pour cet essai est affiliée génétiquement à *A. radiobacter*. Elle a été sélectionnée en se basant sur de nombreux caractères pertinents, tels que sa tolérance au stress salin et aux variations du pH, son efficacité symbiotique avec le haricot, ses activités PGP *in-vitro* puis son effet sur la croissance du haricot cultivé sous serre dans un sol pauvre amendé avec différentes formes de sources de P. De même, nous avons testé deux souches PGPR appartenant aux genres *Enterobacter* et de *Bacillus* qui ont été préalablement sélectionnées pour leurs activités PGP *in-vitro*. Ces PGPR ont été également confirmées *in-planta* avec le haricot cultivé sous serre avec différents types d'amendements phosphatés. Dans ces conditions les deux PGPR ont montré une bonne complémentarité en inoculation mixte avec la souche d'*Agrobacterium* sélectionnée.

Dans les conditions du champ de Skhirate, l'inoculation simple par la souche d'*Agrobacterium* (LMR670) ou par les souches PGPR (M131 et P1S6) a considérablement augmenté le rendement du haricot vert qui a atteint des niveaux comparables à celui obtenu chez les plantes des parcelles témoins qui ont reçu l'optimum de fertilisation azotée et phosphorée. Cependant vu la faible fertilité du sol, il était nécessaire de corriger les déficiences en appliquant de l'azote aux plantes inoculées par les souches de PGPR et du phosphore à celles inoculées avec LMR670. L'inoculation du haricot avec cette dernière souche a été performante dans tous les tests effectués en serre et au champ. Cette reproductibilité et stabilité symbiotique a été aussi rapportée par Youseif *et al.* (2017) chez des souches de *A. tumefaciens* nodulant les racines de la féverole dans des expériences sous serre et au champ. Nous pouvons alors affirmer à partir de ces résultats que la souche LMR670 d'*Agrobacterium* est une souche efficace capable d'assurer la croissance du haricot vert et un rendement optimal dans un sol pauvre en azote.

Par ailleurs, il est particulièrement intéressant de noter que la souche PGPR M131 a entraîné le rendement le plus élevé dans tout l'essai et qui est même supérieur à celui obtenu chez les plantes témoins fertilisés en N et P. Étant donné que le sol du champ est très pauvre en phosphore ($P < 6$ mg/kg), il semble que la capacité de M131 à solubiliser le phosphate inorganique démontrée lors de tests *in-vitro* (54.75 $\mu\text{g/mL}$) était suffisante pour surmonter la carence en P du sol et favoriser ainsi la croissance des plantes. En effet, les effets positifs des inoculations par de bactéries solubilisant le phosphate sur la nutrition des plantes sont clairement démontrés dans un grand nombre de rapports (Guiñazú *et al.*, 2010; Qureshi *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2013).

De plus, les plantes inoculées avec M131 présentaient une biomasse racinaire importante. Par conséquent, l'amélioration de la croissance du haricot vert observée peut également être liée aux effets positifs de l'inoculation sur la croissance racinaire qui est exprimée par leurs poids sec par rapport aux témoins non inoculés. Il est généralement admis que les bactéries PGP stimulent la croissance des plantes grâce à différents mécanismes conduisant au développement des racines (Lugtenberg and Kamilova, 2009). En effet, l'augmentation de la densité racinaire signifie la disponibilité d'une plus grande surface pour l'absorption d'eau et de minéraux ainsi qu'une meilleure interaction entre les bactéries inoculées et les racines des plantes conduisant à une nodulation plus importante et par conséquent à des rendements plus élevés. Un grand nombre de preuves expérimentales a été rapporté mettant en évidence le rôle central des auxines dans l'orchestration de presque tous les aspects de la croissance des plantes y compris l'architecture des racines et leur développement (Overvoorde *et al.*, 2010). Cet effet phytosimulateur est non seulement exercé dans des conditions de croissance optimales, mais il a été également observé qu'une signalisation auxinique est également impliquée dans la réponse adaptative de l'architecture du système racinaire en cas de carence en phosphate (Al-Ghazi *et al.*, 2003; Pérez-Torres *et al.*, 2008). Par ailleurs, Bhosale *et al.* (2018) ont signalé dans leur étude que les racines exposées à de faibles concentrations externes en P utilisaient l'auxine pour augmenter l'absorption de P en favorisant l'élongation des poils absorbants. Sur la base de ces résultats, nous pouvons affirmer donc que l'inoculation avec des bactéries productrices d'AIA pourrait être efficace dans la promotion de la croissance des plantes dans des conditions restrictives de l'environnement.

De plus, Borch *et al.* (1999) en étudiant l'implication de l'éthylène dans les réponses de l'architecture racinaire à la disponibilité de phosphore chez le haricot vert, ont suggéré qu'une production accrue d'éthylène chez des plantes poussant dans des conditions déficientes en phosphore pourrait être responsable de la réponse des racines dans des conditions limitantes. De ce fait, les souches PGPR productrices d'ACC désaminase pourraient être efficaces dans la réduction des niveaux d'éthylène en cas de stress chez les plantes. Il est donc possible que cette

enzyme contribue à l'amélioration de la biomasse racinaire observée dans notre essai chez les plantes de haricot vert inoculées. D'autant plus, de nombreuses études ont montré des corrélations positives entre l'élongation des racines et l'activité ACC-désaminase chez les PGPR utilisées comme inoculum (Mayak *et al.*, 2004; Shaharoon *et al.*, 2006).

Outre les caractères PGP décrits ci-dessus, les souches M131 et P1S6 étaient également capables de produire des sidérophores. Ces molécules sont connues pour leurs bénéfices pour la croissance des plantes car elles peuvent améliorer la biodisponibilité des nutriments notamment en améliorant l'acquisition du fer et, par conséquent, une meilleure stabilité de la rhizosphère ainsi qu'une nutrition équilibrée des plantes (Bar-Ness *et al.*, 1992; Radzki *et al.*, 2013). D'autre part, plusieurs études ont montré que les bactéries produisant des sidérophores étaient également efficaces dans la solubilisation du phosphate (ex : Gupta *et al.*, 2012). Une comparaison des mutants produisant des sidérophores altérés au niveau de la production de sidérophores avec les souches sauvages a révélé que les mutants solubilaient 10 fois moins de P que les souches sauvages (Ghosh *et al.*, 2015). Il est alors important de prendre en considération le rôle potentiel des sidérophores dans l'amélioration de la disponibilité de P. Ainsi, les effets positifs observés sur la croissance du haricot vert inoculés dans des conditions limitantes en P peuvent également être attribués à la capacité de ces PGPR à libérer des sidérophores.

Il est à noter que l'interaction entre les souches PGPR aux activités multiples et les plantes est très complexe. Il est difficile de distinguer l'impact de chaque activité bactérienne en particulier dans des conditions de sol où les interactions entre les carences en nutriments et les stress abiotiques sont multiples et très compliquées. De plus, l'incohérence des performances d'agents bactériens sélectionnés au champ est un problème majeur qui ralentit l'utilisation des biofertilisants bactériens à grande échelle dans l'agriculture dans la plupart des pays (Parnell *et al.*, 2016). Par exemple, l'efficacité des souches introduites dans les expériences en serre ne s'est pas toujours traduite par un succès au champ comme c'est le cas dans notre étude de la souche P1S6 co-inoculée avec LMR670 qui a amélioré les paramètres de croissance du haricot vert en conditions contrôlées mais pas au champ. Les performances des inocula bactériens peuvent être instables et dépendent de divers facteurs environnementaux. Dans de nombreux cas, l'inoculation combinée ne se traduit pas par un effet bénéfique sur la symbiose et sur la croissance de la plante car il s'agit de processus complexes mettant en œuvre de nombreux facteurs pouvant affecter les réponses de la plante. Certains co-inocula peuvent agir de manière synergique lorsque les souches de PGPR améliorent les performances des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote tandis que d'autres peuvent avoir un effet négatif sur l'efficacité symbiotique globale (Lucas Garcia *et al.*, 2004). A titre d'exemple, Korir *et al.* (2017) ont observé des réponses variables des plantes du haricot vert à la co-inoculation

avec *Rhizobium* et deux souches différentes de PGPR en termes de formation de nodules et de poids sec aérien. Ce manque d'efficacité peut être causé par divers facteurs, notamment la compétitivité entre les bactéries appliquées. Même si aucun antagonisme n'a été observé *in-vitro* entre toutes les souches testées, il est possible que des espèces bactériennes soient en concurrence avec les bactéries voisines pour des nutriments rares et de l'espace pouvant ainsi influencer profondément sur le résultat de leur interaction (Hibbing *et al.*, 2010). L'interaction entre les espèces microbiennes peut également dépendre de la plante hôte et notamment de son génotype.

La pratique consistant à inoculer des légumineuses avec des souches autochtones est une bonne stratégie pour optimiser les performances agronomiques des biofertilisants. Ces souches présentent souvent des performances de fixation d'azote supérieures au champ en raison de leurs adaptations génétiques à l'environnement local. Il a été récemment démontré que les plantes de haricot inoculées avec une souche autochtone LCS0306 fixaient significativement plus d'azote que celles ensemencées avec les souches allochtones (Pastor-Bueis *et al.*, 2019). Cette performance symbiotique supérieure de la souche autochtone peut être attribuée à sa polyvalence génomique car elle abrite un large éventail de gènes contribuant à ses aptitudes et à sa compétitivité.

Dans la présente étude, les souches LMR 670, M131 et leur combinaison ont montré un effet phytostimulateur important sur les différents paramètres de croissance des plantes du haricot ainsi que sur le rendement en gousse lorsqu'ils étaient appliqués dans des conditions de champs. Cependant, avant de préconiser la généralisation de l'utilisation des biofertilisants bactériens en tant que pratique agricole rentable et respectueuse de l'environnement, des expériences supplémentaires au champ dans les différentes zones de production du haricot avec différentes conditions de sol et de climat sont nécessaires pour confirmer les interactions positives observées dans notre étude entre les inocula et les plantes.

Conclusion générale et perspectives

La présente étude a été réalisée dans le but de sélectionner les meilleures souches de rhizobia et de PGPR capables de promouvoir la croissance du haricot vert dans des conditions de stress minéral et qui pourraient être proposées comme une alternative à l'utilisation des engrais chimiques. Pour ce faire, différents volets ont été abordés. La première partie a consisté à isoler et caractériser les souches natives des nodules de haricot poussant dans différentes zones de production du haricot au Maroc. Le potentiel phytobénéfique de ces souches a été étudié *in-vitro* en mesurant différentes activités biologiques potentiellement promotrices de la croissance des plantes. Une deuxième partie consacrée à l'évaluation sous serre de l'effet de différents inocula bactériens composés de diverses souches d'*Agrobacterium* et/ou de PGPR apportées au haricot cultivé dans un sol pauvre sous différents amendements phosphatés. Finalement, un essai au champ a été mené pour évaluer l'utilisation potentielle des souches sélectionnées comme inoculum simple ou combiné (*Agrobacterium* et/ou PGPR) susceptibles d'améliorer la productivité et le rendement du haricot vert.

Les sols prospectés dans le cadre de cette étude ont montré une faible nodulation chez la majorité des plantes du haricot ou même absente dans la plupart des sites prospectés sauf dans la région du Gharb et de Tadla Azilal. La collection de bactéries isolées des nodules du haricot est constituée de 133 isolats locaux obtenus des nodules provenant de régions différentes et éloignées du Maroc collectés directement du champ. L'étude physiologique de ces souches a concerné les caractères les plus pertinents pour la culture du haricot notamment la tolérance aux fortes concentrations en sel et aux variations de pH, en plus de quelques activités promotrices de la croissance des plantes.

Les résultats obtenus ont montré que les bactéries testées possédaient une tolérance variable à la salinité et au pH du milieu. Ces bactéries ont aussi montré différentes activités PGP. Certaines possèdent des capacités remarquables aussi bien phytostimulatrices, grâce à leur production assez importante d'auxine, que biofertilisantes en solubilisant le phosphate inorganique. Tandis que d'autres pourraient être utilisées comme agent de biocontrôle vue leur capacité à produire des sidérophores. Ces souches constituent donc de bons candidats pour la formulation d'inoculum pour le haricot cultivé dans des sols soumis à divers stress environnementaux.

L'étude de l'infectivité et de l'efficacité des isolats choisis en se basant sur les résultats précédents a permis de mettre en évidence l'existence de souches symbiotiques possédant une efficacité de fixation d'azote variable. Certaines souches se sont avérées incapables de former des nodules sur les racines du haricot, elles sont qualifiées de bactéries endophytes des nodules.

L'identification moléculaire par séquençage de l'ADNr16S des souches capables de noduler le haricot vert et de fixer l'azote a permis de montrer l'existence de souches d'*Agrobacterium* dans les sols marocains capables de noduler le haricot efficacement. Ce résultat montre que la diversité des bactéries fixatrices d'azote en symbiose avec le haricot vert est beaucoup plus grande que ce qui est connu jusqu'à présent. Il est cependant nécessaire de mener une exploration plus large de la diversité bactérienne des souches capables de noduler le haricot et effectuer d'autres analyses pour approfondir les connaissances sur cette symbiose.

Les résultats des expérimentations d'inoculation simple ou combinée menées sous serre ont révélé une bonne performance de certaines combinaisons de souches, mais leurs performances dépendent largement du traitement en phosphate appliqué. Il a été également constaté que les activités PGP observées *in-vitro* chez les souches n'étaient pas directement corrélées avec leurs performances en interaction avec les plantes de haricot cultivées sous serre. Ceci dit, que les traits PGP observés *in-vitro* ne sont pas directement liés à une amélioration de la croissance végétale ou bien que ces bactéries peuvent être bénéfiques uniquement dans leur habitat naturel où elles sont en équilibre avec les autres communautés microbiennes.

En d'autre part, certains isolats ont montré un degré de stimulation élevée de la croissance des plantes du haricot dans les conditions de nos expérimentations. A l'image des souches d'*Agrobacterium* LMR670 et *Bacillus* sp. M131 qui ont démontré une performance importante en améliorant la biomasse et le rendement du haricot dans les tests effectués y compris au champ. Cependant, l'efficacité des souches introduites dans les expériences en serre n'a pas été totalement traduite par un succès au champ comme c'est le cas de la souche d'*Enterobacter* sp. P1S6 co-inoculée avec l'*Agrobacterium* LMR670 qui a amélioré les paramètres de croissance du haricot vert en conditions contrôlées mais pas au champ. Ainsi, la réponse du haricot vert aux inocula bactériens varie considérablement en fonction des conditions expérimentales, de la composition de l'inoculum et du potentiel des souches.

Nos résultats permettent donc de proposer d'inclure dans les pratiques agronomiques les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote et/ou de bactéries solubilisatrices de phosphate autant que biofertilisants capables de subvenir aux besoins d'azote et de phosphate du haricot. Ceci permettrait non seulement d'alléger les coûts de production exacerbés par l'utilisation des engrais chimiques, mais aussi d'améliorer le statut phosphaté et azoté du sol et de préserver les écosystèmes de la pollution par ces deux éléments, contribuant ainsi à l'instauration d'une agriculture productive, durable et plus écologique.

Au terme de ce travail, plusieurs pistes de recherche et de valorisation sont envisageables :

- Séquençage global du génome des souches d'*Agrobacterium* identifiées dans cette étude.
- Marquage des souches d'*Agrobacterium* avec la GFP (Green Fluorescent Protein) pour visualiser et mieux connaître le processus d'infection et d'organogénèse des nodules.
- Développement de consortia de bactéries efficaces pour leur utilisation comme inoculum pour l'amélioration de la productivité agricole du haricot dans différentes conditions pédoclimatiques.
- Mener des essais multilocaux afin d'assurer que les résultats positifs obtenus dans les conditions particulières d'un site se reproduiront dans les conditions géographiques variées des différentes zones.

Tous ces aspects doivent être soigneusement étudiés pour le succès de cette approche biotechnologique prometteuse et pour généraliser l'utilisation des biofertilisants bactériens en tant que pratique agricole respectueuse de l'environnement.

Références bibliographiques

- Abdelmoteleb, A., and Gonzalez-Mendoza, D. (2020). Isolation and identification of phosphate solubilizing *Bacillus* spp. from *Tamarix ramosissima* rhizosphere and their effect on growth of *Phaseolus vulgaris* under salinity stress. *Geomicrobiol. J.* 37, 901–908. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1795321>.
- Abdelmoumen, H., Filali-Maltouf, A., Neyra, M., Belabed, A., and El Idrissi, M.M. (1999). Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *J. Appl. Microbiol.* 86, 889–898. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00727.x>.
- Abdul Qados, A.M.S. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 10, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2010.06.002>.
- Aguilar, A., Peralta, H., Mora, Y., Díaz, R., Vargas-Lagunas, C., Girard, L., and Mora, J. (2016). Genomic comparison of *Agrobacterium pusense* strains isolated from bean nodules. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01720>.
- Ahmed, E., and Holmström, S.J.M. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb. Biotechnol.* 7, 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>.
- Alam, M.A., Juraimi, A.S., Rafii, M.Y., Abdul Hamid, A., and Aslani, F. (2014). Screening of purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions for high salt tolerance. *Sci. World J.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/627916>.
- Albrecht-Gary, A.M., and Crumbliss, A.L. (1998). Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. *Met. Ions Biol. Syst.* 35, 239–327. .
- Al-Ghazi, Y., Muller, B., Pinloche, S., Tranbarger, T.J., Nacry, P., Rossignol, M., Tardieu, F., and Doumas, P. (2003). Temporal responses of *Arabidopsis* root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant Cell Environ.* 26, 1053–1066. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01030.x>.
- Alori, E.T., Glick, B.R., and Babalola, O.O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front. Microbiol.* 8, 971. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>.
- Amarger, N., Macheret, V., and Laguerre, G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 996–1006. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-996>.
- Araújo, A.P., Plassard, C., and Drevon, J.J. (2008). Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. *Plant Soil* 312, 129. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9595-3>.
- Aserse, A.A., Woyke, T., Kyrpides, N.C., Whitman, W.B., and Lindström, K. (2017). Draft genome sequence of type strain HBR26T and description of *Rhizobium aethiopicum* sp. nov. *Stand. Genomic Sci.* 12. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0220-z>.
- Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., and Smith, D.L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.* 9. .
- Bargaz, A., Lyamlouli, K., Chtouki, M., Zeroual, Y., and Dhiba, D. (2018). Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01606>.
- Bar-Ness, E., Hadar, Y., Chen, Y., Shanzer, A., and Libman, J. (1992). Iron uptake by plants from microbial siderophores. *Plant Physiol.* 99, 1329–1335. .
- Bashir, K. (PMAS A.A.U.), Ali, S. (PMAS A.A.U.), and Umair, A. (PMAS A.A.U.) (2011). Effect of different phosphorus levels on xylem SAP components and their correlation with growth variables of mash bean. *Sarhad J. Agric. Pak.*
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., and Passaglia, L.M.P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35, 1044–1051. .
- Benzecri (1992). *Correspondence Analysis Handbook* (CRC Press).
- Beringer, J.E., Bisseling, T.A., and LaRue, T.A. (1988). Improving symbiotic nitrogen fixation through the genetic manipulation of *Rhizobium* and legume host plants. In *World Crops: Cool Season Food Legumes*, (Springer, Dordrecht), pp. 691–702.
- Bernal, G., and Graham, P.H. (2001). Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Can. J. Microbiol.* 47, 526–534. <https://doi.org/10.1139/w01-037>.

- Bhosale, R., Giri, J., Pandey, B.K., Giehl, R.F.H., Hartmann, A., Traini, R., Truskina, J., Leftley, N., Hanlon, M., Swarup, K., et al. (2018). A mechanistic framework for auxin dependent *Arabidopsis* root hair elongation to low external phosphate. *Nat. Commun.* *9*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03851-3>.
- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P.S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G., et al. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E788–E796. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108973109>.
- Blair, M.W., González, L.F., Kimani, P.M., and Butare, L. (2010). Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Central Africa. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* *121*, 237–248. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1305-x>.
- Bolan, N.S., White, R.E., and Hedley, M.J. (1990). A review of the use of phosphate rocks as fertilizers for direct application in Australia and New Zealand. *Aust. J. Exp. Agric.* *30*, 297–313. <https://doi.org/10.1071/ea9900297>.
- Borch, K., Bouma, T.J., Lynch, J.P., and Brown, K.M. (1999). Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. *Plant Cell Environ.* *22*, 425–431. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00405.x>.
- Bordeleau, L.M., and Prévost, D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil* *161*, 115–125. <https://doi.org/10.1007/BF02183092>.
- Boukhatem, Z.F., Merabet, C., Bekki, A., Sekkour, S., Domergue, O., Dupponois, R., and Galiana, A. (2016). Nodular bacterial endophyte diversity associated with native *Acacia* spp. in desert region of Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.* *10*, 634–645. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7678>.
- Brígido, C., Alexandre, A., and Oliveira, S. (2012). Transcriptional analysis of major chaperone genes in salt-tolerant and salt-sensitive mesorhizobia. *Microbiol. Res.* *167*, 623–629. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.01.006>.
- Broughton, W.J., and Dilworth, M.J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.* *125*, 1075–1080. .
- Broughton, W.J., Hernandez, G., Blair, M.W., Beebe, S.E., Gepts, P.L., and Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)- model food legumes. *Plant Soil*.
- Cappuccino, J.C., and Sherman, N. (1992). *Microbiology: A laboratory manual*, Wesley Pub. Co N. Y.
- Chauhan, A., Saini, R., and Sharma, J.C. (2022). Plant growth promoting rhizobacteria and their biological properties for soil enrichment and growth promotion. *J. Plant Nutr.* *45*, 273–299. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1952221>.
- Chen, W.P., and Kuo, T.T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* *21*, 2260. .
- Chen, W.M., Lee, T.M., Lan, C.C., and Cheng, C.P. (2000). Characterization of halotolerant rhizobia isolated from root nodules of *Canavalia rosea* from seaside areas. *FEMS Microbiol.Ecol.* *34*, 9–16.
- Chen, J., Liu, Y.-Q., Yan, X.-W., Wei, G.-H., Zhang, J.-H., and Fang, L.-C. (2018). Rhizobium inoculation enhances copper tolerance by affecting copper uptake and regulating the ascorbate-glutathione cycle and phytochelatin biosynthesis-related gene expression in *Medicago sativa* seedlings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *162*, 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.001>.
- Chen, W.-M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Béna, G., and Boivin-Masson, C. (2003). Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* *185*, 7266–7272.
- Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* *20*, 1790–1799. <https://doi.org/10.1101/gad.1415106>.
- Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y. (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *19*, 2430–2439. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.053009>.
- Collavino, M.M., Sansberro, P.A., Mroginski, L.A., and Aguilar, O.M. (2010). Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol. Fertil. Soils* *46*, 727–738. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0480-x>.

- Cordeiro, A.B., Ribeiro, R.A., Helene, L.C.F., and Hungria, M. (2017). *Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N₂-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *67*, 3937–3945. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002225>.
- Cummings, S.P., Gyaneshwar, P., Vinuesa, P., Farruggia, F.T., Andrews, M., Humphry, D., Elliott, G.N., Nelson, A., Orr, C., Pettitt, D., et al. (2009). Nodulation of *Sesbania* species by *Rhizobium*(*Agrobacterium*) strain IRBG74 and other rhizobia. *Environ. Microbiol.* *11*, 2510–2525. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01975.x>.
- Dakora, F.D. (2012). Root-nodule bacteria isolated from native *Amphithalea ericifolia* and four indigenous *Aspalathus* species from the acidic soils of the South African fynbos are tolerant to very low pH. *Afr. J. Biotechnol.* *11*, 3766–3772. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3377>.
- Damodaran, T., Sah, V., Rai, R.B., Sharma, D.K., V.K.Mishra, Jha, S.K., and Kannan, R. (2013). Isolation of salt tolerant endophytic and rhizospheric bacteria by natural selection and screening for promising plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and growth vigour in tomato under sodic environment. *Afr. J. Microbiol. Res.* *7*, 5082–5089. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6003>.
- Dodd, I. c., Zinovkina, N. y., Safronova, V. i., and Belimov, A. a. (2010). Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Ann. Appl. Biol.* *157*, 361–379. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00439>.
- Duan, C., Mei, Y., Wang, Q., Wang, Y., Li, Q., Hong, M., Hu, S., Li, S., and Fang, L. (2022). *Rhizobium* inoculation enhances the resistance of Alfalfa and microbial characteristics in copper-contaminated soil. *microbiology* 781831. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.781831>.
- Dworkin, M., and Foster, J.W. (1958). Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.* *75*, 592–603. .
- Efstathiadou, E., Ntatsi, G., Savvas, D., and Tampakaki, A.P. (2021). Genetic characterization at the species and symbiovar level of indigenous rhizobial isolates nodulating *Phaseolus vulgaris* in Greece. *Sci. Rep.* *11*. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88051-8>.
- Ehmann, A. (1977). The van urk-Salkowski reagent--a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *J. Chromatogr.* *132*, 1–10.
- El-Akhal, M.R., Rincón, A., Coba de la Peña, T., Lucas, M.M., El Mourabit, N., Barrijal, S., and Pueyo, J.J. (2013). Effects of salt stress and rhizobial inoculation on growth and nitrogen fixation of three peanut cultivars. *Plant Biol.* *15*, 415–421. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00634.x>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Statistical Database. [Rome] :FAO, 1997.
- Faghire, M., Mandri, B., Oufdou, K., Bargaz, A., Ghoulam, C., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E., and Peix, A. (2012). Identification at the species and symbiovar levels of strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in saline soils of the Marrakech region (Morocco) and analysis of the *otsA* gene putatively involved in osmotolerance. *Syst. Appl. Microbiol.* *35*, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.02.003>.
- Farid, M., and Navabi, A. (2015). N₂ fixation ability of different dry bean genotypes. *Can. J. Plant Sci.* *95*, 1243–1257. <https://doi.org/10.4141/cjps-2015-084>.
- Fatnassi, I.C., Chiboub, M., Saadani, O., Jebara, M., and Jebara, S.H. (2015). Impact of dual inoculation with *Rhizobium* and PGPR on growth and antioxidant status of *Vicia faba* L. under copper stress. *C. R. Biol.* *338*, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2015.02.001>.
- Ferguson, B.J., Lin, M.-H., and Gresshoff, P.M. (2013). Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions. *Plant Signal. Behav.* *8*. <https://doi.org/10.4161/psb.23426>.
- Ferri, A., Lluch, C., and Ocaña, A. (2000). Effect of salt stress on carbon metabolism and bacteroid respiration in root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biol.* *2*, 396–402. <https://doi.org/10.1055/s-2000-5956>.
- Figueiredo, M.V.B., Burity, H.A., Martínez, C.R., and Chanway, C.P. (2008). Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.* *40*, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.04.005>.
- Föhse, D., Claassen, N., and Jungk, A. (1991). Phosphorus efficiency of plants. *Plant Soil* *132*, 261–272. <https://doi.org/10.1007/BF00010407>.
- Frossard, E., Condrón, L.M., Oberson, A., Sinaj, S., and Fardeau, J.C. (2000). Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *J. Environ. Qual.* *29*, 15–23. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900010003x>.
- Gal, S.W. and Choi, Y.J. (2003). Isolation and characterization of salt tolerance rhizobia from Acacia root nodules. *Agric. Chem. Biotechnol.*

- García-Fraile, P., Mulas-García, D., Peix, A., Rivas, R., González-Andrés, F., and Velázquez, E. (2010). *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two nodC alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeographical and evolutionary implications. *Can. J. Microbiol.* *56*, 657–666. <https://doi.org/10.1139/w10-048>.
- Garg, N., and Singla, R. (2004). Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. *Braz. J. Plant Physiol.* *16*, 137–146. <https://doi.org/10.1590/S167704202004000300003>.
- Ghosh, P., Rathinasabapathi, B., and Ma, L.Q. (2015). Phosphorus solubilization and plant growth enhancement by arsenic-resistant bacteria. *Chemosphere* *134*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.048>.
- Glick, B.R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* *2012*, e963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>.
- Glick, B.R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* *169*, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>.
- Goswami, M., and Deka, S. (2020). Isolation of a novel rhizobacteria having multiple plant growth promoting traits and antifungal activity against certain phytopathogens. *Microbiol. Res.* *240*, 126516. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126516>.
- Graham, P.H., and Vance, C.P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* *131*, 872–877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>.
- Grover, M., Bodhankar, S., Sharma, A., Sharma, P., Singh, J., et Nain, L. (2021). PGPR Mediated alterations in root traits: way toward sustainable crop production. *Front. Sustain. Food Syst.* *4*.
- Gu, C.T., Wang, E.T., Tian, C.F., Han, T.X., Chen, W.F., Sui, X.H., and Chen, W.X. (2008). *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *58*, 1364–1368. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65661-0>.
- Guiñazú, L.B., Andrés, J.A., Papa, M.F.D., Pistorio, M., and Rosas, S.B. (2010). Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. *Biol. Fertil. Soils* *46*, 185–190. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0408-5>.
- Gunawardena, S.F.B.N., Danso, S.K.A., and Zapata, F. (1992). Phosphorus requirements and nitrogen accumulation by three mungbean (*Vigna radiata* (L) Welzek) cultivars. *Plant Soil* *147*, 267–274. .
- Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B., and Tewari, R. (2012). Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiol. Res.* *167*, 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.02.004>.
- Habib, S.H., Kausar, H., and Saud, H.M. (2016). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in Okra through ROS-Scavenging Enzymes. *BioMed Res. Int.* *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/6284547>.
- Hansen, J.C., Cade-Menun, B.J., and Strawn, D.G. (2004). Phosphorus speciation in manure-amended alkaline soils. *J. Environ. Qual.* *33*, 1521–1527. .
- Hardarson, G. (1993). Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant Soil* *152*, 1–17. <https://doi.org/10.1007/BF00016329>.
- Harbouze, R., Pellissier, J.P., Rolland, I.P., Khechimi, W. (2021). Rapport de synthèse sur l’agriculture au Maroc. Rapport de recherche. CIHEAM-IAMM. 2019, pp.104. fffal-02137637v2f
- He, X., Xu, M., Wei, Q., Tang, M., Guan, L., Lou, L., Xu, X., Hu, Z., Chen, Y., Shen, Z., et al. (2020). Promotion of growth and phytoextraction of cadmium and lead in *Solanum nigrum* L. mediated by plant-growth-promoting rhizobacteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *205*, 111333. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111333>.
- Hellweg, C., Pühler, A., and Weidner, S. (2009). The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC Microbiol.* *9*, 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-37>.
- Herrera-Cervera, J.A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H.-V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J., and Sanjuan, J. (1999). At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* *30*, 87–97. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00638.x>.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., and Peterson, S.B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>.
- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* *237*, 173–195. <https://doi.org/10.1023/A:1013351617532>.

- Hogh-Jensen, H., Schjoerring, J.K., and Soussana, J. (2002). The influence of phosphorus deficiency on growth and nitrogen fixation of white clover Plants. *Ann. Bot.* *90*, 745–753. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf260>.
- Hungria, M., Campo, R.J., and Mendes, I.C. (2003). Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol. Fertil. Soils* *39*, 88–93. <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0682-6>.
- Hungria, M., Nogueira, M.A., and Araujo, R.S. (2013). Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biol. Fertil. Soils* *49*, 791–801. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>.
- Huo, Y., Tong, W., Wang, J., Wang, F., Bai, W., Wang, E., Shi, P., Chen, W., and Wei, G. (2019). *Rhizobium chutanense* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *69*, 2049–2056. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003430>.
- Inagaki, A.M., Guimarães, V.F., Lana, M. do C., Klein, J., da Costa, A.C.P.R., Rodrigues, L.F.O.S., and Rampim, L. (2015). Maize initial growth with the inoculation of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) under different soil acidity levels. *Aust. J. Crop Sci.*
- Isoi, T., and Yoshida, S. (1991). Low nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* *37*, 559–563. <https://doi.org/10.1080/00380768.1991.10415069>.
- Kan, F.L., Chen, Z.Y., Wang, E.T., Tian, C.F., Sui, X.H., and Chen, W.X. (2007). Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai–Tibet plateau and in other zones of China. *Arch. Microbiol.* *188*, 103–115. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0211-3>.
- Kawaka, F., Dida, M.M., Opala, P.A., Ombori, O., Maingi, J., Osoro, N., Muthini, M., Amoding, A., Mukaminega, D., and Muoma, J. (2014). Symbiotic efficiency of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Soils of Western Kenya. *Int. Sch. Res. Not.* *2014*, e258497. <https://doi.org/10.1155/2014/258497>.
- Kawaka, F., Makonde, H., Dida, M., Opala, P., Ombori, O., Maingi, J., and Muoma, J. (2018). Genetic diversity of symbiotic bacteria nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris*) in western Kenya. *PLoS ONE* *13*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207403>.
- Keneni, A., Prabu, P.C., et Assefa, F. (2010). Characterization of acid and salt tolerant rhizobial strains isolated from faba bean fields of Wollo, Northern Ethiopia. *J. Agric. Sci. Technol.* *12*, 365–376. .
- Khan, M.S., Zaidi, A., and Wani, P.A. (2009). Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A Review. in sustainable agriculture, E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, S. Véronique, and C. Alberola, eds. (Springer Netherlands), pp. 551–570.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., and Wani, P.A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Arch. Agron. Soil Sci.* *56*, 73–98. <https://doi.org/10.1080/03650340902806469>.
- Kim, K.Y., Jordan, D., and McDonald, G.A. (1997). Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils* *26*, 79–87. <https://doi.org/10.1007/s003740050347>.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* *16*, 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- Korir, H., Mungai, N.W., Thuita, M., Hamba, Y., and Masso, C. (2017). Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. *Front. Plant Sci.* *8*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00141>.
- Kulkarni, S., Surange, S., and Nautiyal, C.S. (2000). Crossing the limits of *Rhizobium* existence in extreme conditions. *Curr. Microbiol.* *41*, 402–409. .
- de Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Mohamed, S.H., Torck, U., Coopman, R., Filali-Maltouf, A., Kersters, K., Dreyfus, B., Lindström, K., et al. (1999). *Agrobacterium* bv. 1 strains isolated from nodules of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* *22*, 119–132. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80035-6](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80035-6).
- Lei, Z., Jian-ping, G., Shi-qing, W., Ze-yang, Z., Chao, Z., and Yongxiong, Y. (2011). Mechanism of acid tolerance in a rhizobium strain isolated from *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Can. J. Microbiol.* *57*, 514–524. <https://doi.org/10.1139/w11-036>.
- Leveau, J.H.J., and Lindow, S.E. (2005). Utilization of the plant hormone Indole-3-Acetic Acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 2365–2371. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2365-2371.2005>.

- Li, J., Xie, Y., Dai, A., Liu, L., and Li, Z. (2009). Root and shoot traits responses to phosphorus deficiency and QTL analysis at seedling stage using introgression lines of rice. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* 36, 173–183. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60104-6](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60104-6).
- Lodi, L.A., Klaic, R., Bortoletto-Santos, R., Ribeiro, C., and Farinas, C.S. (2022). Unveiling the solubilization of potassium mineral rocks in organic acids for application as K-fertilizer. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1–17. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03826-7>.
- Lucas Garcia, J.A., Probanza, A., Ramos, B., Ruiz Palomino, M., and Gutierrez Manero, F.J. (2004). Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie*.
- Lugtenberg, B., and Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>.
- Machuca, A., and Milagres, A.M.F. (2003). Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 177–181. .
- MacLean, A.M., Finan, T.M., and Sadowsky, M.J. (2007). Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiol.* 144, 615–622. <https://doi.org/10.1104/pp.107.101634>.
- Malik, D.K., and Sindhu, S.S. (2011). Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol. Mol. Biol. Plants Int. J. Funct. Plant Biol.* 17, 25–32. <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0041-7>.
- Mandri, B., Drevon, J.-J., Bargaz, A., Oufdou, K., Faghire, M., Plassard, C., Payre, H., and Ghoulam, C. (2012). Interactions between common bean genotypes and rhizobia strains isolated from Moroccan soils for growth, phosphatase and phytase activities under phosphorus deficiency conditions. *J. Plant Nutr.* 35, 1477–1490. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.689908>.
- Mano, Y., and Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.* 63, 2853–2872. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers091>.
- Marques, A.P.G.C., Pires, C., Moreira, H., Rangel, A.O.S.S., and Castro, P.M.L. (2010). Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1229–1235. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.014>.
- Mayak, S., Tirosh, T., and Glick, B.R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 42, 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009>.
- Mayuranki, M., S.K. S., and V. V. M. (1985). Isolation and characterisation of catechol-like siderophore from cowpea *Rhizobium* RA-1. *Arch. Microbiol.* 141, 156–158. <https://doi.org/10.1007/BF00423277>
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., & Meena, R. S. (2016). Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture. Vol. 331. New Delhi: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776>
- Mellidou, I., and Karamanoli, K. (2022). Unlocking PGPR-mediated abiotic stress tolerance: what lies beneath. *Sustain. Food Syst.* 832896. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.832896>.
- Mengel, K., and Kirkby, E.A. (2004). Principles of plant nutrition. *Annals of Botany*, 93, 479–480. <https://doi.org/10.1093/aob/mch063>.
- Mhamdi, R., Mrabet, M., Laguerre, G., Tiwari, R., and Aouani, M.E. (2005). Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium*-like strains. *Can. J. Microbiol.* 51, 105–111. <https://doi.org/10.1139/w04-120>.
- Michiels, J., Dombrecht, B., Vermeiren, N., Xi, C., Luyten, E., and Vanderleyden, J. (1998). *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 193–205. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(98\)00035-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00035-X).
- Mirza, M.S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., and Malik, K.A. (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil* 237, 47–54. <https://doi.org/10.1023/A:1013388619231>.
- Mnasri, B., Liu, T.Y., Saidi, S., Chen, W.F., Chen, W.X., Zhang, X.X., and Mhamdi, R. (2014). *Rhizobium azibense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1501–1506. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.058651-0>.
- Mostasso, L., Mostasso, F.L., Dias, B.G., Vargas, M.A.T., and Hungria, M. (2002). Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Res.* 73, 121–132. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(01\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(01)00186-1).
- Mouhsine, B., Prell, J., Filali-Maltouf, A., Priefer, U.B., and Aurag, J. (2007). Diversity, phylogeny and distribution of bean rhizobia in salt-affected soils of North-West Morocco. *Symbiosis* 43, 83–96. .

- Moulin, L., Béna, G., Boivin-Masson, C., and Stepkowski, T. (2004). Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* *30*, 720–732. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00255-0](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00255-0).
- Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., and Lindström, K. (2015). Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst. Appl. Microbiol.* *38*, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.003>.
- Muglia, C.I., Grasso, D.H., and Aguilar, O.M. (2007). *Rhizobium tropici* response to acidity involves activation of glutathione synthesis. *Microbiol. Read. Engl.* *153*, 1286–1296. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003483-0>.
- Nadeem, M.A., Yeken, M.Z., Shahid, M.Q., Habyarimana, E., Yilmaz, H., Alsaleh, A., Hatipoğlu, R., Çilesiz, Y., Khawar, K.M., Ludidi, N., et al. (2021). Common bean as a potential crop for future food security: an overview of past, current and future contributions in genomics, transcriptomics, transgenics and proteomics. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* *35*, 758–786. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1920462>.
- Neilands, J.B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* *270*, 26723–26726. .
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.J., Deerfield, D.W., et al. (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnew News* *4*. .
- Nukui, N., Ezura, H., Yuhashi, K.-I., Yasuta, T., et Minamisawa, K. (2000). Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosynthesis and perception on nodulation in *Lotus japonicus* and *Macropodium atropurpureum*. *Plant Cell Physiol.* *41*, 893–897. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcd011>.
- Oburger, E., Jones, D.L., and Wenzel, W.W. (2011). Phosphorus saturation and pH differentially regulate the efficiency of organic acid anion-mediated P solubilization mechanisms in soil. *Plant Soil* *341*, 363–382. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0650-5>.
- O’connell, P.F. (1992). Sustainable agriculture-a valid alternative. *Outlook Agric.* *21*, 5–12. <https://doi.org/10.1177/003072709202100103>.
- Olivera, M., Tejera, N., Iribarne, C., Ocaña, A., and Lluch, C. (2004). Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiol. Plant.* *121*, 498–505. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00355.x>.
- Olivera, M., Tejera, N., Iribarne, C., Ocaña, A., and Lluch, C. (2007). Effect of phosphorous on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris*. In First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, E. Velázquez, and C. Rodríguez-Barrueco, eds. (Springer Netherlands), pp. 157–160.
- Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *63*, 334–348. .
- Orhan, F. (2016). Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Braz. J. Microbiol.* *47*, 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.001>.
- Ormeño-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L.G.P., Ollero, F.J., Nicolás, M.F., Pains Rodrigues, E., Shigueyoshi Nakatani, A., Silva Batista, J.S., Oliveira Chueire, L.M., Souza, R.C., et al. (2012). Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* *13*, 735. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-735>.
- Orr, C.H., James, A., Leifert, C., Cooper, J.M., and Cummings, S.P. (2011). Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 911–919. <https://doi.org/10.1128/AEM.01250-10>.
- Overvoorde, P., Fukaki, H., and Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537>.
- Pandya, M., Naresh Kumar, G., and Rajkumar, S. (2013). Invasion of rhizobial infection thread by non-rhizobia for colonization of *Vigna radiata* root nodules. *FEMS Microbiol. Lett.* *348*, 58–65. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12245>.
- Parnell, J.J., Berka, R., Young, H.A., Sturino, J.M., Kang, Y., Barnhart, D.M., and DiLeo, M.V. (2016). From the Lab to the Farm: An industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Front. Plant Sci.* *7*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01110>.
- Pastor-Bueis, R., Sánchez-Cañizares, C., James, E.K., and González-Andrés, F. (2019). Formulation of a highly effective inoculant for common bean based on an autochthonous elite strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli, and genomic-based insights into its agronomic performance. *Front. Microbiol.* *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02724>.

- Patten, C.L., and Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3795–3801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>.
- Peoples, M.B., Brockwell, J., Herridge, D.F., Rochester, I.J., Alves, B.J.R., Urquiaga, S., Boddey, R.M., Dakora, F.D., Bhattarai, S., Maskey, S.L., et al. (2009). The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* 48, 1–17. <https://doi.org/10.1007/BF03179980>.
- Pérez-Torres, C.-A., López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Ibarra-Laclette, E., Dharmasiri, S., Estelle, M., and Herrera-Estrella, L. (2008). Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell* 20, 3258–3272. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058719>.
- Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of Phosphorus in Soil Connection with the Vital Activity of Some Microbial Species. *Microbiology*, 17, 362-370.
- Qureshi, M.A., Shakir, M.A., Iqbal, A., and Khan, N.A. et al. (2011). Co-inoculation of phosphate solubilizing bacteria and rhizobia for improving growth and yield of mungbean (*vigna radiata* L.). *J. Anim. Plant Sci.*
- Radzki, W., Gutierrez Mañero, F.J., Algar, E., Lucas García, J.A., García-Villaraco, A., and Ramos Solano, B. (2013). Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104, 321–330. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9954-9>.
- Rajendran, G., Sing, F., Desai, A.J., and Archana, G. (2008). Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. *Bioresour. Technol.* 99, 4544–4550. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.057>.
- Rajendran, G., Patel, M.H., and Joshi, S.J. (2012). Isolation and characterization of nodule-associated *Exiguobacterium* sp. from the root nodules of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) and Their Possible Role in Plant Growth Promotion. *Int. J. Microbiol.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/693982>.
- Ramírez-Bahena, M.H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., and Velázquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2484–2490. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65621-0>.
- Reinprecht, Y., Schram, L., Marsolais, F., Smith, T.H., Hill, B., and Pauls, K.P. (2020). Effects of nitrogen application on nitrogen fixation in common bean production. *Plant Sci.* 1172. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01172>.
- Ribeiro, R.A., Rogel, M.A., López-López, A., Ormeño-Orrillo, E., Barcellos, F.G., Martínez, J., Thompson, F.L., Martínez-Romero, E., and Hungria, M. (2012). Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1179–1184. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.032912-0>.
- Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Dall’Agnol, R.F., Graham, P.H., Martínez-Romero, E., and Hungria, M. (2013). Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Res. Microbiol.* 164, 740–748. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.05.002>.
- Ribeiro, R.A., Delamuta, J.R.M., Gomes, D.F., Souza, R.C., Chueire, L.M.O., and Hungria, M. (2015). Genome sequence of *Rhizobium ecuadorensis* strain CNPSo 671T, an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genetic Pool. *Genome Announc.* 3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01058-15>.
- Richardson, A.E., and Simpson, R.J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiol.* 156, 989–996. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>.
- Richardson, A.E., Barea, J.-M., McNeill, A.M., and Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321, 305–339. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>.
- Rincón-Rosales, R., Lloret, L., Ponce, E., and Martínez-Romero, E. (2009). Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. *Fems Microbiol. Ecol.* 67, 103–117. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00590.x>.

- Rodriguez-Navarro, D.N., Buendía, A.M., Camacho, M., Lucas, M.M., and Santamaria, C. (2000). Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South-West Spain. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1601–1613. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00074-2).
- Román-Ponce, B., Jing Zhang, Y., Soledad Vásquez-Murrieta, M., Hua Sui, X., Feng Chen, W., Carlos Alberto Padilla, J., Wu Guo, X., Lian Gao, J., Yan, J., Hong Wei, G., et al. (2016). *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in acid soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 398–406. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000732>.
- Roskova, Z., Skarohlid, R., and McGachy, L. (2022). Siderophores: an alternative bioremediation strategy? *Sci. Total Environ.* 819, 153144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153144>.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Swaraj, K., and Bishnoi, N.R. (1999). Effect of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Indian J. Exp. Biol.* 37, 843–848.
- Sashidhar, B., and Podile, A. r. (2010). Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04654.x>.
- Savci, S. (2012). Investigation of effect of chemical fertilizers on environment. *APCBEE Procedia* 1, 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.03.047>.
- Sayyed, R.Z., Chincholkar, S.B., Reddy, M.S., Gangurde, N.S., and Patel, P.R. (2013). Siderophore producing PGPR for crop nutrition and phytopathogen suppression. In *Bacteria in Agrobiological: Disease Management*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 449–471.
- Schachtman, D.P., Reid, R.J., and Ayling, S.M. (1998). Phosphorus uptake by plants: From Soil to Cell. *Plant Physiol.* 116, 447–453. .
- Schwyn, B., and Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47–56. .
- Segovia, L., Young, J.P.W., and Martinez-Romero, E. 1993 Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* Biovar Phaseoli Type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 43, 374–377. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-374>.
- Shaharoon, B., Arshad, M., and Zahir, Z.A. (2006). Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 155–159. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01827.x>.
- Shamseldin, A., and Velázquez, E. (2020). The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 63. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02839-w>.
- Shamseldin, A., and Werner, D. (2005). High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. *Curr. Microbiol.* 50, 11–16. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4391-7>.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., and Gobi, T.A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2, 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.
- Shenoy, V.V., and Kalagudi, G.M. (2005). Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnol. Adv.* 23, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.004>.
- Singh, J., Sastry, E.V.D., and Singh, V. (2012). Effect of salinity on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) during seed germination stage. *Physiol. Mol. Biol. Plants Int. J. Funct. Plant Biol.* 18, 45–50. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0097-z>.
- Singh, M., Singh, D., Gupta, A., Pandey, K.D., Singh, P.K., and Kumar, A. (2019a). Plant growth promoting rhizobacteria. In *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*, (Elsevier), pp. 41–66.
- Singh, P., Rajput, R.S., Ram, R.M., and Singh, H.B. (2019b). A Deeper insight into the symbiotic mechanism of *Rhizobium* spp. from the perspective of secondary metabolism. In *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and Applications*, H.B. Singh, C. Keswani, M.S. Reddy, E. Sansinenea, and C. García-Estrada, eds. (Singapore: Springer), pp. 265–291.
- Singh, R.P., Shelke, G.M., Kumar, A., and Jha, P.N. (2015). Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to “stress ethylene” produced in plants. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00937>.

- Singh, S., Gupta, G., Khare, E., Behal, K.K., and Arora, N.K. (2014). Phosphate solubilizing rhizobia promote the growth of chickpea under buffering conditions. *Int J Pure Appl Biosci* 2, 97–106. .
- Somado, E.A., Sahrawat, K.L., and Kuehne, R.F. (2006). Rock phosphate-P enhances biomass and nitrogen accumulation by legumes in upland crop production systems in humid West Africa. *Biol. Fertil. Soils* 43, 124–130. <https://doi.org/10.1007/s00374-006-0094-5>.
- Somasegaran, P., and Hoben, H.J. (2012). *Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology* (Springer Science & Business Media).
- Sridevi, M., and Veera Mallaiah, K. (2007). Bioproduction of indole acetic acid by *Rhizobium* Strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbania sesban* (L.) Merr. *Iran. J. Biotechnol.* 5, 178–182. .
- Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.-Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jürgens, G., and Alonso, J.M. (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133, 177–191. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.047>.
- Swaraj, K., et Bishnoi, N.R. (1999). Effect of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Indian J. Exp. Biol.* 37, 843–848. .
- Talbi, C., Delgado, M.J., Girard, L., Ramírez-Trujillo, A., Caballero-Mellado, J., and Bedmar, E.J. (2010). *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4587–4591. <https://doi.org/10.1128/AEM.02886-09>.
- Tan, Z.Y., Kan, F.L., Peng, G.X., Wang, E.T., Reinhold-Hurek, B., and Chen, W.X. (2001). *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 909–914. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-909>.
- Tandon, H.L.S., Cescas, M.P., and Tyner, E.H. (1968). An acid-free Vanadate-Molybdate reagent for the determination of total phosphorus in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 32, 48–51. <https://doi.org/10.2136/sssaj1968.03615995003200010012x>.
- Tank, N., and Saraf, M. (2010). Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants. *J. Plant Interact.* 5, 51–58. <https://doi.org/10.1080/17429140903125848>.
- Tao, Y., Ferrer, J.-L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., et al. (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133, 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.049>.
- Thung, M. (1990). Phosphorus: A limiting nutrient in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production in Latin America and field screening for efficiency and response. In *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*, N.E. Bassam, M. Dambroth, and B.C. Loughman, eds. (Springer Netherlands), pp. 501–521
- Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., and Liu, X. (2021). Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P Cycle. *Biology* 10, 158. <https://doi.org/10.3390/biology10020158>.
- Tohme, J., Toro, O.C., Vargas, J., and Debouck, D.G. (1995). Variability in Andean common beans (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ. Bot.* 49, 78–95. <https://doi.org/10.1007/BF02862280>.
- Toro, M. (2007). Phosphate solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants from tropical savannas: An adaptive strategy to acid soils? In *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, E. Velázquez, and C. Rodríguez-Barrueco, eds. (Springer Netherlands), pp. 249–252.
- Tu, T.-C., Lin, S.-H., and Shen, F.-T. (2021). Enhancing symbiotic nitrogen fixation and soybean growth through co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* isolates. *Sustainability* 13, 11539. <https://doi.org/10.3390/su132011539>.
- Turner, B.L., Papházy, M.J., Haygarth, P.M., and McKelvie, I.D. (2002). Inositol phosphates in the environment. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 357, 449–469. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0837>.
- Ullah, S., Khan, M.Y., Asghar, H.N., Akhtar, M.J., and Zahir, Z.A. (2017). Differential response of single and co-inoculation of *Rhizobium leguminosarum* and *Mesorhizobium ciceri* for inducing water deficit stress tolerance in wheat. *Ann. Microbiol.* 67, 739–749. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1302-2>.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., and Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4, 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>.
- Valverde, A., Igual, J.M., Peix, A., Cervantes, E., and Velázquez, E. (2006). *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2631–2637. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64402-0>.
- Van de Poel, B., and Van Der Straeten, D. (2014). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00640>.

- Vidaver, A.K., Mathys, M.L., Thomas, M.E., and Schuster, M.L. (1972). Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea*, and *P. phaseolicola*. *Can. J. Microbiol.* *18*, 705–713.
- Vincent, J.M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria (Oxford, England: Blackwell Scientific Publications). The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plant's environmental stresses. *Appl. Sci.* *12*, 1231. <https://doi.org/10.3390/app12031231>.
- Wang, F., Wang, E.T., Wu, L.J., Sui, X.H., Li, Y., and Chen, W.X. (2011). *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *61*, 2582–2588. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.026484-0>.
- Wani, P.A., Khan, M.S., and Zaidi, A. (2007). Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* *170*, 283–287. <https://doi.org/10.1002/jpln.200620602>.
- Watkin, E.L., O'Hara, G.W., and Glenn, A.R. (2003). Physiological responses to acid stress of an acid-soil tolerant and an acid-soil sensitive strain of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Soil Biol. Biochem.* *35*, 621–624. .
- Yadav, N.K., and Vyas, S.R. (1971). Response of root-nodule rhizobia to saline, alkaline and acid conditions. *Indian J Agr Sci.*
- Yadegari, M., Rahmani, H.A., Noormohammadi, G., and Ayneband, A. (2008). Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components. *Pak. J. Biol. Sci. PJBS* *11*, 1935–1939. .
- Yaganza, E.-S., Tweddell, R.J., and Arul, J. (2009). Physicochemical basis for the inhibitory effects of organic and inorganic salts on the growth of *Pectobacterium carotovorum* subsp. carotovorum and *Pectobacterium atrosepticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 1465–1469. <https://doi.org/10.1128/AEM.02447-08>.
- Yaish, M.W., Al-Lawati, A., Jana, G.A., Vishwas Patankar, H., and Glick, B.R. (2016). Impact of soil salinity on the structure of the bacterial endophytic community identified from the roots of caliph medic (*Medicago truncatula*). *PLoS ONE* *11*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159007>.
- Yan, J., Yan, H., Liu, L.X., Chen, W.F., Zhang, X.X., Verástegui-Valdés, M.M., Wang, E.T., and Han, X.Z. (2017a). *Rhizobium hidalgonense* sp. nov., a nodule endophytic bacterium of *Phaseolus vulgaris* in acid soil. *Arch. Microbiol.* *199*, 97–104. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1281-x>.
- Yan, J., Li, Y., Yan, H., Chen, W.F., Zhang, X., Wang, E.T., Han, X.Z., and Xie, Z.H. (2017b). *Agrobacterium salinitolerans* sp. nov., a saline-alkaline-tolerant bacterium isolated from root nodule of *Sesbania cannabina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *67*, 1906–1911. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001885>.
- Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., and Qin, W. (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *Int. Soil Water Conserv. Res.* *3*, 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.11.003>.
- Yang, J., Zhou, Q., and Zhou, J. (2001). Effect of pH on nodulation of soybean rhizobia from Weifang and Huayuankou soils. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao J. Appl. Ecol.* *12*, 639–640. .
- Youseif, S.H., Abd El-Megeed, F.H., Ageez, A., Mohamed, Z.K., Shamseldin, A., and Saleh, S.A. (2014). Phenotypic characteristics and genetic diversity of rhizobia nodulating soybean in Egyptian soils. *Eur. J. Soil Biol.* *60*, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.10.008>.
- Youseif, S.H., Abd El-Megeed, F.H., and Saleh, S.A. (2017). Improvement of faba bean yield using *Rhizobium/Agrobacterium* inoculant in low-fertility sandy soil. *Agronomy* *7*, 2. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010002>.
- Zahir, Z.A., Shah, M.K., Naveed, M., and Akhter, M.J. (2010). Substrate-dependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* *20*, 1288–1294. .
- Zaidi, A., Khan, M.S., Ahemad, M., and Oves, M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* *56*, 263–284. <https://doi.org/10.1556/AMicr.56.2009.3.6>.
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* *61*, 49–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308>.
- Zhao, L.F., Xu, Y.J., Ma, Z.Q., Deng, Z.S., Shan, C.J., and Wei, G.H. (2013). Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Pseudomonas chlororaphis* strain Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* *44*, 623–631. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200043>.

Annexes

Annexe 1: Composition chimique des milieux de culture

- **YEM (Yeast Extract Mannitol)** (Vincent, 1970)

Mannitol	5 g/l
Extrait de levure	1 g/l
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0.2 g/l
KH ₂ PO ₄	0.12 g/l
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.12 g/l
NaCl	0.1 g/l
Rouge Congo (1%)	2.5 mL

- **Milieu PVK** (Pikovskaya, 1948) modifié

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
Extrait de levure	0.01 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05 g/l
Phosphate naturel broyé	0.5 g/l

- **Milieu Modi** (Mayuranki *et al.*, 1985)

Mannitol	10 g/l
NaCl	01 g/l
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.2 g/l
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0.5 g/l
(NH ₄)NO ₃	1 g/l
Sodium glutamate	1 g/l

- **Milieu Minimum** (Dworkin and Foster, 1958)

Mannitol	3.64 g/l	
NaCl	0.05 g/l	
MgSO ₄ . 6H ₂ O	0.2 g/l	
Macroéléments	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0.35 g/l
	KH ₂ PO ₄	0.15 g/l
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.05 g/l
	FeCl ₂	6 mg/l
	H ₃ BO ₃	10 mg/l
Microéléments	MnCl ₂	0.1 mg/l
	NaMO ₄ . 2H ₂ O	0.5 mg/l
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.5 mg/l
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.5 mg/l

Une quantité de 1 mL de chaque vitamine préalablement stérilisée par filtration (0.45 µm) est ajoutées à partir d'une solution mère.

Biotine	10 mg/ 30 mL
Thiamine	10 mg/ 30 mL
Acide pantothenique	10 mg/ 30 mL

Le pH de tous les milieux de culture a été ajusté à 6.8 et 15 g d'agar a été ajouté par litre dans le cas des milieux de culture solides.

- **Milieu TY** (Yeast Extract-Tryptone) (Beringer *et al.*, 1988)

Tryptone	5 g/l
Extrait de levure	3 g/l
CaCl ₂	0.08 g/l

Annexe 2 : Réactifs utilisés

- **Réactif de Salkowsky** (Ehmann, 1977)

Composition globale :

FeCl ₃	20 g
Acide Sulfurique	421.9 mL
Eau distillée	qsp 1000 mL

Préparation :

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

- Verser 2g de FeCl₃ dans 50 mL d'eau stérile, puis mélanger
 - Après dissolution complète du chlorure ferrique, verser lentement 421.19 mL d'acide sulfurique concentré en agitant constamment avec une baguette de verre.
- Laisser reposer jusqu'à ce que le mélange soit froid, puis ajouter 50 mL d'eau distillée.

- **Réactif Vanadate-Molybdate** (Tandon *et al.*, 1968)

Solution A :

(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	25 g
Eau distillée	400 mL

Solution B :

(NH ₄)VO ₃	1.25 g
Eau distillée	300 mL

Dans un bêcher, on chauffe de l'eau distillée jusqu'à ébullition, puis on rajoute du NH₄VO₃ et on laisse le bêcher en ébullition. Après refroidissement de cette solution, on ajoute sous la hotte chimique 250 mL d'acide nitrique concentré (60%) et on complète l'ensemble des deux solutions (A+B) jusqu'à 1 litre.

- **Réactif CAS** (Schwyn and Neilands, 1987)

Solution 1 : Le HDTMA (Hexa Decyl Tri Methyl Ammonium Bromide) à 10mM.

Solution 2 : FeCl₃. 6H₂O à 1mM préparé dans HCl à 10 mM.

Solution 3 : CAS (Chrome Azurol S) à 2 mM.

Solution 4 : pipérazine neutralisée (4.307 g de pipérazine anhydre dans 20 mL d'eau+6.25 mL de HCl 12 N ou 7.4 mL de HCl à 37%).

Préparation :

Dans une fiole de 100 mL, ajouter dans l'ordre :

- 40 mL d'eau distillée + 6 mL de la solution 1 (HDTMA)
- Mettre en marche une agitation douce
- Ajouter goutte à goutte le mélange (1.5 mL de la solution 2+7.5 mL de la solution 3)
- Ajouter la solution 4 puis compléter à 100 mL avec l'eau distillée.

La solution CAS doit être conservée à l'obscurité et de préférence dans un flacon en polyéthylène.

- **Réactif Nessler** (Cappuccino and Sherman, 1992)

HgCl ₂	10 g
KI	7 g
NaOH (32%)	16 g

Préparation:

Dissoudre 16g de NaOH dans 50 mL d'eau distillée et laisser refroidir à température ambiante. Dissoudre KI et HgCl₂ dans de l'eau distillée stérile séparément puis rajouter les mélanges à la solution de NaOH en mélangeant et compléter à 100 mL avec l'eau distillée.

Annexe 3 : Solution nutritive de base des plantes (Broughton and Dilworth, 1971)

Solution 1	CaCl ₂ . 2H ₂ O	2 M
Solution 2	KH ₂ PO ₄	1 M
Solution 3	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.5 M
	K ₂ SO ₄	0.5 M
	MnSO ₄ . H ₂ O	0.002 M
Solution 4	H ₃ BO ₃	0.004 M
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.001 M
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.0004 M
	CoSO ₄ . 7H ₂ O	0.0002 M
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.0002 M
Solution 5	Fe-citrate	0.02 M

Prendre 5 mL des solutions 1 à 4 et 1 mL de la solution 5, les ajouter à 5 litres d'eau distillée, puis diluer à 10 litres. Le pH doit être ajusté entre 6.6 et 6.8 avec du NaOH 1 M.

Pour la solution nutritive azotée, ajouter 0.5g/l de KNO₃

Annexe 4 : Composition du tampon de lyse

Tris acétate (40 mM)	2 mL
Acétate de Sodium (2 mM)	330 µL
SDS (20%)	2.5 mL
ARNase	1 mL
EDTA (1 mM)	1 mL
Eau déionisée stérile	q.s.p 50 mL

Annexe 5 : Figures de corrélation

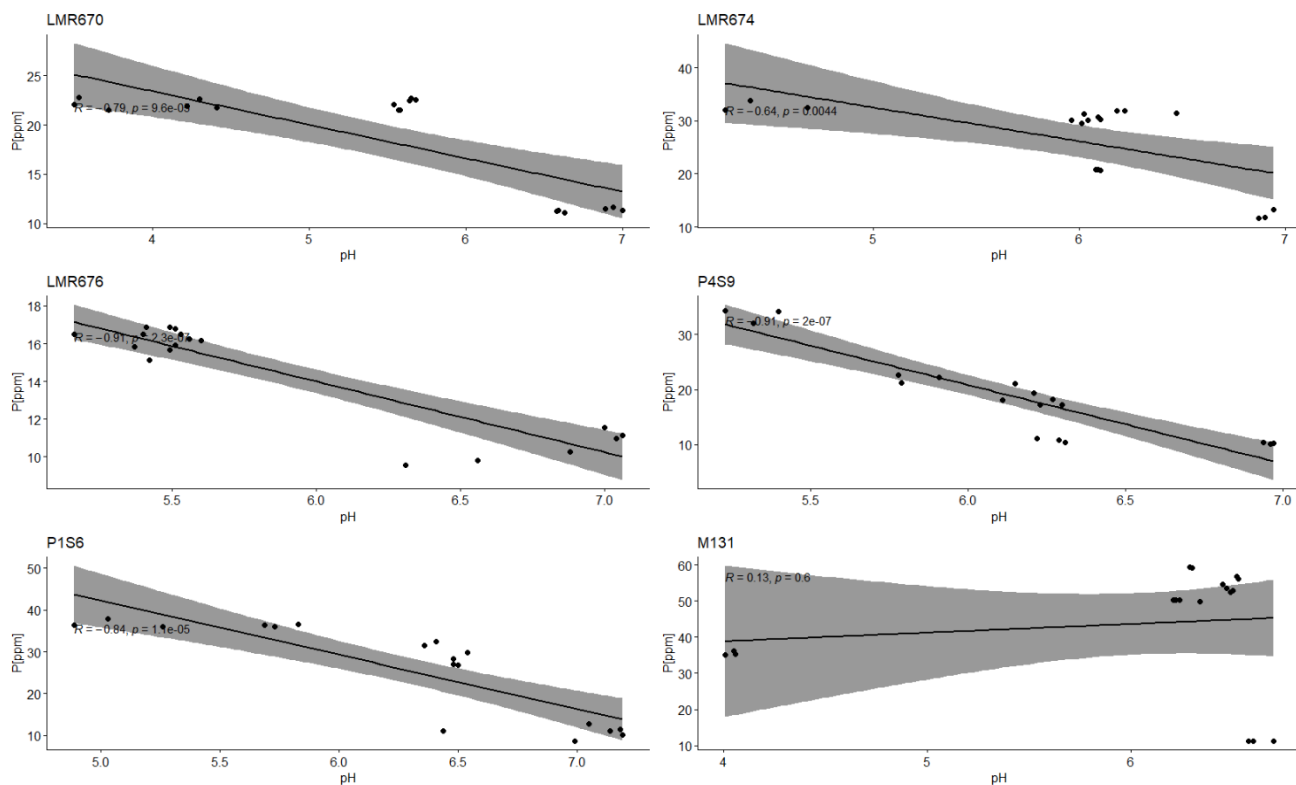


Figure 1 : Corrélations entre la solubilisation du phosphate et le pH du milieu

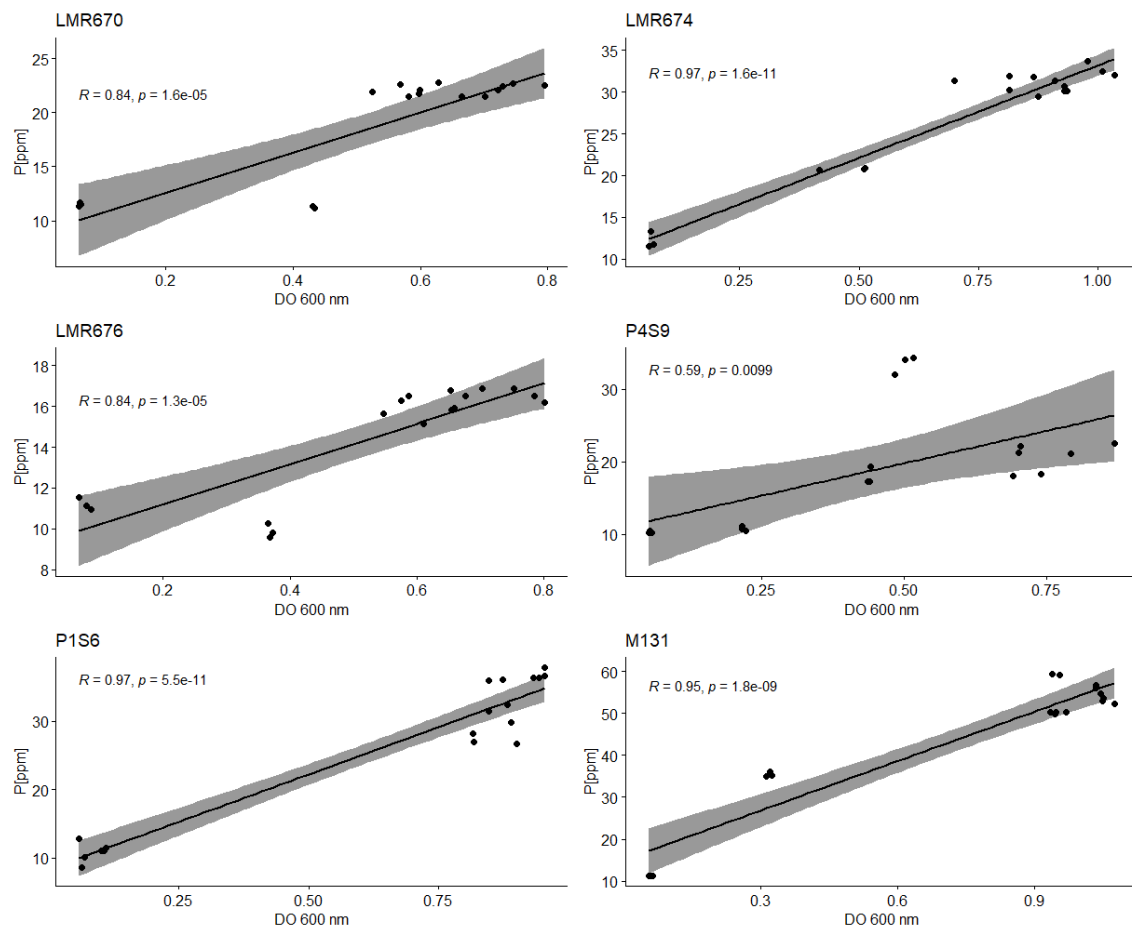


Figure 2 : Corrélations entre la solubilisation du phosphate et la croissance bactérienne

Annexe 6 : Tableau des activités PGP et tolérance des isolats sélectionnés pour le test d'infectivité

	P (µg/mL)	Sid (%)	Aux (µg/mL)	NaCl (M)	KCL (M)	CaCl₂(M)	pH
PV1	12.728	63	46.044	0.34	0.34	0	5_9
PV2	11.980	74	34.000	0.51	0.34	0	5_9
PV3	12.133	84	4.689	0.34	0.34	0	5_8
PV4	23.268	68	2.534	0.34	0.34	0	5_8
PV5	12.456	77	29.289	0.51	0.34	0.17	5_9
LMR670	22.550	27	124.232	0.51	0.34	0.17	5_9
PV7	12.201	84	5.734	0.51	0.34	0	5_9
PV8	9.090	83	4.911	0.34	0.34	0	5_9
PV9	14.258	21	5.280	0.64	0.64	0.17	5_9
PV10	13.119	47	22.422	0.51	0.51	0	5_9
PV11	20.514	80	17.400	0.34	0.34	0	5_9
PV12	9.753	69	1.623	0.34	0.17	0	4_9
PV13	28.436	78	7.845	0.34	0.34	0	4_9
PV14	14.955	69	9.334	0.51	0.34	0.17	5_9
PV15	15.159	51	29.044	0.51	0.34	0	4_9
PV16	10.501	78	3.289	0.51	0.51	0	5_9
PV17	13.068	77	2.978	0.51	0.34	0	5_9
PV18	9.838	43	21.267	0.34	0.34	0	5_8
PV19	9.226	11	70.311	0.51	0.34	0	5_9
LMR674	31.705	88	85.742	0.64	0.64	0.17	5_9
PV21	7.271	81	4.334	0.34	0.34	0	5_8
PV22	8.206	74	13.578	0.34	0.34	0	5_9
PV23	6.965	59	3.356	0.51	0.34	0.17	5_9
PV24	7.730	84	4.778	0.51	0.51	0	5_9
PV25	8.189	76	54.644	0.51	0.34	0	4_9
PV26	8.733	71	14.489	0.34	0.34	0.17	7_9
PV27	7.135	39	17.089	0.51	0.34	0	7_8
LMR676	16.722	50	122.200	0.64	0.51	0.34	7_9
PV29	9.056	46	11.067	0.51	0.34	0.17	7_9
PV30	12.626	85	19.556	0.51	0.34	0	4_9
PV31	10.042	77	13.578	0.34	0.34	0	7_9
PV32	15.431	70	62.666	0.34	0.34	0.17	7_8
PV33	11.232	64	30.022	0.34	0.34	0.17	7_9
PV34	23.200	31	29.067	0.34	0.34	0	7_7
PV35	24.985	72	3.756	0.17	0.34	0	5_9
PV36	13.034	78	11.400	0.17	0.34	0	5_9
PV37	14.343	33	25.822	0.17	0.17	0	7_9
PV38	9.022	66	26.467	0.17	0.17	0	5_9
PV39	12.065	75	15.467	0.17	0.17	0	4_9
PV40	11.232	53	66.844	0.17	0.34	0	4_9
PV41	9.804	65	69.755	0.17	0.34	0	7_9
PV42	7.798	74	27.844	0.17	0.34	0	5_9
PV43	8.087	77	13.134	0.34	0.51	0	4_9
PV44	7.560	80	4.823	0.51	0.34	0	5_9
PV45	8.631	48	78.133	0.17	0.17	0	5_9

Annexe 7 :

Photos montrant la nodulation et l'effet de l'inoculation sur la croissance du haricot vert



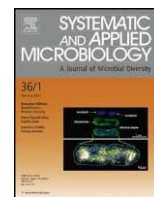
Figure 1 : Essai d'inoculation des plantes du haricot vert sous conditions contrôlées



Figure 2 : Nodulation des plantes du haricot vert



Contents lists available at [ScienceDirect](#)
Systematic and Applied Microbiology



Rhizobium laguerreae is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris*) in Morocco

Kaoutar Taha^a, El Bekkay Berraho^a, Imane El Attar^a, Samia Dekkiche^b, Jamal Aurag^a, Gilles Béna^{c,*}

^a Microbiology and Molecular Biology Unit, Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment Center, Faculty of Sciences, University Mohammed V, Rabat, Morocco

^b Molecular Biology and Cellular Laboratory, Life Sciences Faculty, Department of Microbiology, University Mentouri I, Ain El Bye, Constantine, Algeria

^c IRD, Cirad, University of Montpellier, IPME, 34394 Montpellier, France



ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2017

Received in revised form

18 September 2017

Accepted 22 September 2017

Keywords:

Lens culinaris

Rhizobium laguerreae

Population structure

Recombination

ABSTRACT

Genetic diversity and population structure of 268 *Lens culinaris* symbiotic rhizobia collected from 40 cultivated fields in the main lentil production regions in Morocco were estimated. Three chromosomal housekeeping genes (*recA*, *glnII* and *atpD*) and one common symbiotic gene (*nodC*) were sequenced and analyzed in order to identify the local symbionts of lentil. The molecular phylogeny of the concatenated housekeeping genes clustered more than 95% of the isolates in one main clade together with *Rhizobium laguerreae* species. *R. laguerreae* represents the main symbiont of cultivated lentil in Morocco and, for the first time, a large sample of individuals is obtained for this species. There is a significant and high genetic differentiation of bacterial populations among the four regions for their symbiotic gene, and much lower for their housekeeping genes. The reasons why *R. laguerreae* is so frequently recovered in our study is discussed.

© 2018 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Lentil cultivation takes an important place in agricultural systems in many countries, due to its role in human and animal nutrition as well as in soil fertility improvement. It is one of the most ancient cultivated crops among legumes; it was first domesticated in the Near East and expanded to Central Europe, all around the Mediterranean basin, Ethiopia, Afghanistan, India and China and later was introduced in Latin America [9,11]. Nowadays, lentil is produced across all dry areas around the globe, from Bangladesh to Morocco, and from Russia to Ethiopia [7,13]. In Morocco, legume fields are mainly located in areas with adequate rainfall conditions. However, they still suffer from low profitability, especially compared to cereals and oilseeds. According to the annual reports of the FAO [14], annual lentil production in 2014 has reached 30,670 tons. Furthermore, this crop covers an area of about 45,900 Ha, occupying the third place at the national scale for legumes after bean and chickpea [32]. It is mainly cultivated as a supplementary activity in Moroccan areas with deep and fertile soils dedicated to intensive

and extensive crops, in bioclimatic zones ranging from arid to sub humid. Moreover, a residual production of this legume, in that case as a traditional crop devoted to self consumption, is localized in Atlas mountainous areas.

Like many legumes, lentil is able to form an efficient nitrogen fixing symbiosis with soil bacteria collectively referred as rhizobia. This symbiosis can fully or partially satisfy the nitrogen demand of the host leguminous plant. However, the amount of nitrogen fixed depends on several factors, including plant and rhizobial genotypes. This is why it is important to evaluate the indigenous diversity of rhizobial population and screen for putative novel effective inoculants strains [31]. Several studies have examined the genetic diversity and the ability of rhizobia that nodulate members of the tribe Vicieae, [3,4,22]. All of them concluded that *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* was the main nodulating species and symbiovar in the tribe Vicieae [44].

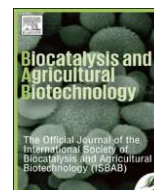
All studies conducted on lentil symbiotic bacteria also confirmed that *R. leguminosarum* bv. *viciae* was the symbiont of lentils in many countries where it was grown [17,23,28,37,44] respectively in Canada, West Asia-North Africa, France, China and Algeria. However, recent studies have shown that the distinction among closely related species in the genus *Rhizobium* was not so easy. Phylogenetic analyses have shown that 16S rRNA gene from *Rhizobium laguerreae* and *R. leguminosarum* were identical and

* Corresponding author at: IRD, IPME—Interactions Plant Microorganismes Environnement, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier, France.

E-mail address: gilles.bena@ird.fr (G. Béna).



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)
Biocatalysis and Agricultural Biotechnology



Screening of stress tolerant bacterial strains possessing interesting multi-plant growth promoting traits isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L.



Imane El Attar ^{a,b}, Kaoutar Taha ^a, Berraho El Bekkay ^a, Mhamed El Khadir ^a, Imane Thami Alami ^a, Jamal Aurag ^{a,*}

^a Microbiology and Molecular Biology Unit, Center of Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, University Mohammed V of Rabat, Morocco

^b National Institute of Agronomic Research (INRA), B.P.415, Rabat, Morocco

ARTICLE INFO

Keywords:

Phaseolus vulgaris
Rhizobium
Agrobacterium
Endophytes
Stress tolerant PGP traits

ABSTRACT

Rhizobia are soil bacteria known for their ability to nodulate and fix nitrogen with legumes. Some rhizobia also show different plant growth promoting characteristics (PGP); they can therefore be used as effective bio-fertilizers. *Phaseolus vulgaris* is considered a weak nitrogen fixer; therefore, screening experiments have been designed to select stress-tolerant effective bean rhizobia that have also PGP traits. Surveys of common bean fields in Morocco lead to the isolation of 113 bacteria inhabiting root nodules. Screening tests showed that 45 isolates exhibited positive phosphate solubilization, and auxin and siderophores production as well as high salt and pH tolerance. Correspondence analysis showed that salt tolerance and phosphate solubilization were origin related. Among the screened isolates, 18 were able to renodulate common bean but only 3 were highly effective with their host plant. Interestingly, phylogenetic analysis of 16S rRNA gene showed that the nodulating isolates clustering within the *Rhizobium* genus were represented by only two isolates related to *R. miluonense* and *R. yanglingense* while the remaining strains belonged to the *Agrobacterium* genus. Our results revealed also the co-existence of several endophytic bacteria with the symbiotic strains inside the nodules. These bacteria are stress tolerant and possess potential PGP traits, which indicate that they could stimulate common bean growth and contribute to N and P plants nutrition.

1. Introduction

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), is a highly appreciated grain legume worldwide and estimated as an important source of dietary proteins (22% of seed weight) for human consumption and also a major source of micronutrients such as iron, zinc and folic acid (Pennington and Young, 1990; Broughton et al., 2003). This legume crop is widely cultivated in Central and South America, Asia as well as in many countries of Africa including Morocco. Despite the ability of *P. vulgaris* to establish symbiosis with a broad variety of bacteria (Mostasso et al., 2002; García-Fraile et al., 2010), these symbiotic relationships are often not/or less effective (Michiels et al., 1998). Also, compared to other legumes, common bean is known as a weak nitrogen fixer (Hardarson (1993); Farid and Navabi (2015)). The estimated mean value of nitrogen derived from the atmosphere for common bean across different geographical regions of the world is only 39% as compared to lentil

(65%), soybean (68%) and pea (65%) (Peoples et al., 2009). The low capacity of symbiotic nitrogen fixation of this legume crop was attributed to its highly promiscuous nodulation (Rodríguez-Navarro et al., 2000). Effectively, common bean can be nodulated by different native and ineffective rhizobium symbiovars and as a result bean production is mainly based on intensive nitrogen fertilization which in return prevents the optimal expression of the nodulation and the nitrogen symbiotic fixation potentials of this symbiosis. Consequently, screening of infective and effective rhizobial strains, compatible with common bean cultivars, remains the most effective way for achieving successful inoculation of this legume and increasing the contribution of symbiotic nitrogen fixation to common bean N nutrition. Besides their symbiotic nitrogen fixation potential, some strains of *Rhizobium* are able to induce plant growth promotion (PGP) and improve agricultural sustainability in many ways. In addition to nitrogen fixation, the mechanisms by which PGP rhizobia may stimulate plant growth involves improving

* Corresponding author.

E-mail address: auragjamal@yahoo.fr (J. Aurag).
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101225>

Beneficial effect of *Rhizobium laguerreae* co-inoculated with native *Bacillus* sp. and *Enterobacter aerogenes* on lentil growth under drought stress

Kaoutar Taha^{a,*}, Imane El Attar^{a,b}, Mohamed Hnini^a, Amina Raif^a, Gilles Béna^c, Jamal Aurag^a, El Bekkay Berraho^a

^a Center of Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Microbiology and Molecular Biology Team, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Rabat, Morocco

^b Department of Microbiology, National Institute of Agronomical Research (INRA), Rabat, Morocco

^c PHIM Plant Health Institute, Univ Montpellier, IRD, CIRAD, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Lentil
Rhizobium
PGPR
Abiotic stress
Co-inoculation

ABSTRACT

A collection of 29 *Rhizobium laguerreae* strains phylogenetically different originating from 4 biogeographic regions of Morocco were tested for their PGP activities and phenotypic traits. The strains showed different levels of tolerance to salt ranging from 0.5 to 1.5% NaCl, an optimal growth in neutral pH (7) and were sensitive to low (10 °C) and high (40 °C) temperatures. Sixteen strains showed important IAA production (50–123 µg IAA/ml) and 11 were identified as high phosphate solubilizers (greater than 20 µg/ml). A pot experiment enabled the selection of 3 *R. laguerreae* strains LMR575, LMR597, and LMR655 with a symbiotic efficiency of 78, 78 and 76% respectively. In a subsequent greenhouse experiment, the elite rhizobial strains were tested in single and combined inoculations with 2 PGP strains *Bacillus* sp. LMR698 and *Enterobacter aerogenes* LMR696 previously isolated from lentil rhizosphere using field soil. All treatments underwent two irrigation levels (30 and 50% of water retention capacity). Under sufficient watering conditions (50%), the combination of *R. laguerreae* LMR655 with both bacterial strains (*E. aerogenes* LMR696 and *Bacillus* sp. LMR698 increased plants biomass by 38 and 23% respectively and number of nodules (54 and 52 nodules/plant respectively). Whereas, under drought stress conditions (30%), all combination except *R. laguerreae* LMR575+ *Bacillus* sp. LMR698 yielded a shoot dry weight significantly comparable to nitrogen-fertilized control. Moreover, *R. laguerreae* LMR597 and LMR655 combined with *E. aerogenes* showed an increase of areal biomass of 8 and 3% respectively. These performing strains could be further exploited in agricultural practices to mitigate the drought stress effects for a sustainable lentil cultivation.

Chapitre I 1. Introduction

Legumes of the *Viciae* tribe in the Mediterranean basin and South America are classically nodulated by *Rhizobium leguminosarum*. A new closely related species, *R. laguerreae*, was also reported as symbiont of these legumes. Saïdi et al. (2014) were the first to identify *R. laguerreae* as a symbiont of *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Tunisia and Peru. It has been subsequently isolated from *P. sativum* nodules in northern Spain by Martínez-Molina et al. (2016), from *Vicia faba* in Algeria (Belhadi et al., 2017) and from *Phaseolus vulgaris* nodules in a Spanish region where *Lens culinaris* is traditionally cultivated (Flores-Félix et al., 2018). In 2018, Taha et al. (2018) identified *R. laguerreae* as the main symbiont of *Lens culinaris* in different cultivated fields belonging to four bioclimatic regions in Morocco. Later on, Missbah El Idrissi et al. (2020) identified

R. laguerreae as a microsymbiont of *Pisum sativum* and *Vicia faba* in Morocco. A year later, Sijilmassi et al. (2021) confirmed *R. laguerreae* as a predominant species of lentil in Merchouch region (Rabat-Morocco). In addition to its ability of fix nitrogen in symbiosis with legume partners, *R. laguerreae* showed also interesting *in vitro* Plant Growth Promoting (PGP) activities comparable to those of conventional PGP rhizobacteria. Its potential in plant growth promotion has been demonstrated on both legumes and non-legume plants (Ayuso-Calles et al., 2020; Jiménez-Gómez et al., 2018). For instance, *R. laguerreae* PEPV40 isolated from *Phaseolus vulgaris* exhibited an important phosphate solubilization activity, indole acetic acid (IAA) and siderophores production. This strain was also shown to be an excellent plant probiotic by producing cellulose and forming biofilms involved in root colonization which contributed in increasing crop production and quality of spinach

* Corresponding author.

E-mail address: k.taha@um5r.ac.ma (K. Taha).

<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100523>

Received 19 February 2022; Received in revised form 11 April 2022; Accepted 11 April 2022

Phytobeneficial bacterial inoculants for common bean growth and productivity in nitrogen and phosphorus deficient soils

Imane El Attar^{1,2}, Kaoutar Taha¹, Malika Oubohssaine¹, Boubacar Diouf¹, Hajar Ait Jenk¹, El Bekkay Berraho¹, Imane Thami Alami² and Jamal Aurag^{1,*}

¹Microbiology and Molecular Biology Team, Center of Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Avenue Ibn Batouta, BP1014, Rabat 10000, Morocco; ²National Institute of Agronomic Research (INRA), B.P.415, Rabat, Morocco

*Corresponding author's e-mail: jamal.aurag@fsr.um5.ac.ma; auragjamal@yahoo.fr

Most of the soils are N and P-deficient and require high applications of chemical fertilizers to ensure optimal crop production. However, this practice poses in most cases serious environmental issues. In recent years, inoculation with beneficial bacteria has emerged as a safe and sustainable alternative to chemical fertilizers. In this context, we investigated the effect of two symbiotic *Agrobacterium radiobacter* strains (LMR670 and LMR676) and two plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus* sp. (M131) and *Enterobacter* sp. (P1S6), as single or combined inoculants, on common bean growth and yield under N and P-deficient conditions. In a first trial, *Agrobacterium* strains' symbiotic efficiency with common bean was evaluated in a low phosphorus and nitrogen soil under greenhouse conditions. Strain LMR670 recorded the highest nodules number (53 nodules per plant) and shoot dry weight (0.553 g plant⁻¹). This strain was then used in combination with the PGP rhizobacteria in a common bean co-inoculation assay under sufficient and deficient P levels (80 kg ha⁻¹ of P and No P added). Single inoculation with LMR670 recorded the highest shoot dry weight (82% increase compared to non-fertilized control) compared to combined inoculants (46-47% increase). To corroborate the obtained results, a field experiment was conducted using the same treatments. LMR670 as a single inoculant or mixed with M131 was consistently effective leading to common bean yields comparable to N and P fertilized plants (13.07 t ha⁻¹ and 12.35 t ha⁻¹ respectively). In addition, single inoculation with the multi-PGP strain M131 showed positive effects on all common bean growth parameters and yield value (14 t ha⁻¹); exceeding even N and P fertilized control plants. These results suggest that the strains LMR670 and M131 can be used, in a single or combined inoculation, as effective biological fertilizers for common bean cultivation to replace phosphorus and nitrogen fertilizers. Globally our results highlight the potential of native phytobeneficial strains for successful nodulation, growth and yield of common bean under N and P-deficient conditions.

Keywords: *Agrobacterium*, co-inoculation, nutrients scarcity, PGPR, *Phaseolus vulgaris* L.

INTRODUCTION

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is currently estimated to be one of the most important food legumes in the world. Unlike other legumes, common bean is considered as a weak nitrogen fixer. This is due in particular to the genetic characteristics of symbiotic partners as well as soil and environmental conditions (Assefa *et al.*, 2019). To address this issue, intensive efforts are made worldwide to increase the natural process of nitrogen fixation through cultivar selection (Barbosa *et al.*, 2018) and promote bean growth through inoculation with selected bacteria (e.g. Debade *et al.*, 2016).

During the past decades, considerable interests in nitrogen fixing bacteria and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) have emerged for sustainable agricultural practices and for crop yield increase at a low cost (O'Callaghan, 2016). PGPR have been reported to exhibit various beneficial properties such as phytohormone production (Backer *et al.*, 2018), and inorganic P solubilization (Oteino *et al.*, 2015). They are also reported to provide iron to iron-starved plants through the production of siderophores (Maldonado *et al.*, 2020) and enhance plant stress tolerance such as salinity, drought and heavy metals (Enebe and Babalola, 2018). Thus, micro-organisms possessing PGP properties can be used as bio-inoculants to promote plant growth and development

