

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)

Département des Biotechnologies

MEMOIRE DE MAGISTER

Option : Phytopathologie

**Effets des Rhizobactéries phytobénéfiques sur la
phytostimulation et la nodulation.**

Par

BENYOUCEF Meriem

Devant le jury composé de :

H.BELKAHLA	Professeur, USDB, Blida 1	Présidente
F.BENREBIHA	Professeur, USDB, Blida 1	Examinatrice
A.RIBA	Professeur, USBB, Boumerdes	Examineur
M.BENCHABANE	Professeur, USDB, Blida 1	Promoteur

Blida, Novembre 2015

REMERCIEMENTS

Avant de présenter les résultats de ce travail, je voudrais remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à sa réalisation.

Je n'arrive pas à trouver de mots suffisamment forts pour exprimer la reconnaissance que j'ai à l'égard de mon promoteur, le **Pr BENCHABANE Messaoud**, que ce soit sur le plan professionnel ou personnel. Pour sa rigueur scientifique et professionnelle, pour sa lucidité, son optimisme, sa passion et sa détermination, pour sa bonne humeur et sa disponibilité. Merci pour tous ce que vous m'avez appris et enseigné durant ma formation..Merci de m'avoir fait partager vos connaissances et votre expérience sur les *Pseudomonas*. Pour les heures passées à lire ce manuscrit.

Monsieur, Merci de m'avoir remotivé au moment où mes conditions ne me permettaient plus de continuer ce travail, lorsque mes expériences ne fonctionnaient pas et lorsque tous paraît floue devant moi...je vous suis très reconnaissante.

Mes sincères remerciements vont au **Pr BELKAHLA Hadjira**, (professeur à l'université de Blida 1), de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury. Qu'elle trouve ici ma reconnaissance et mon respect les plus sincères. Je vous remercie Madame également pour m'avoir accueillie ci chaleureusement au sein de votre laboratoire, pour vos conseils, vos encouragements, votre remarquable serviabilité et votre sympathie, je vous remercie pour l'enseignement que vous m'avez assuré et les précieuses connaissances que vous m'avez transmis durant toutes mes années d'études.

Je tiens également à remercier **Pr BENREBIHA Fatiha**, Professeur à l'université de Blida 1, qui m'a fait l'honneur d'avoir accepté d'être parmi le jury de ce mémoire, et de m'avoir consacré du temps pour d'examiner et juger ce travail, Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa présence.

Mes sincères remerciements s'adressent au **Pr RIBA**, Professeur à la faculté des sciences à l'université de Boumerdes pour avoir bien accepté malgré ses préoccupations, de faire partie du jury, et pour l'effort qu'il a déployé pour examiner ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Je ne saurais oublier de remercier Mme **Djamila**, Ingénieur du laboratoire de la phytopathologie. Un grand Merci pour m'avoir soutenue tout au long de cette formation, depuis les premiers TP de la 4^{eme} année jusqu'à présent, Merci pour

toute l'aide que tu m'as apportée et tout ce que tu m'as appris, Merci pour ta gentillesse de chaque jour, ton amitié et ta disponibilité. Merci pour ton soutien dans les moments de doute et ta motivation ferme et permanente.

Je remercie également l'ingénieur de la serre de virologie **Walid**, pour son aide, ses encouragements, sa serviabilité et surtout pour sa gentillesse, qu'il trouve ici mes sincères reconnaissances.

Je te remercie également, Toi qui se reconnaîtras à la lecture de ces quelques lignes qui ne sauraient exprimer tout ce que je ressens..Toi qui m'a accompagné tout au long de ce travail et dans la majorité des manipulations.. Merci d'avoir été là dans ces moments (que je n'espère pas trop nombreux) où j'accusais une baisse de régime et de moral. Merci pour toute l'aide inconditionnelle que tu m'a apporté..Tes encouragements m'ont donné la force de m'accrocher. J'ai tenu le coup grâce à toi et si aujourd'hui j'en arrive là, c'est aussi grâce à toi...Merci énormément.

Pour leur inestimable soutien et leur présence au quotidien, pour leurs encouragements qui me poussent de plus en plus vers la réussite, Pour la place unique qu'ils occupent dans ma vie...mes très chers parents.. Sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Un grand Merci du fond de mon cœur pour votre amour, vos sacrifices et votre contribution à faire de moi et de mes frères des personnes meilleurs...cette stabilité dans ma vie je vous la dois..Que DIEU vous protège pour moi.

RESUME

L'objectif de notre travail est de mettre en évidence les effets phytobénéfiques de deux souches PGPR (*Rhizobium phaseoli* et *Pseudomonas fluorescens C7R12*) en application individuelle ou combinée sur l'espèce *Phaseolus vulgaris* var. Tema, en conditions semi-contrôlés sous serre en verre. Les effets de phytostimulation ont été évalués dans deux milieux différents, l'un dépourvu de sel et l'autre en présence de sel à 3 niveaux de salinité (3 g/l, 8 g/l et 12 g/l).

La bactérisation des plants en conditions naturelles ou avec stress salin depuis le stade semence, a induit des effets positifs sur la phytostimulation de leur croissance. En absence du NaCl, les gains obtenus étaient appréciables pour l'ensemble des paramètres étudiés, avec la supériorité des résultats de l'application combinée (co-inoculation) des deux souches à l'exemple de la surface foliaire (236% de gain), la biomasse fraîche aérienne (166%) et la biomasse fraîche racinaire (311%). La bactérisation des plants a induit également des effets positifs sur le taux de germination et sa cinétique d'évolution, cet effet est plus apparent en présence du NaCl où le taux de germination final a été considérablement amélioré (de 70 à 100%).

En présence des différentes concentrations de NaCl, nous avons constaté que la salinité affecte très négativement les paramètres morphologiques des plantes et augmente au niveau cellulaire la teneur en osmoprotecteurs (proline et sucre). Néanmoins, en présence des PGPR dans le milieu, le degré de tolérance des plantes a été considérablement amélioré avec une stimulation de la croissance des différents organes mesurés. Les gains enregistrés sont variables en fonction de la souche utilisée et de son application individuellement ou en combinaison et de la dose de NaCl, les meilleures performances ont été notées avec l'application combinée (co-inoculation) des deux souches (125,76% de gain en surface foliaire, 509% en biomasse fraîche aérienne, 552% en biomasse sèche racinaire et 45% en nombre de nodules).

Mots clefs : PGPR, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium phaseoli*, Légumineuses, salinité.

ملخص

الهدف الاساسي من دراستنا التجريبية هو اظهار التأثيرات الايجابية لعزلتين من بكتيريا المحيط الجذري للنبات (*Pseudomonas spp fluorescens C7R12 et Rhizobium phaseoli*) باستخدامها منفردة او مجتمعة على تحفيز نمو نبات الفاصولياء (*Phaseolus vulgaris*) تشكيلة Tema . تم العمل التجريبي في بيت زجاجي تحت ظروف نصف متحكممة. التأثيرات الايجابية للعزلتين اجريت في وسطين مختلفين الاول وسط طبيعي و الثاني وسط مالح مع ثلاث درجات من الملوحة (3غ/ل 8.غ/ل. 12غ/ل).

اظهرت المعالجة البكتيرية للنبات منذ مرحلة الانتاش و في كلا الوسطين (مع او بدون ملح) نتائج ايجابية على تحسين النمو. المكاسب المتحصل عليها لجميع المعالم المدروسة كانت جد مرضية في الوسط الخالي من الملوحة مع افضلية الاستعمال المزدوج للعزلتين, مثل 236% من المكاسب في مساحة الاوراق, 166 % و 311 % في الوزن الطازج للجزء العلوي و الجذري للنبات على التوالي. متابعة انتاش البذور اظهرت بوضوح التأثيرات الايجابية للعزلتين على النسبة النهائية لانتاش البذور و على تطوره عبر الوقت. هذا التأثير واضح بشكل كبير في الوسط المالح حيث تحسنت نسبة الانتاش الى حد كبير. مع وجود مختلف تركيزات الملح في الوسط. استنتجنا ان الملوحة اثرت بطريقة جد سلبية على المعالم المورفولوجية للنبات مع زيادة في المحتوى الخلوي ل osmoprotecteurs (البرولين و السكر) . لكن تواجد بكتيريا المحيط الجذري في الوسط حسن بدرجة كبيرة قدرة النبات على تحمل ملوحة الوسط مع تحفيز نمو مختلف الاعضاء و تقليل تركيب ل osmoprotecteurs. اظهرت مكاسب النمو المسجلة تغيرات راجعة للاستعمال البكتيري المنفرد او المزدوج و الى درجة الملوحة. حيث ان الاستعمال المزدوج لعزلي البكتيريا اظهر احسن النتائج (125,76% من الزيادات في مساحة الاوراق, 509% و 552% في الوزن الجاف للجزء العلوي و الجذري للنبات, و 45% في تشكيل العقد البكتيرية).

الكلمات المفتاحية : بكتيريا المحيط الجذري النافعة. تحفيز نمو النبات. / *Rhizobium phaseoli*

Pseudomonas spp fluorescens . تشكيل العقد البكتيرية. الملوحة

ABSTRACT

The objective of our work is to demonstrate the beneficial effects of two PGPR strains (*Rhizobium phaseoli* and *Pseudomonas fluorescens* C7R12) individually or combined (organized) on *Phaseolus vulgaris* Var. *Tema*, in conditions semi-checked under glassed greenhouse. The effects of phytostimulation were estimated in two different circles the one devoid of salt and the other one under salinity conditions with 3 measures of NaCl (3 g/l, 8 g/l and 12 g/l).

The bacterisation of plants in presence and in absence of salt stress since the stage seed led positive effects on the phytostimulation of their growth. In absence of the NaCl the obtained gains were considerable for all the parameters studied with the superiority of the results when the strains are combined, exceed 236 % of foliar on-surface gain, 166 % in air fresh biomass and 311 % in fresh root's biomass. The follow-up of the seeding shows clearly the beneficial effect of our strains on the final germination's rate and on the kinetics of its evolution, this effect is more visible in the presence of NaCl where the final rate of seeding was considerably improved.

In the presence of the various concentrations of NaCl, we noticed that the salinity affects very negatively the morphological parameters of plants and increases at the cellular level the content of osmoprotectors (proline and sugar). Nevertheless, in the presence of PGPR in the environment, the degree of tolerance of plants was considerably improved with a considerable stimulation of the growth of the various moderate organs, the recorded gains are variable according to the strains used and to its application individually or in combination, and of the concentration of the NaCl, the best performance of which is always the one of the application combined by both strains (125,76 % of foliar surface gain, 509 % in air fresh biomass and 552 % in dries root's biomass and 45 % in number of nodules).

Key words : PGPR, *Pseudomonas spp fluorescens*, *Rhizobium phaseoli*, phytostimulation, nodulation, salinity, legumes.

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS

RESUME

ABSTRACT

ملخص

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

CHAPITRE 1: SYNTHÈSE BIOBIBLIOGRAPHIQUE	16
1 Les rhizobactéries phyto-stimulatrices de la croissance des plantes (PGPR)...	16
1.1 Généralités sur les PGPR.....	16
1.2 Mode d'action des PGPR	16
1.2.1 Biofertilisation.....	16
1.2.2 Rhizorémédiation et control du stress.....	17
1.2.3 La phyto-stimulation	18
1.2.4 Biocontrol	18
1.2.4.1 Antagonisme	18
1.2.4.2 l'induction de la résistance systémique	19
1.2.4.3 Compétition pour l'espace et les nutriments	19
1.2.4.4 Compétition pour le fer	20
1.3 Les PGPR comme biofertilisants microbiens.....	20
1.3.1 Action des biofertilisants.....	20
1.4 Cas des <i>Pseudomonas</i> fluorescents	21
1.4.1 Généralités sur les <i>Pseudomonas</i>	21
1.4.2 Mécanismes de protection contre les agents phytopathogènes.....	23
1.4.3 Mécanismes de phyto-stimulation.....	25
1.4.3.1 Amélioration de l'alimentation minérale de la plante.....	27

1.4.3.2 Production de substance de croissance	27
1.5. Cas du genre <i>Rhizobium</i>	27
1.5.1 La symbiose légumineuses-Rhizobia fixatrice d'azote.....	27
1.5.2 Les Flavonoïdes : molécules signal de la symbiose.....	28
1.5.3 Etapes précoces de la symbiose Rhizobium/Légumineuses.....	30
1.5.4 Fonctionnement des nodosités.....	33
2. Effet de la salinité sur la culture du haricot.....	34
2.1 Généralités sur la culture du haricot	34
2.2 Facteur affectant la fixation de l'azote atmosphérique chez le haricot	34
2.3 Généralités sur la salinité	35
2.3.1 Définition	35
2.3.2 Problèmes de salinité des sols	36
2.3.3 Effet de la salinité sur les plantes	36
2.3.4 Effets de la salinité sur la symbiose rhizobia-légumineuses	37
2.3.4.1 Les rhizobia associés au haricot.....	37
2.3.4.2 Effet sur le processus d'infection et le développement des nodules	37
2.3.4.3. Effet sur l'activité de la nitrogénase et la respiration nodulaire	38
2.3.4.4 Effet sur le métabolisme carboné.....	38
2.3.5 Les stratégies d'adaptation.....	39
2.3.5.1 Ajustement osmotique.....	39
2.3.5.2 Régulation de la croissance.....	40
2.3.5.3 Biosynthèse d'osmoprotecteurs.....	40
2.3.5.4 Induction du métabolisme oxydatif.....	40
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES	42
1. Matériels biologiques et condition de culture.....	42
1.1 Matériel vegetal.....	42
1.2 Souches bactériennes.....	42
1.3 Préparation des inoculums	43
1.4 Inoculation bactérienne.....	43
1.5 Protocole expérimentale et conduite cultural.....	44
1.5.1 Dispositif experimental.....	44
1.5.2 Application du stress salin.....	44
2. Evaluation de la germination.....	45

3. Les paramètres ecophysiologiques étudiés.....	46
3.1 Paramètres morphologiques.....	46
3.2 Nombre de nodules.....	46
3.3 Paramètres physiologiques.....	47
4. Analyse statistique.....	49
Chapitre 3 : RÉSULTATS	50
1. Evaluation de la phytostimulation.....	50
1.1 Taux de germination.....	50
1.2 Cinétique de germination.....	51
1.3 Paramètres morphologique de la partie aérienne.....	53
1.4 Paramètre morphologique le la partie racinaire.....	67
1.5 Nombre de nodules.....	73
1.6 Evaluation des gains.....	76
1.7 Teneur en sucres soluble.....	79
1.8 Teneur en proline.....	80
Chapitre 4: DISCUSSION	82
CONCLUSION	92
APPENDICES	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1: Mécanismes d'action des <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents dans le biocontrol des agents phytopathogènes.....	24
Figure 1.2: Représentation schématique de l'effet de l'absence (gauche) ou de la présence (droite) des PGPR producteurs d'ACC désaminase quand la plante subit un stress (biotique ou abiotique).....	26
Figure 1.3: A) Photographie de nodules déterminés sur des racines de <i>Phaseolus vulgaris</i> (haut) et nodules indéterminés sur des racines de Vesce (bas), B) Photographie au microscope optique d'une section de nodule montrant le tube d'infection sur une racine de pois.....	28
Figure 1.4: Quelques flavonoides impliqués dans l'interaction Rhizobia-légumineuse. Structure des facteurs Nod.....	29
Figure 1.5: Différentes étapes de l'établissement de la symbiose légumineuse-Rhizobia.....	30
Figure 1.6: Coupe transversale d'un nodule de haricot.....	31
Figure 1.7: Schéma illustrant le métabolisme général de la fixation symbiotique de N ₂ au niveau des nodules et les échanges de métabolites avec la partie aérienne.....	34
Figure 2.1: Courbe étalon du dosage des sucres totaux.....	48
Figure 2.2: Courbe étalon du dosage de la proline.....	49
Figure 3.1: Effet des différentes applications bactérienne sur la cinétique de germination des graines mises à l'obscurité aux différentes doses de NaCl.....	52
Figure 3.2: Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la longueur des tiges des plants bactérisés et non bactérisés.....	54
Figure 3.3: Variation du nombre des feuilles en fonction de l'effet conjugué des doses de NaCl et des PGPR.....	54
Figure 3.4: Effet de l'inoculation individuelle ou combinée des deux souches PGPR sur la variation de la surface foliaire.....	56
Figure 3.5: Effet du NaCl sur la surface foliaire du haricot.....	56

Figure 3.6: Variation de la surface foliaire des plants bactérisés et non bactérisés aux différentes doses de NaCl.....	57
Figure 3.7: Effet conjugué des deux facteurs (PGPR X NaCl) sur la variation de la surface foliaire.....	58
Figure 3.8: Effet de l'inoculation individuelle ou combinée des deux souches PGPR sur la biomasse fraîche aérienne.....	59
Figure 3.9: Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la biomasse fraîche aérienne des plants bactérisés et non bactérisés.....	60
Figure 3.10: Effet de l'application des PGPR et des doses du NaCl sur la biomasse fraîche aérienne.....	60
Figure 3.11: Variation de la biomasse fraîche aérienne en fonction de l'effet conjugué des doses du NaCl et des PGPR.....	61
Figure 3.12: Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la biomasse sèche aérienne des plants bactérisés et non bactérisés.....	62
Figure 3.13: Variation du poids sec aérien en fonction de l'effet conjugué des doses du NaCl et des PGPR.....	63
Figure 3.14: Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la longueur des tiges des plants bactérisés et non bactérisés.....	64
Figure 3.15: Variation de la longueur de la tige en fonction de l'effet conjugué des doses de NaCl et des PGPR.....	65
Figure 3.16: Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la biomasse fraîche racinaire des plants bactérisés et non bactérisés.....	67
Figure 3.17: Effet conjugué de la salinité et des PGPR sur la biomasse fraîche racinaire.....	68
Figure 3.18: Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la biomasse sèche racinaire des plants bactérisés et non bactérisés.....	70
Figure 3.19: Variation du poids sec racinaire en fonction de l'effet conjugué des doses de NaCl et des PGPR.....	70
Figure 3.20: Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la longueur des racines des plants bactérisés et non bactérisés.....	72
Figure 3.21: Variation de la longueur de la racine en fonction de l'effet conjugué des doses de NaCl et des PGPR.....	73
Figure 3.22: Effet des différentes doses de NaCl sur la variation du nombre de nodules des plants bactérisés et non bactérisés.....	74

Figure 3.23: Variation du nombre de nodules en fonction de l'effet conjugué des doses du NaCl et des PGPR.....	74
Figure 3.24: Variation de la teneur en sucres solubles en fonction des doses du NaCl.....	79
Figure 3.25: Variation de la teneur en sucres solubles en fonction de l'effet conjugué des doses de NaCl et des PGPR.....	79
Figure 3.26: Effet des doses de NaCl sur la teneur en Proline.....	80
Figure 3.27: Effet conjugué des doses de NaCl et des PGPR sur la teneur en proline.....	80
Tableau 1.1: Déterminants des <i>Pseudomonas</i> induisant de l'ISR.....	26
Tableau 1.2: Différences principales entre les nodules de type déterminé et indéterminé.....	32
Tableau 3.1: Effet de l'application conjuguée des différentes doses de NaCl et des souches PGPR sur l'élaboration des paramètres morphologiques de la partie aérienne.....	66
Tableau 3.2: Effet de l'application conjuguée des différentes doses de NaCl et des souches PGPR sur l'élaboration des paramètres morphologiques de la partie racinaire et du nombre de nodules.....	75

INTRODUCTION

Pour satisfaire les exigences et les besoins alimentaires d'une population mondiale de plus en plus croissante, l'homme a fait recours à des pratiques agronomiques intensives qui se basent essentiellement sur l'utilisation des intrants chimiques (fertilisants, produits phytosanitaires...). Malgré l'efficacité affichée, résultant de ces intrants chimiques sur l'amélioration et l'augmentation des rendements, la quasi-totalité des études soulignent les conséquences néfastes de cette pratique, qui a engendré des déséquilibres très nocifs sur l'homme et son environnement, notons principalement l'accumulation des résidus dans les produits récoltables, la pollution des sols, le développement des mécanismes de résistance chez les bioagresseurs des plantes, et même la disparition de certaines populations faunistiques des écosystèmes cultivés [1, 2, 3].

De telles actions ont suscité une prise de conscience pour favoriser une gestion orientée vers un développement durable. Ainsi, les réflexions se sont tournées vers la conception et le développement de méthodes d'amélioration des rendements plus respectueuses de l'environnement via une utilisation des amendements plus raisonnés, la diminution de l'apport des produits phytosanitaires, ou encore le recours aux potentialités biologiques [4]. Parmi ces dernières, les rhizobactéries phytobénéfiques et plus particulièrement le groupe des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) constituent un pôle d'attraction et plusieurs études dénotent leurs aptitudes dans la stimulation de la croissance des plantes et l'induction de leur résistance contre plusieurs maladies [5, 6, 7].

Parmi les PGPR appliquées, il y'en a ceux qui sont symbiotiques et d'autres non symbiotiques. Les souches non-symbiotiques les plus étudiées appartiennent au groupe des *Pseudomonas* fluorescents [8]. Leurs principaux modes d'action sont la solubilisation des nutriments, la production de phytohormones, l'inhibition de micro-organismes phytopathogènes par la production d'antibiotiques [9] et l'induction de la résistance systémique chez la plante [10].

Le groupe des *Rhizobium* regroupe les souches les plus étudiées en terme de PGPR symbiotiques, qui permettent vis leur interaction avec les plantes (type légumineuses) de fixer et d'utiliser l'azote atmosphérique. Les légumineuses à graines, tel que le haricot (*Phaseolus vulgaris L.*) est d'un intérêt économique très marqué, justifiant leur culture dans de nombreuses régions à travers le monde.

En Algérie, les haricots secs constituent un élément important dans le modèle de consommation dominant de la population; elles constituent un apport nutritionnel riche en protéines, glucides, minéraux et en fibres. Le cycle de leur culture coïncide avec les périodes de l'année les plus chaudes, où l'alimentation hydrique de la plante s'assure principalement par l'irrigation, qui contribue grandement à l'accroissement de la salinité des sols. La culture de l'haricot se trouve confrontée, dans certaines régions, au stress salin qui limite sa pratique et qui engendre une nette diminution de ses aptitudes symbiotique rhizobienne, induisant une mauvaise efficacité de fixation de l'azote, voire même son annulation [11].

Dans les pays aux climats aride et semi-aride, l'évaporation rapide de l'eau pendant la saison sèche provoque une augmentation de la concentration des sels solubles, dans les horizons superficiels des sols, pouvant modifier l'environnement immédiat des cultures dont le développement en est alors perturbé. Les accumulations des sels solubles transforment profondément les propriétés physiques et chimiques du sol [12]. La salinisation des sols de ces régions souvent fertiles n'est pas seulement due aux conditions climatiques, mais également à l'activité de l'homme, qui pour des raisons économiques, a développé une agriculture intensive souvent mal contrôlée. Le fort ensoleillement et la faible pluviométrie ont obligé les agriculteurs à irriguer en quantité importante et souvent avec une eau saumâtre, les sels se sont accumulés au cours des années à la surface des sols sans pouvoir être lessivés par les eaux de pluie qui deviennent de plus en plus rares [13].

La contrainte de salinité des sols reste l'un des facteurs majeurs limitant la production des légumineuses particulièrement lorsque la nutrition azotée est assurée par la FSN (Fixation symbiotique d'Azote) [14, 15].

Afin d'améliorer la croissance de l'haricot sous contrainte saline, il est nécessaire d'améliorer son niveau de tolérance à ce type de stress. A cet effet, plusieurs efforts sont déployés, basés principalement sur les travaux de sélection classique (génotypes résistants

ou tolérants), néanmoins cette technique a connu un succès limité en raison de sa lourdeur en plus du suivi de la complexité génétique [16].

Parmi les autres moyens envisagés, l'utilisation des PGPR est considérée comme l'une des approches recherchées dans l'amélioration de la performance de l'interaction légumineuse - Rhizobiums et dans la réduction des effets du stress salin. Plusieurs études ont rapporté que la coinoculation des légumineuses par *Rhizobium* spp avec des souches phytobénéfiques de *Pseudomonas* stimule la croissance des plantes en affectant positivement quelques fonctions physiologiques [16 ,17]. En effet, cette coinoculation améliore la croissance de la plante, en stimulant directement la survie et la croissance des Rhizobiums associés dans la rhizosphère [18], en élargissant le système racinaire par la synthèse de phytohormones ce qui aboutit à l'augmentation des sites potentiels de colonisation et l'augmentation de d'adsorption racinaire [19, 20].

Notre étude consiste principalement à mettre en évidence les effets bénéfiques de la coinoculation, par deux souches PGPR (*Pseudomonas fluorescens* C7R12 et *Rhizobium phaseoli*) sur la promotion de la croissance des plantes du haricot, dans un milieu naturel, ainsi que sur l'amélioration de leur tolérance au stress salin.

.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les rhizobactéries phytostimulatrices de la croissance des plantes (PGPR)

1.1 Généralités sur les PGPR

Les rhizobactéries sont des bactéries qui se trouvent dans la rhizosphère. Ces dernières puisent dans les exsudats les ressources nécessaires pour leur métabolisme et sont capables de se multiplier et de rivaliser avec les autres microorganismes pour occuper cette zone riche en éléments nutritifs.

L'association, le rôle et les effets que les rhizobactéries exercent sur la plante sont dus succès de leur établissement dans la rhizosphère; elles peuvent avoir un effet positif, négatif ou neutre sur la croissance des plantes [21].

Près de 5% des rhizobactéries sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des agressions biotiques et/ou abiotiques. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), ce terme a été défini pour la première fois par Kloepper et Schroth en 1978 [22]. Ces bactéries suscitent un intérêt croissant en agronomie et leur utilisation comme agents de lutte biologique peut être très prometteuse pour une agriculture durable.

1.2 Mode d'action des PGPR

1.2.1 Biofertilisation

Les rhizobactéries qui stimulent la croissance des plantes en améliorant l'assimilation des nutriments sont dites biofertilisants, ces bactéries améliorent la nutrition des plantes par les moyens de fixation d'azote, l'augmentation de la disponibilité des nutriments dans la rhizosphère, la promotion de la surface racinaire, ou en améliorant la symbiose associative de la plante hôte.

Les plantes peuvent assimiler l'azote du sol en tant que nitrite, le nitrate ou l'ammoniac, ces formes d'azotes ne sont pas abondantes dans la plupart des sols et la fertilisation d'azote employée dans l'agriculture est fréquemment perdue pendant la filtration minérale de ces engrais. Les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique comme les Rhizobiums et les Bradyrhizobiums peuvent établir une symbiose en formant des nodules sur les racines des légumineuses tel que le soja, l'arachide, haricot, la fève etc. ..., dans laquelle ils convertissent l'azote (N_2) qui peut être utilisé par la plante comme une source d'azote [23]. Cependant, ce processus est pratiquement limité aux légumineuses. D'autre part, plusieurs bactéries non symbiotiques ont été identifiées comme des fixatrices libres d'azote (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus polymyxa*,). L'inoculation des PGPR augmente habituellement le poids sec de la plante, le nombre de fleurs et la production de grains. Cependant, l'augmentation de rendement causée par cette inoculation pourrait souvent être attribuée à une augmentation du développement des racines qui permet les meilleurs taux d'assimilation d'eau et d'éléments minéraux [24].

Le Phosphore (P) est un autre élément essentiel dans la nutrition des plantes, la majorité du phosphore existant au niveau du sol est en forme non soluble non assimilable par les plantes, certains PGPR sont capables de solubiliser ces formes de phosphore par l'acidification [25], la chélation, ou bien par l'application de certaines enzymes [26]. Les bactéries telles que *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* sont reportées comme étant des bactéries solubilisant le phosphore [27].

L'inoculation par les PGPR peut également augmenter l'assimilation de plusieurs éléments comme le Ca, K, Fe, Cu Mn et le Zn [28].

1.2.2 Rhizorémédiation et contrôle du stress

Plusieurs études sur le potentiel des PGPR dans la dégradation de la pollution du sol ont été publiées [29, 30, 31]. La contribution de la population rhizobactérienne dans la dégradation des polluants permet aux plantes d'émerger naturellement dans des sites infectés. Des études concentrées sur la dégradation des composants, tels que les herbicides, les pesticides, et les antibiotiques ont été effectuées, bien qu'elles ont fourni peu d'informations sur les populations microbiennes [30].

Quand les plantes sont exposées à des conditions de stress, elles répondent avec une augmentation des niveaux d'éthylène qui peut provoquer des dysfonctionnements au niveau cellulaire [32]. Une haute concentration d'éthylène peut être nocive, en incitant la défoliation et d'autres perturbations physiologiques cellulaires qui peuvent affecter le développement de la plante [31].

Beaucoup de PGPR détruisent 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), qui est un précurseur de l'éthylène, via la production de l'enzyme ACC deaminase, qui facilite à son tour la croissance des plantes [33].

1.2.3 La phytostimulation

Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par divers mécanismes, ils peuvent agir comme bio-fertilisants des sols en fixant l'azote atmosphérique qui pourra être par la suite utilisé par les plantes, améliorant leur croissance lorsque l'azote du sol est limitant. Ils sont utilisées également en tant qu'inoculat pour améliorer le développement racinaire via la production de phytohormones [34], telles que des auxines dont l'acide indole acétique (AIA), des cytokinines et des gibbérellines [35, 36, 20].

Il a également été montré que certaines bactéries sont capables de favoriser la croissance des plantes via l'amélioration de la mise en place ou du fonctionnement des symbioses entre les racines et les bactéries fixatrices d'azote [37] et les champignons mycorhizogènes [38, 39].

1.2.4 Biocontrôle

Les PGPR peuvent agir indirectement par leurs activités de biocontrôle contre les agents pathogènes par plusieurs mécanismes, incluant l'antagonisme, l'induction des systèmes défensifs des plantes et aussi par voie de compétition:

1.2.4.1 Antagonisme

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques.

Les souches de *Bacillus subtilis* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants, par exemple : la zwittermycine-A, la kanosamine [40], des lipopeptides des familles de la surfactine, de l'iturine et de la fengycine [41, 42, 43] et encore des enzymes hydrolytiques (β -1,3- gluacnase) qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques [44]. D'autre part chez *Pseudomonas*, d'autres molécules antifongiques comme le HCN, la viscosamide, la pyoluteorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol, la pyrrolnitrine, les phenazines et les butyrolactones sont impliquées dans le biocontrôle [45].

Ces PGPR montrent non seulement un large spectre de diversité dans le type mais également dans le nombre d'antibiotiques produits [9, 46]. Par exemple, certaines souches de PGPR ont la capacité d'excréter des métabolites qui jouent un rôle important dans l'inactivation des facteurs de germination du pathogène ou la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines. Ainsi, la capacité de certaines bactéries à parasiter et à dégrader les spores des pathogènes à travers la production d'enzymes détruisant la barrière cellulaire a été démontrée [47].

1.2.4.2 l'induction de la résistance systémique

Certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé «résistance systémique induite» (ISR, Induced Systemic Resistance) [48].

L'induction d'une telle capacité de défense est systémique : le traitement des racines par des PGPR produit des effets protecteurs sur d'autres parties de la plante, sans migration des bactéries, induisant l'ISR au travers du système vasculaire de la plante ou à travers l'activation les tissus [40].

1.2.4.3 Compétition pour l'espace et les nutriments

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables par les micro-organismes pathogènes et par conséquent, leur croissance [49, 50]. Cependant, cette corrélation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée

n'est dans certains cas pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale. On a beaucoup discuté l'idée qu'une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie. Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère [45].

1.2.4.4 Compétition pour le fer

Un cas particulier de compétition pour les nutriments, repose sur la compétition pour le fer. Les micro-organismes ont la capacité de synthétiser des sidérophores qui sont des molécules de faible poids moléculaire, chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. Ces composés ont une grande affinité pour le Fe^{3+} . En s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution de sa croissance [51]. En plus du fer, les siderophores peuvent aussi former des complexes stables avec d'autres métaux (Al, Cd, Cu, Ga, Pb et Zn [52].

1.3 Les PGPR comme biofertilisants microbiens

1.3.1 Action des biofertilisants

Parmi les biofertilisants microbiens, nous citons surtout ceux à base de microorganismes fixateurs d'azote (symbiotique), vivant libres ou en association avec des plantes hôtes. Ces microorganismes utilisent l'azote de l'air comme source d'azote et fournissent ensuite soit par exsudation, soit par décomposition après leur mort, soit à travers la plante à laquelle ils sont associés, de l'azote organique ou minéral qui contribue à maintenir ou améliorer la fertilité du sol et la production végétale.

Les microorganismes producteurs de substances de croissance ou de substances qui favorisent la solubilisation du phosphore du sol sont également considérés comme des biofertilisants (non-symbiotique) [53]. L'usage de biofertilisants bactériens peut réduire les applications des engrais chimiques et par conséquent le coût de production et les risques de pollution chimique.

D'autres catégories de bactéries phyto-bénéfiques sont exploitées comme biopesticides, appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* [51]. Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries, parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et présentent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont faciles à cultiver *in vitro* ou à manipuler au laboratoire [8, 54].

L'utilisation de rhizobactéries pour améliorer la croissance et la santé des plantes repose principalement sur la réussite des inoculations du sol ou des substrats de culture. Les microorganismes, tels que les champignons mycorrhizogènes [55, 56] et les bactéries fixatrices d'azote [57, 55], représentent un potentiel important pour l'amélioration de la croissance des plantes et la lutte biologique contre les maladies d'origine tellurique.

1.4 Cas des *Pseudomonas* fluorescents

1.4.1 Généralités sur les *Pseudomonas*

Pseudomonas forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau [58]. Ces bactéries sont des bacilles Gram négative (Gram-), non sporulés, très généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimioorganotrophes [59].

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe δ des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires [58, 59]. Depuis la découverte du genre *Pseudomonas* [60], beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre. La réorganisation a débuté en 1968, et l'édition de 2005 du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* rapporte une soixantaine d'espèces au genre *Pseudomonas* [61].

Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein de *P. fluorescens*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différents biovars [59].

Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et sont capables de former des associations spécifiques avec leurs hôtes. Ces associations peuvent mener à une maladie chez les plantes hôtes sensibles, comme par exemple de nombreux pathovars de *P. syringae* qui mettent en place des interactions pathogènes avec les plantes [62]. Néanmoins, d'autres espèces de *Pseudomonas* sont capables de mettre en place des interactions mutualistes.

Les *pseudomonas* sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui ont un effet promoteur sur la croissance des plantes. Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste envers les phytopathogènes [63].

Les bactéries PGPR sont des bactéries rhizosphériques dont l'écosystème est constitué de la racine de la plante hôte, des mucilages, des composés exsudés par la plante, du sol environnant les racines et directement sous son influence, mais également des autres organismes du sol. Parmi les composés exsudés par les plantes, comme le cas du blé par exemple, de nombreux acides organiques sont retrouvés tels que les acides fumarique et succinique, des acides aminés ainsi que des sucres simples comme le fructose et le maltose, mais également des oligosaccharides [51].

Il a été montré que les premiers substrats utilisés par les PGPR du genre *Pseudomonas* sont des sucres simples, des acides organiques et des acides aminés, ce qui explique un fort chimiotactisme vers les racines des plantes [45]. La perception de la bactérie par la plante hôte n'est pas un mécanisme complètement élucidé. Deux molécules bactériennes sont à la base de la reconnaissance de la bactérie par la plante. En effet, la flagelline (peptide Flg22) qui est une sous-unité du flagelle polaire des *Pseudomonas* est reconnue par la plante grâce à une protéine kinase associée à la membrane.

Toutefois, cette protéine kinase est habituellement une structure permettant à la plante de reconnaître les pathogènes et de mettre en place une cascade de réactions afin de se défendre. De plus, la reconnaissance de la flagelline est un mécanisme hôte et souche spécifique [48].

L'autre type de molécule permettant la reconnaissance spécifique des bactéries sont les lipopolysaccharide (LPS). La reconnaissance des LPS a été principalement étudiée dans la cadre de la reconnaissance de pathogènes, mais cela s'applique également pour les *Pseudomonas* PGPR. En effet, si la reconnaissance de certains pathogènes se fait par rapport à la structure du LPS et permet la libération par la plante de composés antimicrobiens [50], la reconnaissance spécifique de *Pseudomonas* PGPR se fait également grâce aux LPS sans induction de la réponse hypersensible (HR). Ces molécules sont, en revanche, capables d'induire une résistance locale induite (LIR), ainsi qu'une réponse systémique induite (ISR), permettant à la bactérie de coloniser la plante tout en la protégeant contre d'éventuels pathogènes. De plus, le DAPG produit par ces mêmes bactéries est également capable d'induire l'ISR chez la plante [59].

1.4.2 Mécanismes de protection contre les agents phytopathogènes

Les bactéries PGPR du genre *Pseudomonas* sont dites agents de biocontrôle, car elles confèrent à leur plante hôte une protection contre divers phytopathogènes. Cette protection induite par les *Pseudomonas* fluorescents à la plante hôte est dépendante de différents mécanismes majeurs, tels que la rhizocompétence, l'antibiose et la stimulation des systèmes de défense des plantes (Figure 1.1).

La rhizocompétence est définie comme étant la capacité d'une souche à coloniser plus ou moins efficacement la rhizosphère. Cette rhizocompétence indique que la souche bactérienne ou fongique ait la capacité de coloniser de façon efficace la racine par différents moyens, tels que la présence de flagelles, la présence de LPS de surface impliqués dans la reconnaissance plante/bactérie. D'autre part, la rhizocompétence signifie également que le micro-organisme soit bien adapté à l'utilisation des composés exsudés par la plante (sucres, acides carboxyliques, certains acides aminés...).

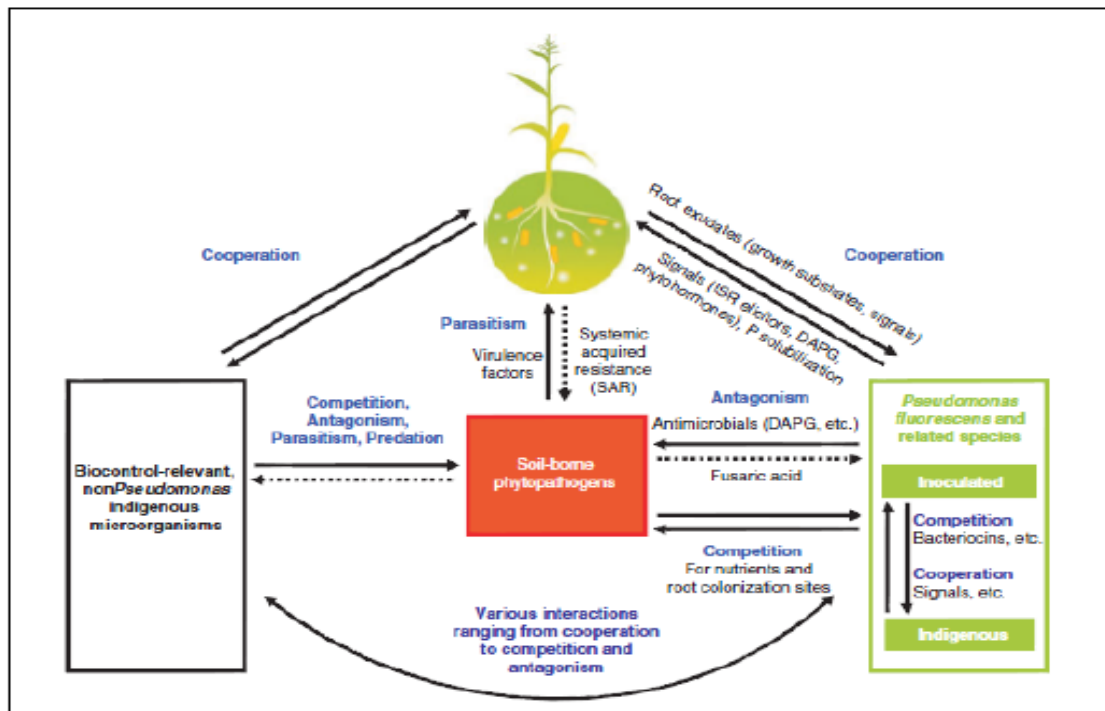


Figure 1.1 : Mécanismes d'action des *Pseudomonas* spp fluorescents dans le biocontrôle des agents phytopathogènes [65].

Une compétition pour les ressources trophiques explique également une importante adaptation et ceci est étudié pour la compétition pour les ressources en fer grâce à un système spécifique de sidérophores [66, 52]. Cet élément est indispensable au métabolisme des organismes aérobies. Les *Pseudomonas fluorescens* synthétisent des sidérophores appelés pyoverdines ou pseudobactines montrant une forte affinité pour le fer ferrique et le rendre disponible pour le microorganisme hôte, mais indisponible à d'autres organismes [86]. Ces molécules sont impliquées dans l'amélioration de la croissance et de la santé des plantes et contribuent à l'acquisition du fer par les végétaux [67].

Les *Pseudomonas* fluorescents ont été utilisés comme des agents de biocontrol dans plusieurs études où leurs activités inhibitrices ont été attribuées en grande partie à la chélation du fer par les siderophores [68, 69, 70]. Les études concernant la possibilité des pyoverdines à supprimer les maladies telluriques des plantes ont été assez développées, depuis les premières études menées par Klopper *et al.* (1980) [66].

L'antibiose, quant à elle, implique principalement la synthèse de composés antimicrobiens par les bactéries du genre *Pseudomonas*. Un grand nombre de métabolites bactériens, synthétisés par *Pseudomonas* (phenazines, DAPG,

pyolutéoline, pyrolnitrite...), ont été détectés et quantifiés dans la rhizosphère et sont décrits comme ayant des propriétés antimicrobiennes [71]. D'autre part, certains composés volatils (HCN) émis par les bactéries du genre *Pseudomonas* ont des effets antibiotiques et jouent un rôle dans la protection de la plante hôte [72]. Enfin, la résistance des plantes contre des pathogènes est essentiellement due à deux voies de signalisation :

- La première est la SAR dont la molécule signal est l'acide salicylique. Lors d'une infection par un pathogène (virus, bactéries ou champignon), la plante répond en augmentant la production d'acide salicylique au niveau du site d'infection aussi bien que dans la plante entière. Dans certains modèles plante/pathogènes, l'acide salicylique, apporté de façon exogène par des *Pseudomonas* fluorescents, a conféré une protection contre les pathogènes [48].
- La deuxième voie de défense des plantes implique le jasmonate comme molécule signal et est appelée ISR. Ce mécanisme peut être activé par certaines bactéries rhizosphériques non pathogènes principalement par la présence de déterminants enchâssés dans leur paroi et synthétisent des molécules diffusibles qui sont perçues par la plante et induisent un mécanisme de résistance (Tableau 1.1).

Toutefois, certaines souches de *Pseudomonas* possèdent le gène de l'ACC désaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) qui est impliqué dans l'amélioration de la croissance de la plante hôte [66]. Cette enzyme peut cliver le précurseur de l'éthylène l'ACC et donc ainsi réduire le taux d'éthylène dans la plante. L'éthylène est une phytohormone qui inhibe la croissance racinaire, et sa diminution, grâce à l'ACC désaminase, permet d'observer une elongation racinaire (Figure 1.2).

1.4.3 Mécanismes de phytostimulation

L'effet de la bio-stimulation directe de la physiologie des plantes par certaines souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents est dû à leur capacité d'engendrer des augmentations en rendement des cultures, liées à une stimulation significative de la germination des graines. Des gains significatifs de la germination et de la levée ont été obtenus sur plusieurs espèces végétales,

notamment avec les grains de Colza [37] et les grains de tomate [73], avec une progression des paramètres de croissance telles que les auxines et les cytokinines [40].

Tableau 1.1 : Déterminants des *Pseudomonas* induisant de l'ISR [10].

Déterminants	Souche bactérienne	Plante hôte
Lipopolisaccharides	<i>P.fluorescens</i> WC374	Radis
	<i>P.fluorescens</i> WC417	Aeabidopsis
		Radis
		Œillet
Sidérophores	<i>Pfluorescens</i> CHAO	Tabac
	<i>P.fluorescens</i> WC347	Radis
Acides salicylique	<i>P.fluorescens</i> P3 pchBA	Tabac
DAPG	<i>P.fluorescens</i> CHAO	Arabidopsis
		Tomate
		<i>P.fluorescens</i> Q2-87

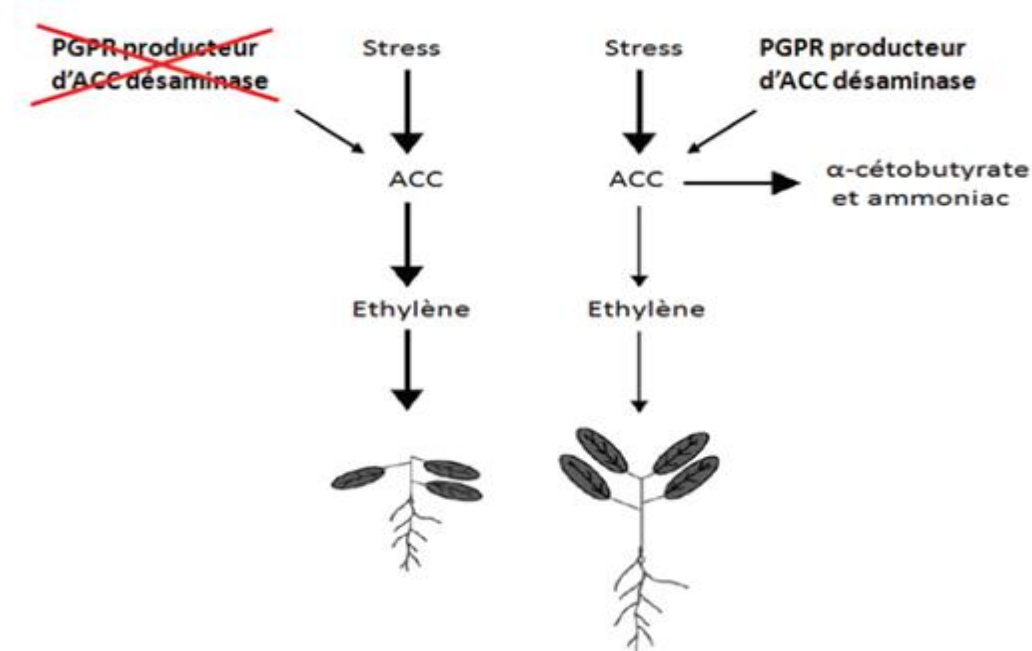


Figure 1.2 : Représentation schématique de l'effet de l'absence (gauche) ou de la présence (droite) des PGPR producteurs d'ACC désaminase quand la plante subit un stress (biotique ou abiotique) [66].

1.4.3.1 Amélioration de l'alimentation minérale de la plante

L'amélioration de l'alimentation minérale de la plante en phosphore a été la première hypothèse proposée pour expliquer l'effet bénéfique enregistré à la suite de la bactérisation de plante [74]. Les espèces *Bacillus megaterium* var *phosphaticum* et *Pseudomonas spp* fluorescents, augmenteraient la concentration en phosphore soluble soit par minéralisation des phosphates organiques, grâce à des phosphatases, soit par solubilisation des phosphates inorganiques sous l'effet d'acides [75].

1.4.3.2 Production de substance de croissance

La production de substance de croissance par les *Pseudomonas* fluorescents a été fréquemment mise en évidence *in vitro* [76]. Ces substances peuvent être absorbées par les racines. Libbertet *al* (1969) [77] ont montré que des auxines produites par des micro-organismes telluriques pouvaient être assimilées par différentes plantes (maïs, pois, concombre).

Différents auteurs ont mis en relation l'aptitude de souches microbiennes à produire des substances de croissance *in vitro* et leur aptitude à modifier, *in vivo*, la morphologie des plantes de manière analogue aux substances de croissance concernées. Ils en concluent que la stimulation de croissance des plantes bactérisées est due à la synthèse microbienne de substance de croissance [78].

1.5 Cas du genre *Rhizobium*

1.5.1 La symbiose légumineuses-Rhizobia fixatrice d'azote

Une des symbioses mutualistes la plus décrite est la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse. Elle implique l'association durable entre une α -protéobactérie de l'ordre des *Rhizobiales* et une plante dicotylédone de la famille des *Fabaceae*. Cette famille comprend 18 000 espèces réparties dans trois sous-familles (sous-familles des *Caesalpinioideae* avec une fleur pseudo-papilionacée, *Mimosoideae* avec une fleur régulière et des *Faboideae* ou *Papilionoideae* avec une fleur typique en papillon).

Les Fabacées, au sens large, sont des plantes herbacées, des arbustes, des arbres ou des lianes. C'est une famille cosmopolite des zones froides à tropicales. Dans le cadre de la symbiose, l'interaction s'établit préférentiellement au niveau

des racines et permet la formation d'organes particuliers appelés nodosités où les bactéroïdes réalisent la fixation atmosphérique de l'azote [79] (Figure 1.3).

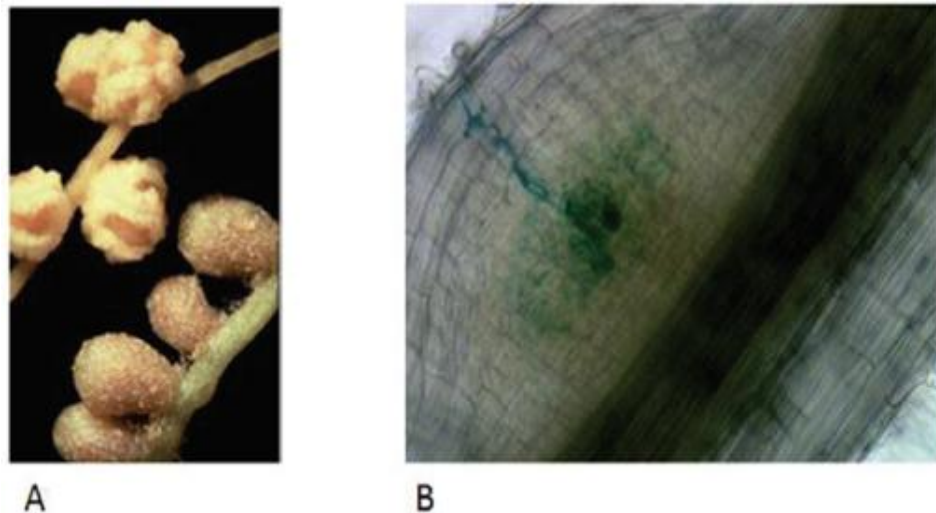


Figure 1.3 : A) Photographie de nodules sur des racines de *Phaseolus vulgaris* (haut) et nodules indéterminés sur des racines de Vesce (bas), B) Photographie au microscope optique d'une section de nodule montrant le tube d'infection sur une racine de pois [79].

Cette symbiose, relativement récente dans l'évolution, dérive d'une ancienne symbiose mycorhizienne qui était répandue dans le règne végétal et permettait à la plante d'obtenir des nutriments phosphatés essentiels [80]. La capacité des *Rhizobia* à coloniser aurait été acquise par un événement de transfert horizontal de gène symbiotique il y a 60 millions d'années, date à laquelle seraient apparues des légumineuses dans le monde vivant [81].

Les gènes de *Rhizobium*, impliqués dans la symbiose, sont souvent localisés au sein d'îlots chromosomiques ou dans des plasmides comme c'est le cas chez *Sinorhizobium meliloti*. Ainsi, les gènes impliqués dans la synthèse des facteurs de nodulation (*nod*, *dol*, *noe*) et la fixation d'azote (*nif* et *nix*) sont localisés sur le plasmide pSymA [79]. De plus, il a été démontré que le transfert horizontal de ces plasmides ou de ces gènes chromosomiques était possible entre espèces de *Rhizobia* [82].

1.5.2 Les Flavonoïdes : molécules signal de la symbiose

Les légumineuses via les racines exsudent dans le sol une grande diversité de métabolites secondaires, dont des flavonoïdes et en particulier des flavones et des iso-flavonoïdes, dans la rhizosphère. Ces flavonoïdes, quand ils sont

reconnus (degré d'oxydation, nature et position des substituants, ...) par les récepteur NodD de la bactérie, régulent l'expression des gènes *nod* (A, B, et C) et la production de facteurs Nod (lipochitine- oligosaccharides)

Les bactéries compatibles sont alors capables de se diriger vers le flux de flavonoïdes par chimiotactisme, ce qui suppose que la spécificité d'hôte s'établit avant le contact physique entre la bactérie et sa plante hôte. Les facteurs Nod, synthétisés par les *Rhizobiaceae*, sont alors spécifiquement reconnus par la plante hôte en fonction de leur structure (longueur et instauration de la chaîne acyle, nombre de monomères de N-acetyl-glucosamine, substituant...) [79]. (Figure 1.4).

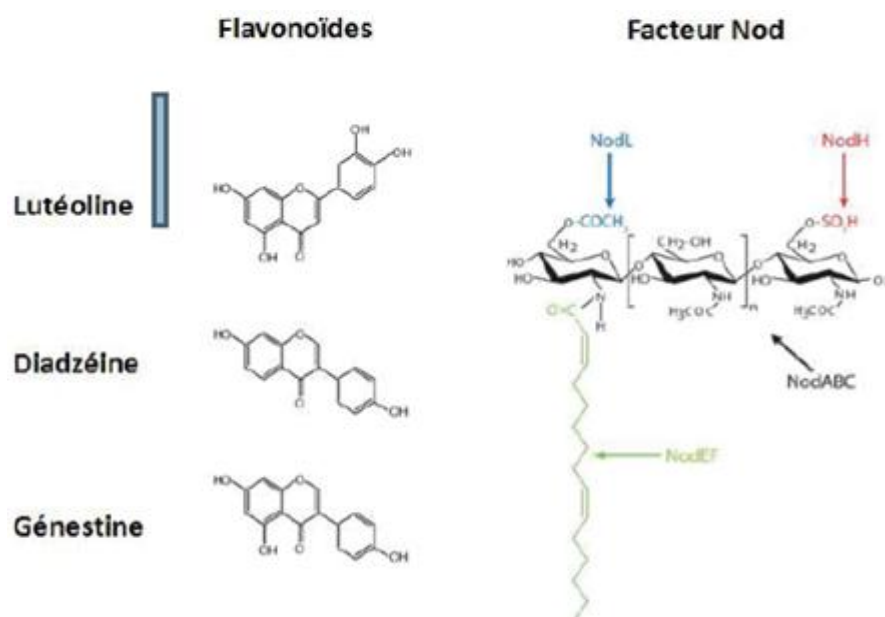


Figure 1.4 : Quelques flavonoïdes impliqués dans l'interaction Rhizobia-légumineuse. Structure des facteurs Nod [79].

Par ailleurs la spécificité d'interaction dans la symbiose *Rhizobium*/légumineuse est dépendante de la reconnaissance des composés phénoliques inducteurs des gènes *nod*. De ce fait cela conduit à des différences d'effets des composés impliqués. Ainsi, certains flavonoïdes sont connus pour être des inhibiteurs ou des antagonistes d'activateurs de l'expression des gènes *nod*, empêchant ainsi la mise en place précoce de l'interaction. Par exemple, la fromonentine a un effet inhibiteur de l'expression des gènes *nod* chez *Rhizobium trifolii* [83], alors que ce même composé active l'expression des gènes *nod* de *Bradirhizobium japonicum*.

1.5.3 Étapes précoces de la symbiose *Rhizobium*/Légumineuses

Pour l'établissement de la symbiose, les *Rhizobia* induisent la formation d'un nouvel organe au niveau de la racine de la plante hôte appelé nodule. Le nodule racinaire est alors le lieu où la prolifération bactérienne est possible, ainsi que la réalisation de la fixation d'azote par ces micro-organismes. La mise en place des nodosités se déroule en quatre étapes majeures (Figure 1.5).

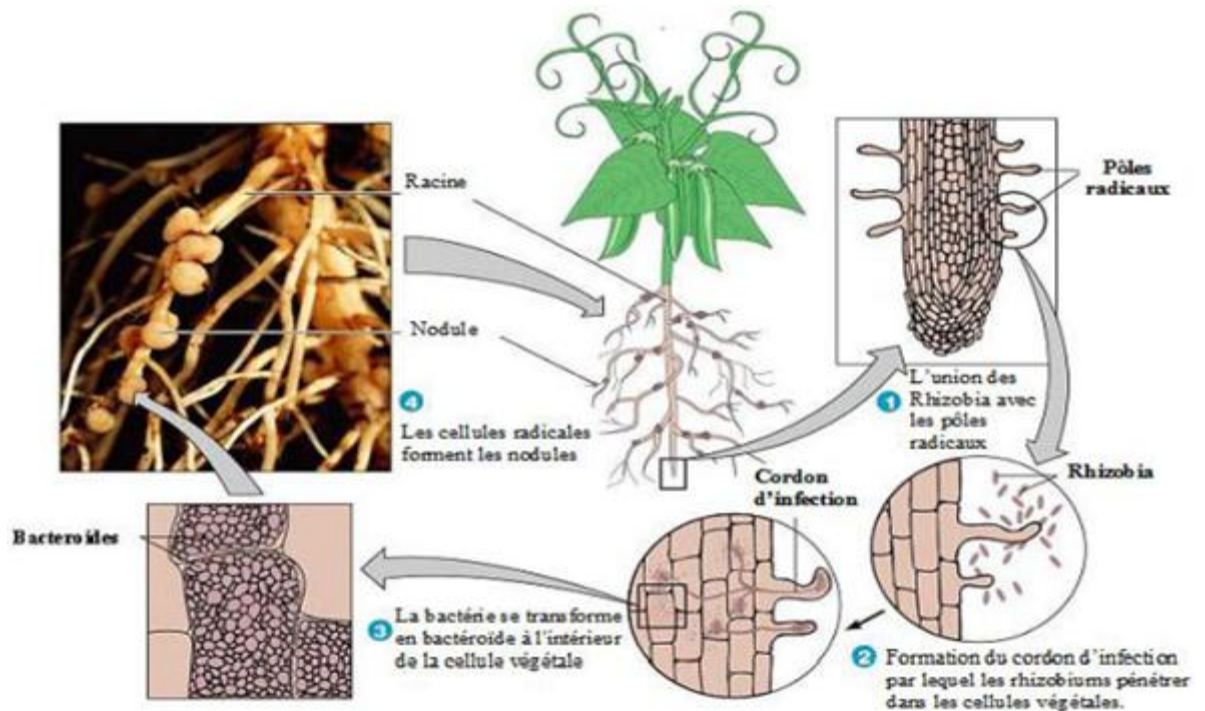


Figure 1.5 : Différentes étapes de l'établissement de la symbiose légumineuse-*Rhizobia* [84].

En premier lieu, les racines de la plante sécrètent des flavonoïdes (flavones, flavanol, isoflavonoïdes...) dans la rhizosphère. La reconnaissance des flavonoïdes par la protéine NodD des *Rhizobia* va permettre l'activation des gènes de l'opéron *nod*, induisant ainsi la synthèse des facteurs Nod. Les facteurs Nod induisent la déformation d'un poil absorbant piégeant ainsi les bactéries et permettant le développement du tube d'infection [84]. La spécificité d'interaction se situe principalement à ce niveau de l'interaction car la structure du facteur Nod produit par la bactérie sera reconnue (symbiose) ou non (échec de la symbiose) par la plante [83]. La deuxième étape est la forte induction de la biosynthèse des facteurs Nod pendant le développement du tube d'infection.

L'expression des gènes *nod* à l'intérieur du tube d'infection a été observée dans de nombreuses espèces de *Rhizobia* [85]. Les bactéries peuvent cheminer à l'intérieur du tube d'infection et se loger dans le cytoplasme de la cellule hôte par un mécanisme ressemblant à l'endocytose. La présence de flavonoïdes dans les racines semble être essentielle pour stimuler la synthèse de facteurs Nod dans le tube d'infection [84]. La présence de facteurs Nod dans la racine augmenterait la biosynthèse de keampférol. La présence localement de ce flavonol inhiberait le transport d'auxine, ce qui faciliterait la division cellulaire et l'initiation du nodule.

Dès lors, les bactéries se différencient en bactéroïdes et activent leur capacité de fixation de l'azote. Les nodules sont classés en deux types morphologiques basés sur la croissance du méristème [84]. On distingue classiquement les nodules déterminés et les nodules indéterminés (Tableau 1.2). Les nodules déterminés sont issus de l'auxèse des cellules du méristème apical qui cesse son activité à maturation de la. Les nodules indéterminés sont issus de mères du méristème apical persistant qui leur confère une croissance longitudinale.

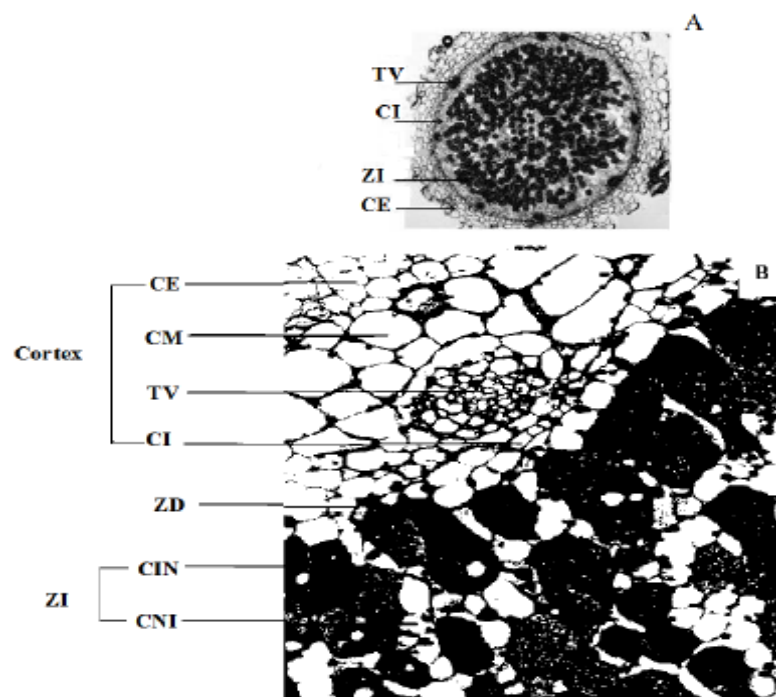


Figure 1.6 : Coupe transversale d'un nodule de haricot (A) montrant la zone infectée (ZI) entourée du cortex nodulaire. Agrandissement (B) d'une zone corticale proche d'une trace vasculaire (TV), on observe les subdivisions en cortex

externe (CE), cortex moyen (CM), cortex interne (CI) et zone de distribution (ZD), on distingue des cellules infectées (CIN) et des cellules non infectées (CNI) [86].

Le nodule du haricot est de type déterminé. Une coupe transversale (Figure 1.6) montre un cortex qui entoure la zone infectée. Ce cortex nodulaire est divisé en cortex externe (CE), moyen (CM) et interne (CI), les traces vasculaires sont localisées entre le CI et le CM. Une assise, dite zone de distribution (ZD), séparerait le CI de la zone infectée (ZI) centrale, siège de la fixation de l'azote atmosphérique [87].

Les nodules déterminés ont une durée de vie courte, prédestinée. Par conséquent, comme la racine grandit dans le sol, de nouveaux nodules sont formés et d'autres sont perdus sur les parties plus vieilles du système racinaire. Le nodule est une élaboration sphérique dans le cortex de la racine. Les nodules indéterminés ont une croissance continue (en théorie) de plusieurs mois. Le nodule est une structure spécialisée pour favoriser le fonctionnement de la nitrogénase des bactéries. En effet, cette enzyme nécessite de l'ATP, mais est complètement inhibée par l'oxygène. Les plantes ont donc dû évoluer pour élaborer une barrière physique avec l'extérieur (endoderme sclérifié au niveau du nodule), mais produit également dans le nodule de la leghémoglobine, protéine fixatrice d'O₂ [88].

Tableau 1.2 : Différences principales entre les nodules de type déterminé et indéterminé [89, 90].

Type de nodosité	Déterminée	Indéterminée
Exemples	Glycine, Phaseolus, Lotus	Acacia, Médicago, Trifolium
Cordon d'infection	Etroit	Large
Site d'initiation du primordium nodulaire	Cortex externe	Cortex interne
Méristème nodulaire	Activité limitée	Apical et persistant
Croissance nodulaire	Division cellulaire	Expansion cellulaire
Morphologie	Circulaire	Allongée
Cellules infectées matures	Non vacuolisées	Ramifiée petites vacuoles
Forme d'exportation de l'azote fixé	Uréides (allantoïne)	Acides aminés

1.5.4 Fonctionnement des nodosités

Chacun des deux symbiontes constitue pour l'autre une source d'un des éléments clés de son métabolisme : l'azote moléculaire réduit par la nitrogénase des bactéroïdes [79] est assimilé dans les cellules infectées de la plante hôte et exporté aux autres organes de la plante par le flux xylémien en échange de photosynthétats acheminés sous forme de saccharose par le flux phloémien jusqu'aux nodosités [91] (Figure 1.7). Les nodosités sont des composantes nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase.

Les deux composants de cette enzyme sont la protéine Mo-Fe et la protéine-Fe. La dinitrogénase (protéine Mo-Fe) est un hétéro-tétramère composé de deux sous-unités non identiques $\alpha_2\beta_2$ codées par *nifD* et *nifK*. La dinitrogénase est composée du cofacteur MoFe contenant du fer, du molybdène et du soufre [88], qui est le site d'attachement et de réduction du substrat, ainsi qu'un centre composé de fer et de soufre qui reçoit l'électron transféré directement de la dinitrogénase réductase (NifH ou protéine-Fe) [87].

La dinitrogénase réductase (protéine-Fe) est un homo-dimère de 64 KDa, Codée par le gène *nifH*, elle contient un centre d'oxydoréduction (4Fe-4S) [92]. La protéine-Fe joue un rôle dans le transfert d'électrons à la dinitrogénase, nécessaire à la réduction du substrat (N₂) [92].

L'activité de la nitrogénase se fait selon un cycle précis qui comporte quatre étapes essentielles. En premier lieu, on a la formation du complexe entre la protéine-Fe, deux molécules d'ATP et la protéine-MoFe, suivie du transfert d'électrons entre les deux protéines avec hydrolyse de l'ATP. Ensuite, une dissociation de la protéine-Fe du complexe aura lieu avec une réduction du centre (4Fe-4S) et une transformation de l'ATP en ADP. Ce cycle se répète plusieurs fois jusqu'à l'accumulation d'un nombre suffisant d'électrons apte à réduire le substrat, ce processus de réduction nécessite un environnement anaérobie vu la sensibilité de la nitrogénase à l'oxygène [93].

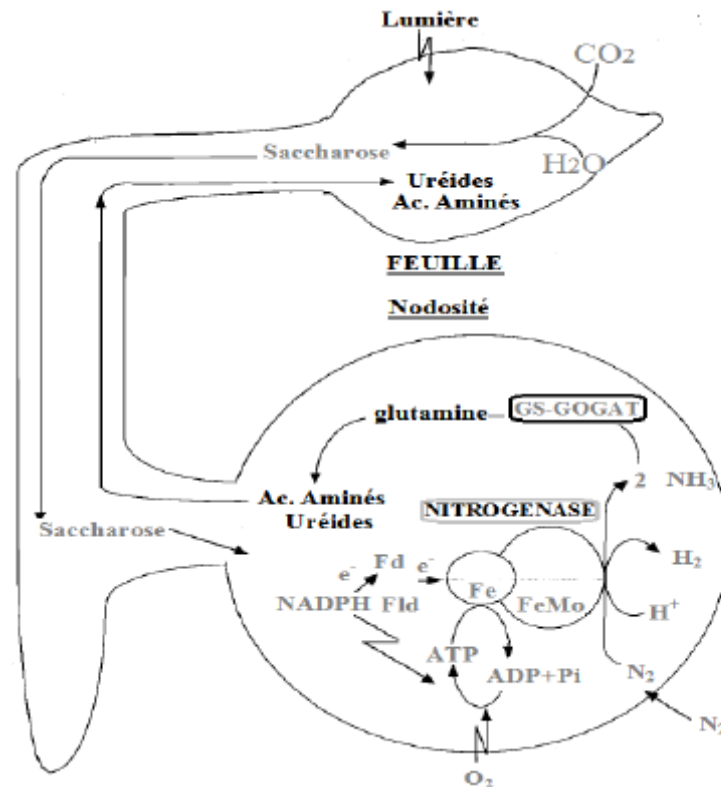


Figure 1.7 : Schéma illustrant le métabolisme général de la fixation symbiotique de N_2 au niveau des nodules et les échanges de métabolites avec la partie aérienne [91].

2. Effet de la salinité sur la culture du haricot

2.1 Généralités sur la culture du haricot

Le haricot *Phaseolus vulgaris* L. est une plante annuelle appartenant à l'ordre des Fabales et à la famille des Fabacées dont les feuilles sont trifoliées. Le système racinaire est constitué d'une racine principale et de nombreuses racines latérales qui se tiennent horizontales sur 10 cm de long. Sur celles-ci se développent des nodosités formées par des bactéries du genre *Rhizobium*. Ces bactéries fixent l'azote de l'air en puisant l'énergie nécessaire dans les sucres que la plante leur fournit. Cet azote est restitué à la plante sous forme de composés azotés assimilables. L'état structural du sol influence la profondeur d'enracinement de la plante (de 30 cm en conditions défavorables à 1 m dans d'excellentes conditions) et aussi son alimentation hydrique, déterminante pour la croissance de la plante [94, 95, 96, 97].

2.2 Facteur affectant la fixation de l'azote atmosphérique chez le haricot

Le haricot cultivé est extrêmement sensible aux contraintes biotiques (maladies, ravageurs...), ainsi qu'aux contraintes abiotiques telles que la chaleur, le froid, la sécheresse, l'excès de lumière, l'excès d'eau, le choc osmotique et la salinité. On estime que 90% des terres arables sont soumises aux stress abiotiques [11]. Certaines de ces contraintes, telles que la sécheresse, les températures extrêmes et la haute salinité limiteraient fortement la productivité des cultures. La sécheresse est l'un des principaux facteurs limitant la productivité des cultures dans le monde [98] et les variétés ayant une forte tolérance à cette contrainte sont importantes pour le maintien d'un bon rendement dans les régions où les saisons sèches sont fréquentes. Environ 60% des haricots produits proviennent des régions soumises à un déficit hydrique. La sécheresse qui réduit de plus de 50% le rendement du haricot, est la deuxième contrainte affectant le rendement de cette espèce après les maladies [99, 100].

Les hautes températures (> 30°C le jour et > 20°C la nuit) entraînent une réduction de rendement chez le haricot à cause d'une transpiration excessive de la plante [101].

La salinité du sol peut inhiber la croissance et réduire le rendement du haricot à cause d'une toxicité et d'un déséquilibre ioniques, et d'une réduction du potentiel hydrique de la plante [102].

2.3 Généralités sur la salinité

2.3.1 Définition

La salinité des sols et celles des eaux d'irrigation désigne la surcharge de ces derniers en sels minéraux solubles. Elle est causée par la combinaison de quatre cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} et Na^{+}) et de quatre anions (Cl^{-} , SO_4^{2-} , NO_3^{-} et HCO_3^{-}) [103]. Les sols salins se caractérisent par la présence dans la rhizosphère de sels solubles en concentration suffisamment élevée pour nuire à la plupart des plantes [104]. La salinité du sol est causée par une combinaison de facteurs géologiques, climatiques et agronomiques [105]. La salinité qui était présente avant la colonisation des terres est souvent appelée salinité historique ou primaire, tandis que les cas de salinité soupçonnés s'être développés principalement après

cette colonisation sont souvent appelées remontées salines ou la salinisation secondaire [106].

2.3.2 Problèmes de salinité des sols

Plusieurs contraintes environnementales sont limitantes pour la croissance et le développement des légumineuses. La salinité et la sécheresse sont considérés comme deux facteurs majeurs influant l'agriculture dans les zones arides et semi arides.

Approximativement 40 % des surfaces sur terre sont caractérisés par la présence d'un problème potentiel de salinité. Les sols salins sont caractérisés par un niveau toxique des chlorures et sulfates de sodium [106].

Les régions du bassin méditerranéen sont fortement touchées par ce fléau, et le fait d'essayer de lutter contre la sécheresse par l'irrigation, rajoute aux sols une contrainte de salinisation dite secondaire. Dans ce contexte, améliorer la tolérance des plantes à la sécheresse et la salinité constitue une proposition attractive pour les agriculteurs [105].

De nos jours, la pression devient plus forte pour chercher à combattre et trouver une solution à la salinité des sols pour les plantes cultivées. Cette urgence suggère que des méthodes efficaces soient requises pour améliorer la tolérance au sel pour de nombreuses variétés de plantes cultivées. De nombreuses techniques puissantes se sont développées pour altérer des gènes et leur expression dans des plantes. Mais elles n'ont pas été largement utilisées pour l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques.

2.3.3 Effet de la salinité sur les plantes

La salinité affecte différents mécanismes physiologiques et la nécessité de survivre dans un environnement salin nécessite de multiples mécanismes d'adaptation pour les plantes [107]. L'évolution de ces mécanismes adaptatifs implique un ensemble complexe de paramètres parmi lesquels beaucoup ne sont pas encore connus.

Le stress salin a un triple effet: il réduit le potentiel hydrique, cause un déséquilibre ionique ou des perturbations en homéostasie ionique et provoque une toxicité ionique. Cet état hydrique altéré conduit à une croissance réduite et

limitation de la productivité végétale. Depuis que le stress salin implique aussi bien le stress osmotique qu'ionique, l'arrêt de la croissance est directement relié à la concentration des sels solubles ou au potentiel osmotique de l'eau du sol [108].

La salinité est un facteur environnemental très important qui limite la croissance et la productivité [108]. Durant le début et le développement du stress salin à l'intérieur de la plante, tous les processus majeurs tels que : la photosynthèse, la synthèse des protéines, le métabolisme énergétiques... sont affectés. La première réponse est la réduction de la vitesse d'extension de la surface foliaire, suivi par l'arrêt de l'extension avec l'intensification du stress [109].

2.3.4 Effets de la salinité sur la symbiose rhizobia-légumineuses

2.3.4.1 Les rhizobia associés au haricot

Le terme *Bacillus-Phaseolus* a été donné au *Rhizobium* du haricot par Beijerinck [110] afin de le distinguer de toutes les autres souches de *Rhizobium*. Plus tard, Schneider [111] proposa le nom de *Rhizobium frankü* var majus pour les *Rhizobium* symbiotiques en les distinguant de *Rhizobium frankü* var minus pour *P. vulgaris*. Cependant les désignations de Schneider n'étaient pas valables sur le plan taxonomique et *Rhizobium phaseolus* devient la forme acceptée en 1926 [112].

Le haricot est une plante capable de former des nodules effectifs avec des groupes bactériens génétiquement hétérogènes d'origines différentes [113]. En plus de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* [114], *R. tropici* [115, 113], *R. etli* [116], *Sinorhizobium meliloti* et *R. leguminosarum* bv. *trifolii* [117], deux nouvelles espèces capables de former des nodules sur les racines du haricot ont été décrites, *R. gallicum* bv. *phaseoli* et *R. giardinii* bv. *phaseoli* [118].

D'autres espèces déjà caractérisées mais non classées génétiquement, *Rhizobium* sp. BR816 [119], *Rhizobium* sp. NGR234 [120] et *Rhizobium* sp. GRH2 [121] sont également capables d'induire la nodulation du haricot.

2.3.4.2 Effet sur le processus d'infection et le développement des nodules

Le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-rhizobia indirectement, en réduisant la croissance de la plante hôte et en affectant certains de ses processus physiologiques ou bien directement en inhibant le processus d'infection

et le développement des nodules [122]. Chez des cultivars tolérants de pois chiche, la salinité a inhibé le processus d'infection et elle a affecté la taille et le nombre de nodules [123], chez la fève, on observe une inhibition du cordon infectieux [124]. En général, les premières étapes de la nodulation sont plus sensibles au stress salin que plus tard [122].

2.3.4.3 Effet sur l'activité de la nitrogénase et la respiration nodulaire

La salinité inhibe l'activité de la nitrogénase [122] et la respiration nodulaire qui provoque, par la suite, une diminution des teneurs en azote total dans la plante [125]. La réduction de l'activité fixatrice de N₂ par le stress salin est généralement due à la réduction de la respiration nodulaire [126]. Cette réduction est due à une limitation de l'O₂ ou du substrat N₂ [127] ou une diminution de la production de protéines cytosoliques par les nodules [128].

Vadez [129] et Serraj et al [130] ont montré que l'augmentation de la pression d'oxygène dans le milieu d'une racine nodulée permet de supprimer l'effet inhibiteur du stress salin sur l'activité réductrice de l'acétylène. D'autres résultats suggèrent que l'accumulation des ions toxiques (Na⁺ et Cl⁻) dans les nodosités peut affecter le métabolisme dans ces organes et inhiber leur activité fixatrice de N₂ [128].

2.3.4.4 Effet sur le métabolisme carboné

L'azote moléculaire fixé par la nitrogénase des bactéroïdes est acheminé aux feuilles par le flux xylémien et l'énergie nécessaire à cette fixation est fournie par la plante sous forme du saccharose à travers le phloème.

Dans le cytosol des cellules infectées, de fortes activités sucrose synthase et invertase sont présentes et ces activités permettent l'hydrolyse du saccharose en glucose. Le glucose est ensuite métabolisé en phosphoénol pyruvate, en oxaloacétate, en malate et en succinate. Le malate et le succinate constituent la principale source carbonée des bactéroïdes [131]. Le malate est une composante clé chez le métabolisme carboné des plantes et il est synthétisé par l'action de phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) et la malate déshydrogénase (MDH, EC 1.1.1.37).

Dans les nodules de luzerne et de haricot, la salinité provoque une inhibition des activités phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) et de la

malate déshydrogénase (MDH, EC 1.1.1.37), ces dernières sont nécessaires pour fournir aux bactéroïdes le carbone à partir des hexoses-6P [128, 125]. Dans les nodules de pois chiche, ces activités enzymatiques ont montré le même comportement sous stress hydrique [132].

2.3.5 Les stratégies d'adaptation

La prévention des dommages causés par le stress salin et leur réparation sont nécessaires pour la survie des cellules. Ces stratégies peuvent inclure des changements morphologiques, biochimiques et physiologiques (l'ajustement osmotique, l'accumulation des osmoprotecteurs, induction de stress anti-oxydatif et d'autres adaptations physiologiques telles que la modification de la croissance de la partie racinaire et aérienne et la transpiration) [133].

2.3.5.1 Ajustement osmotique

Les plantes en général et la symbiose rhizobienne en particulier, détectent le stress salin à travers le signal ionique (Na^+) et osmotique. L'excès de Na^+ peut être détecté par les protéines transmembranaires ou les enzymes récepteurs de Na^+ [134]. L'excès de Na^+ et Cl^- provoque des changements conformationnels de structures de protéines et de la dépolarisation membranaire qui peuvent conduire à la perception de la toxicité ionique. Le stress osmotique imposé par la salinité conduit à la perte de la turgescence des cellules et le changement du volume cellulaire [135].

En général, les ions Na^+ entrent en concurrence avec les ions K^+ , à travers les cotransporteurs Na^+/K^+ et peuvent également bloquer les transporteurs spécifiques de K^+ de cellules racinaires. Les antiports Na^+/H^+ de membrane plasmique, pompent le Na^+ à partir des cellules racinaires pour être transporté vers les feuilles. Ce transport est la première ligne de défense qui sert à empêcher l'accumulation de Na^+ dans le cytosol [134].

Sous la salinité, la séquestration vacuolaire de Na^+ est une stratégie importante et rentable pour l'ajustement osmotique et au même temps elle peut réduire la concentration de Na^+ cytosolique. Les antiports vacuolaires Na^+/H^+ utilisent le gradient de protons générés par la H^+ vacuolaire/adénosine triphosphatase (H^+/ATPase) et $\text{H}^+/\text{pyrophosphatase}$ inorganique (H^+/PPase) pour la séquestration Na^+ dans la vacuole. Le stress salin active les H^+/ATPase et

H⁺/PPase des tonoplastes [136]. Par conséquent, la coordination entre les antiports Na⁺/H⁺, H⁺/ATPase et H⁺/PPase est cruciale pour la tolérance au stress salin.

2.3.5.2 Régulation de la croissance

Sous stress salin, Munns et Termaat [137] ont mentionné que la croissance racinaire est moins touchée par rapport à celle de la partie aérienne. En effet, le maintien d'une croissance racinaire constitue un caractère adaptatif dans un environnement de faible disponibilité en eau tel que le milieu salin. L'allongement racinaire peut être dû à une augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans la construction du cytosquelette: telle que la xyloglucan endotransglycosylase [138]. L'autre cause peut être l'accumulation de la proline [11]. Ces deux actions sont régulées par l'acide abscissique (ABA), qui est induit par le stress salin [139].

2.3.5.3 Biosynthèse d'osmoprotecteurs

Sous stress salin, la concentration des sucres solubles augmente dans les nodules des légumineuses. Parmi ces sucres on trouve le tréhalose comme substrats osmoprotecteurs [140, 141]. En plus, la salinité provoque l'augmentation des aminoacides dans les nodules de haricot qui peut être expliquée par l'ajustement osmotique ou la dégradation des protéines [142]. Chez *M. truncatula* transgénique la salinité a provoqué l'accumulation de proline dans les nodules qui a amélioré la croissance et la fixation symbiotique d'azote [143].

2.3.5.4. Induction du métabolisme oxydatif

Le stress salin induit la production et la formation des formes réactives de l'oxygène (FRO, les radicaux superoxydes (O₂⁻), les peroxydes d'hydrogène (H₂O₂) et les radicaux hydroxyles (OH⁻). Ces formes causent des dommages oxydatifs à différentes composantes cellulaires tels que les lipides membranaires, les protéines et les acides nucléiques [144].

En effet, l'oxygène est un facteur critique pour la FSA sachant que la nitrogénase est très sensible à sa présence et irréversiblement inhibée dans un temps très court [145]. En outre, des études ont montré que l'inhibition de la nitrogénase par l'O₂ est le résultat de la formation du radical hydroxyle au niveau du site actif de l'enzyme et que les FRO peuvent résulter de l'oxydation de la

nitrogénase et de la ferrédoxine, mais surtout de l'auto-oxydation de la leghémoglobine [146].

Pour atténuer et réparer les dommages causés par la production de ces FRO, les nodules ont un système complexe des antioxydants [147]. Parmi les composantes de ce système on trouve les caroténoïdes, ascorbates, tréhaloses, glutathions, tocophérols et les enzymes comme les peroxydases (PO), polyphénoloxydases (PPO), superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) [144].

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels biologiques et conditions de culture

1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal ayant fait l'objet de cette étude est constitué de graines de la variété de haricot «Tema », caractérisée par une gousse longue et rectiligne de couleur vert brillant très uniforme. La graine est de couleur marron mouchetée en rose clair.

Les graines ont été désinfectées par trempage dans l'eau javellisée à 6° pendant 20 minutes, suivi de trois rinçages successifs, de 3 minutes chacun, dans de l'eau distillé stérile et après le dernier rinçage, on les laisse gonfler pendant 1 heure. Après désinfection des graines, elles sont mises en germination sur papier filtre stérile imbibé d'eau à l'obscurité totale (enveloppées avec du papier aluminium) à la température ambiante (18 – 22 °C) pendant 2 à 3 jours, jusqu'à l'apparition des radicelles.

1.2 Souches bactériennes

1.2.1 *Pseudomonas fluorescens*

Une souche de *Pseudomonas fluorescens* a été utilisé dans notre expérimentation, il s'agit de la souche C7R12 qui est un mutant spontané de la souche sauvage C12, et dont l'effet bénéfique sur la phytostimulation a été confirmé, elle a été isolée a partir du sol de Chateaufrenard (France) et gracieusement fourni au laboratoire de mycologie (département de biotechnologie, université de Blida 1) par P. Lemanceau (INRA Dijon, France).

La pureté de la souche a été vérifiée sur le milieu King B [148] (Appendice A, Annexe 1), en réalisant plusieurs repiquages successifs. Les souches purifiées ont été conservées à 4° C.

1.2.2 *Rhizobium phaseoli*

La souche de *Rhizobium phaseoli* utilisée provient du laboratoire d'Agriculture biologique (CSI, Cordoba Espagne) La pureté de la souche a été vérifiée sur milieu PDAE (Potatos Dextrose Agar Extrait de levure) (Appendice A, Annexe 2).

1.3 Préparation des inoculums

L'inoculum de la souche de *Pseudomonas* a été obtenu à partir de cultures bactériennes âgées de 24 à 36 heures cultivées sur le milieu King B. Les suspensions bactériennes ont été préparées dans de l'eau distillée stérile. L'inoculum de la souche de *Rhizobium* a été préparé à partir de cultures bactériennes âgées de 4 jours cultivées sur le milieu PDAE.

Les concentrations bactériennes ont été ajustées à 10^8 CFU/ml à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu), aux longueurs d'ondes $\lambda = 580\text{nm}$ pour la souche de *Pseudomonas*, et 600 nm pour la souche de *Rhizobium*.

1.4 Inoculation bactérienne

Après germination des graines, elles sont sélectionnées pour utiliser dans notre expérimentation des plantules dont la racine est de taille identique (2-3 mm), et semées dans des alvéoles de 5 cm de profondeur contenant de la tourbe stérile à raison d'une graine par alvéole à une profondeur de 2 cm. Les alvéoles sont immédiatement arrosées avec l'eau distillée pour permettre un bon contact sol graine. 50% des graines ont été bactérisées avec la souche *Pseudomonas* à raison de 5 ml de suspension bactérienne par alvéole.

L'inoculation avec la souche de *Rhizobium* a été effectuée trois jours après le semis (après la formation des racines et des poils absorbants).

Afin d'assurer un niveau suffisant en population bactérienne dans les pots, un rappel de bactérisation pour chaque souche a été réalisé après une semaine de la date de semis pour la souche *Pseudomonas* et 10 jours pour la souche de *Rhizobium*.

1.5 Protocole expérimental et conduite culturale

Lorsque les plantules atteignent le stade deux feuilles, elles sont transplantées soigneusement à raison d'une plantule par pot et déposée sous en verre (Département de biotechnologies, université de Blida), dans des pots (20 cm de diamètre et 35 cm de profondeur) contenant du sol stérile.

1.5.1 Dispositif expérimental

Notre essai a été conduit selon un dispositif en randomisation complète comprenant 16 traitements étudiés, où chaque traitement comprend trois répétitions, soit 48 plants au total. L'expérimentation vise à étudier les effets individuels et en interaction de deux facteurs :

- Facteur 1 : représente l'effet de la bactérisation, désigné par 3 niveaux d'application individuelle et combinée: *Pseudomonas fluorescens C7R12*, *Rhizobium phaseoli* et *Pseudomonas fluorescens C7R12 + Rhizobium phaseoli*.
- Facteur 2 : la salinité qui est représentée par 4 niveaux qui correspondent aux concentrations en NaCl : de 0 g/l, 3 g/l, 8 g/l et 12 g/l.

Au total, notre essai propose l'étude de 16 traitements dont : 12 traitements correspondent à l'interaction des 2 facteurs ($F1 \times F2 = 3 \times 4$) et 4 traitements représentés par les témoins avec les différentes concentrations mais sans bactérisation.

L'irrigation a été assurée par la solution nutritive de HOAGLAND [149] (Appendice A, Annexe 3), à raison d'une irrigation tous les 3 jours.

1.5.2 Application du stress salin

Les concentrations (3; 8 et 12 g/l en NaCl) ont été choisies suite à des essais préliminaires montrant que la limite de tolérance de l'haricot au NaCl est de 8 g/l. L'irrigation des plants témoins est assurée par la solution nutritive de HOAGLAND, tandis que l'irrigation avec la solution saline est assurée par la solution nutritive de HOAGLAND additionnée par les différentes concentrations en NaCl : 3g/l, 8g/l ou 12g/l.

L'application du stress salin commence au stade 5 feuilles, et afin de limiter le choc osmotique, les lots de plantules ont été amenés progressivement (durant les trois jours suivants) à la concentration désirée en sel.

L'irrigation avec la solution saline s'effectue tous les trois jours. Une irrigation à l'eau distillée est appliquée après 2 applications de la solution saline afin d'éviter l'accumulation du NaCl dans le substrat de culture.

2. Evaluation de la germination

Dans le but de déterminer les effets biostimulateurs de nos souches sur la germination des graines de haricot à différentes concentration en NaCl, un essai de germination a été effectué.

Les graines, au nombre de 10, sont lavées abondamment à l'eau, puis rincées à l'eau distillée. Les graines bactérisées par les différentes applications bactériennes sont inoculées dans des suspensions bactériennes différentes préparées préalablement pendant 2 heures, alors que les graines non bactérisées sont plongées dans de l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite mises à germer dans des boîtes de Pétri de 10 centimètres de diamètre, entre deux couches de papier filtre, humecté avec 20 ml d'eau distillée pour le témoin et avec 20 ml de l'une des solutions salées, selon ayant les concentrations appliquées (3 g/l, 8 g/l ou 12 g/l de NaCl). Les boîtes sont ensuite enveloppées dans un sachet en plastique pour éviter l'évaporation de l'eau, et mises à l'obscurité dans un incubateur à 26 °C et une humidité relative de l'air variant entre 78 à 93%. La

germination est repérée par la sortie de la radicule hors des téguments de la graine. Au cours de cet essai les paramètres étudiés sont:

-Taux de germination final: ce paramètre constitue le meilleur moyen d'identification de la concentration saline qui présente la limite physiologique de germination des graines d'haricot. Il est exprimé par le rapport nombre de graines germées sur nombre total de graines.

-Cinétique de germination: pour mieux appréhender la signification de l'effet des deux facteurs étudiés sur l'évolution du nombre de graines germées de l'étape cruciale d'absorption de l'eau par la graine jusqu'à l'élongation de l'axe embryonnaire et l'émergence de la radicule, Le nombre de graines germées est noté à 12; 24; 36; 48; 72, 96, 108 et 120 heures après le début de l'expérience.

3. Les paramètres ecophysiologiques étudiés

Il est difficile de suivre le comportement d'une plante à partir d'un seul paramètre, en effet le suivi du comportement des plantes vis-à-vis du stress salin a été basé sur plusieurs paramètres morphologiques et physiologiques.

3.1 Paramètres morphologiques

3.1.1. Mesure de la croissance en longueur

Les plants ont été récoltés en séparant les racines des tiges. Les systèmes racinaires ont été lavés soigneusement à l'eau puis essorés rapidement avec du papier absorbant. Les longueurs des parties aériennes et souterraines ont été mesurées à l'aide d'une règle graduée. Les valeurs données sont les moyennes des trois répétitions de chaque traitement.

3.1.2. Mesure de la croissance pondérale

La biomasse exprimée en gramme a été effectuée par pesée de la matière fraîche, puis de la matière sèche après étuvage à 85 °C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant (48 h).

3.1.3. Nombre de feuilles et surface foliaire

Les feuilles ont été détachées et dénombrées à la fin de l'expérimentation. La mesure de la surface foliaire est effectuée par la suite à l'aide d'un planimètre (scanner de type : Area Meter AM200).

3.2 Nombre de nodules

Le nombre de nodules est comptabilisé à la fin de l'expérimentation. La partie racinaire de chaque plant est soigneusement débarrassée du substrat adhérent, afin de dénombrer les nodules développés sur les racines.

3.3 Paramètres physiologiques

Dans le but de déterminer la capacité de nos souches sur l'amélioration de la tolérance des plants de haricot avec les différentes concentrations de NaCl, nous avons tenté d'évaluer les effets sur des paramètres physiologiques, en relation avec la teneur en osmoprotecteurs:

3.3.1. Dosage des sucres solubles totaux

Les sucres solubles totaux (saccharose, glucose, fructose, leurs dérivés méthyles et les polysaccharides) sont dosés par la méthode au phénol de Dubois et al [152]. Elle consiste à prendre 100 mg de matière fraîche (1/3 médian de la feuille), placées dans des tubes à essais, on ajoute 3 ml d'éthanol à 80% pour faire l'extraction des sucres. On laisse à température ambiante pendant 48h à l'obscurité.

Au moment du dosage les tubes sont placés dans l'étuve à 80°C pour faire évaporer l'alcool. Dans chaque tube on ajoute 20ml d'eau distillée à l'extrait.

Dans des tubes à essais propres, on met 2ml de la solution à doser, on ajoute 1ml de phénol à 5% (le phénol est dilué dans de l'eau distillée); et 5ml d'acide sulfurique concentré 96%, tout en évitant de verser de l'acide sur les parois du tube. Une solution jaune orange à la surface est obtenue sera homogénéiser à l'aide d'un vortex. Après 10 mn de repos, les tubes sont placés au bain-Marie pendant our 10 à 20mn à 30°C (La couleur de la réaction est stable

pendant plusieurs heures.). Les mesures d'absorbances sont effectuées à une longueur d'ondes de 485 nm. Enfin des résultats des densités optiques sont rapportés sur une courbe étalon (Figure 2.2) des sucres solubles (exprimés en glucose).

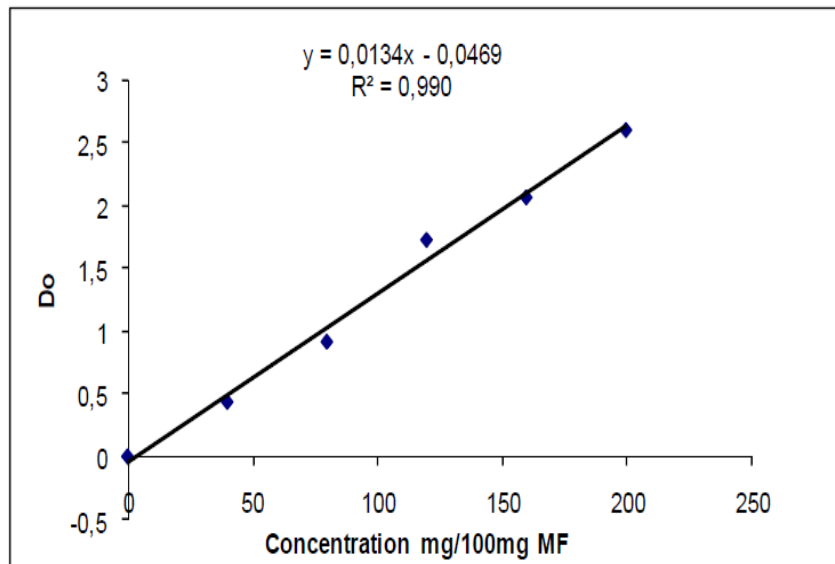


Figure 2.1: Courbe étalon du dosage des sucres totaux.

3.3.2 Dosage de la proline

La méthode appliquée pour le dosage de la proline est celle de Troll et Lindsley [150], modifiée par Monneveux et Nemmar [151]. Elle consiste à prendre 100 mg du matériel végétal (1/3 médian de la feuille), puis à ajouter 2 ml de méthanol à 40 %, le tout est chauffé à 85°C dans un bain- Marie pendant 60mn. Après refroidissement, on prélève 1 ml d'extrait auquel on ajoute : 1 ml d'acide acétique (CH_3COOH) ; 25 mg de ninhydrine ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$) et 1 ml de mélange contenant : 120 ml d'eau distillée ; 300 ml d'acide acétique ; 80 ml d'acide orthophosphorique (H_3PO_4 , d=1.7).

La solution obtenue est portée à ébullition pendant 30 mn à 100°C. La solution vire au rouge. Après refroidissement, 5 ml de toluène sont rajoutés à la solution qui est agitée. Deux phases se séparent : une phase supérieure de couleur rouge contenant la proline et une phase inférieure transparente sans proline. Après avoir éliminé la phase inférieure, la phase supérieure est récupérée est déshydratée par l'ajout d'une spatule de Sulfate de Sodium Na_2SO_4 anhydre (pour éliminer l'eau qu'elle contient).

On détermine la densité optique (Do) à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 528 nm. Les valeurs obtenues sont converties en taux de proline en utilisant une courbe étalon (Figure 2.1), préalablement établie à partir d'une série de solutions de concentration en proline connue. Cette courbe est utilisée pour déterminer les teneurs en proline dans les feuilles des plantes.

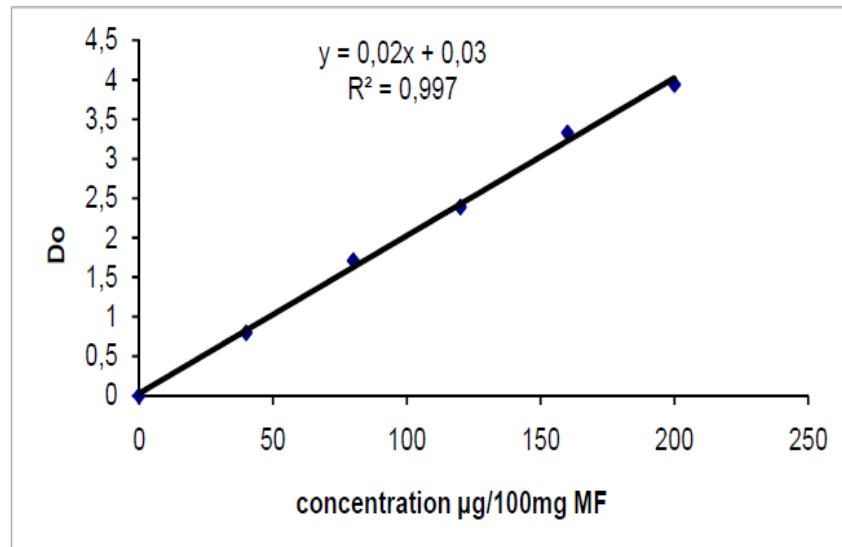


Figure 2.2: Courbe étalon du dosage de la proline.

4. Analyse statistique

Les effets des différents traitements ont été étudiés par l'analyse de la variance ($\alpha < \text{ou} = 5\%$) à un et à deux facteurs de classification. Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel STATISTICA version 6.

La signification des différences entre les traitements est exprimée en fonction de la probabilité (P).

CHAPITRE 3

RESULTAS

1. Evaluation de la Phytostimulation

1.1 Taux de germination

Les résultats de la germination des graines d'haricot inoculées par les différentes applications bactériennes, en milieu salin, indiquent qu'à l'exception des graines non bactérisées conduites à 3 et 8 g/l en NaCl et celles conduites à 12g/l (bactérisées et non bactérisées), toutes les graines des autres traitements ont germé au bout de 5 jours. Les résultats indiquent également que l'inoculation bactérienne stimule considérablement la germination des graines en présence et en absence de NaCl. Les réponses aux applications individuelles de *Rhizobium* et de *Pseudomonas* sont pratiquement similaires dans toutes les situations, tandis que leur coinoculation combinée montre de meilleurs résultats (Appendice E, Tableau 1).

En comparant les traitements non bactérisés et stressés au témoin non stressé et non bactérisé, il s'avère que la germination des graines est négativement affectée avec les différentes concentrations en NaCl et diminue progressivement avec leur augmentation à raison de 10% à 3 et 8 g/l de NaCl et de 50% à 12 g/l. il est à noter également qu'à 3 et 8 g/l le taux final de germination des graines bactérisées n'a pas été affecté, alors qu'à 12 g/l ce dernier a diminué de 20% pour les graines inoculées par les deux souches individuellement et de 10% pour les graines inoculées par leur combinaison, par rapport au témoin non stressé (Appendice E, Tableau 1).

Malgré l'effet délétère du NaCl, l'application, individuelle ou combinée, des deux souches améliore significativement le taux final de germination, notamment avec la concentration de 12 g/l où l'amélioration était respectivement, de 60% et de 80%.

1.2 Cinétique de germination

Le suivi de la cinétique de la germination, à travers les différents traitements étudiés, permet de distinguer 3 phases (Figure 3.1):

- une phase de latence, précédant l'initiation de la germination, qui est globalement et sa durée reste variable selon l'inoculation bactérienne et la concentration en NaCl. Elle est courte, de l'ordre de 24 h chez tous les traitements, à l'exception de ceux soumis à 12g/l où elle devient plus au mois longue et à duré jusqu'à 60h.

- une phase linéaire, correspondant à une augmentation rapide du taux de germination qui évolue proportionnellement au temps, elle est bien apparente chez tous les traitements soumis aux concentrations inférieures à 8 g/l.

- une troisième phase correspondant à un palier, représentant le pourcentage final de germination et traduisant la capacité germinative dans les conditions de l'expérience.

Par voie de comparaison entre les applications bactériennes, il paraît que le nombre de graines germées en coinoculation des deux souches évolue plus rapidement que leurs applications individuelles en milieu dépourvu de NaCl. Cependant les graines inoculées par la combinaison des deux souches atteignent 70% de germination seulement à 36h et 100% au bout de 60h, alors qu'avec les applications individuelles des deux souches le taux final de germination n'est atteint qu'après 84h, au même titre pour les graines non inoculées.

En présence des différentes concentrations en NaCl, l'évolution du taux de germination devient de plus en plus lente pour toutes les graines inoculées par les différentes applications bactériennes. En effet, au temps nécessaire pour La germination de toutes les graines pour l'application individuelle des deux souches (84h), le taux de germination a diminué de 20, 30 et 60% respectivement à 3, 8 et 12 g/l pour la souche *Rhizobium*, et de 20 et 60% respectivement à 8 et 12 g/l pour la souche *Pseudomonas*. Pour la combinaison des deux souches à 60h, le taux de germination a diminué de 10, 30 et 60% respectivement à 3, 8 et 12 g/l (Appendice E, Tableau 1).

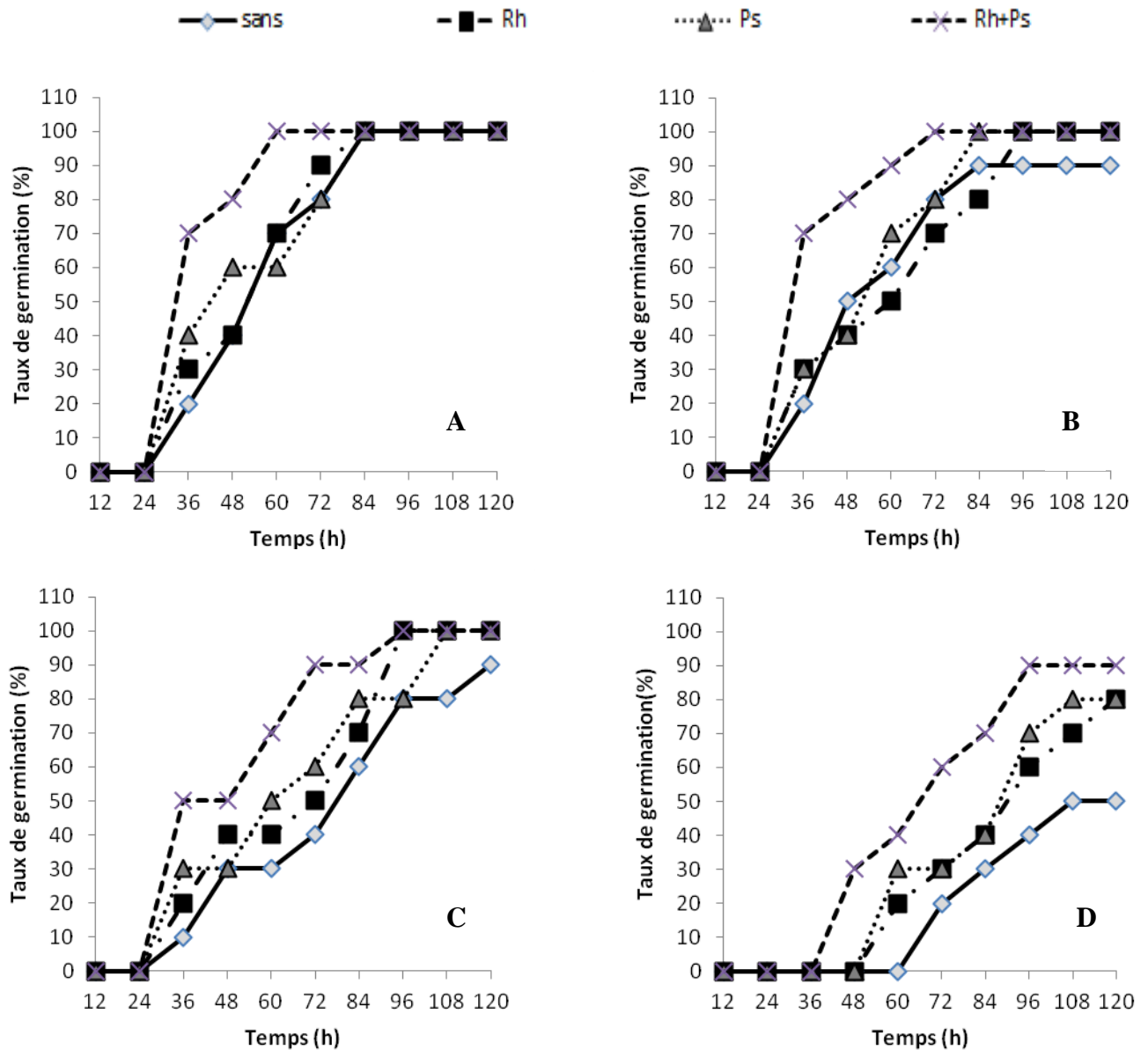


Figure 3.1 : Effet des différentes applications bactérienne sur la cinétique de germination des graines mises à l'obscurité aux différentes doses de NaCl (A : à 0 g/l, B : à 3 g/l, C : à 8 g/l, D : à 12 g/l).

Rh : *Rhizobium phaseoli*.

Ps : *Pseudomonas fluorescens C7R12*.

1.3. Paramètres morphologiques de la partie aérienne

1.3.1 Nombre des feuilles

L'analyse de la variance (ANOVA) a montré que la bactérisation des plants procure un effet hautement significatif sur le nombre des feuilles (Appendice B, Annexe 1). L'estimation de ce paramètre a révélé un effet phytostimulateur sur tous les plants bactérisés, avec des valeurs moyennes de 24,33 avec la souche *Rhizobium*, de 24,66 avec la souche *Pseudomonas* et 29 avec leur combinaison (Tableau 3.1).

Les résultats indiquent que suite à l'application de NaCl, une nette différence en nombre de feuilles a été constatée, par rapport aux témoins respectifs. Le nombre des feuilles des plants stressés est significativement influencé par les variations du milieu à travers l'addition des différentes doses de NaCl (Appendice C, Annexe 1). En effet et d'après la comparaison des moyennes obtenues, nous n'avons constaté aucune distinction à 3 et à 8g/l, néanmoins le nombre des feuilles des plants conduits à 12g/l est nettement inférieur, avec des valeurs respectives de 7 et 16,33 (Figure 3.2).

L'analyse statistique des résultats a montré un effet hautement significatif de la variabilité de ce paramètre en fonction de l'interaction (PGPR X NaCl) (Appendice D, Annexe 1). Par rapport à leurs témoins bactérisés non stressés, il semble que toutes les application bactériennes sont sensiblement affectées aux différentes doses de NaCl où les valeurs diminuent progressivement avec l'augmentation des doses de sel atteignant à 12 g/l des valeurs de 9,667 par rapport à 24,33 pour la souche *Rhizobium phaseoli*, 13,333 par rapport à 24,667 pour la souche *Pseudomonas*, et 12 par rapport à 29 pour la coinoculation des deux souches (Figure 3.2, Tableau 3.1).

Le nombre des feuilles chez les plants bactérisés, conduits sous stress salin, est nettement supérieur par rapport à celui enregistré chez les plants stressés non bactérisés (Figure 3.3). En effet, à 3 g/l le meilleur résultat de 30 feuilles est enregistré chez les plants inoculés par la souche *Pseudomonas*, suivi par la combinaison Rh+Ps avec un nombre de 24, et en dernier lieu, en application de la souche *Rhizobium*, où le nombre moyen de feuilles est de 18, restant toujours supérieur au témoin qui est de 17,33 feuilles.

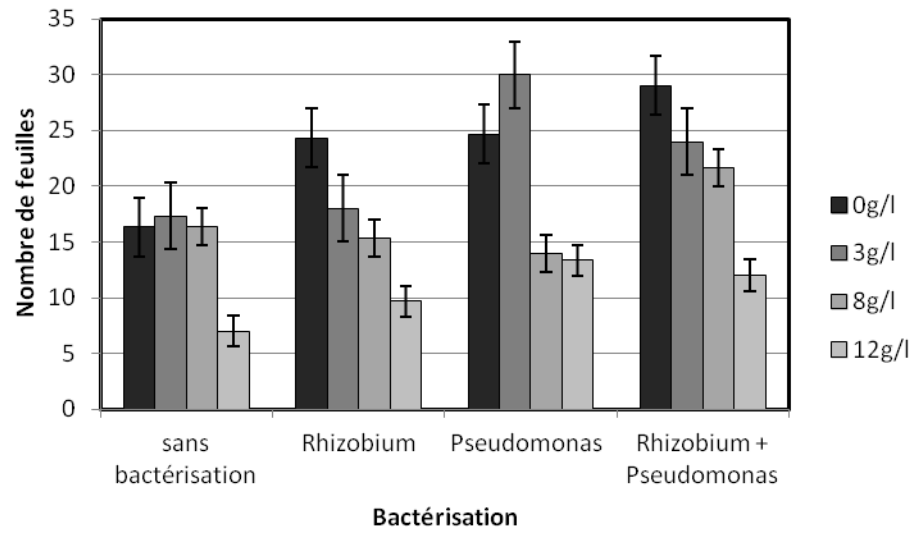


Figure 3.2 : Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la longueur des tiges des plants bactérisés et non bactérisés.

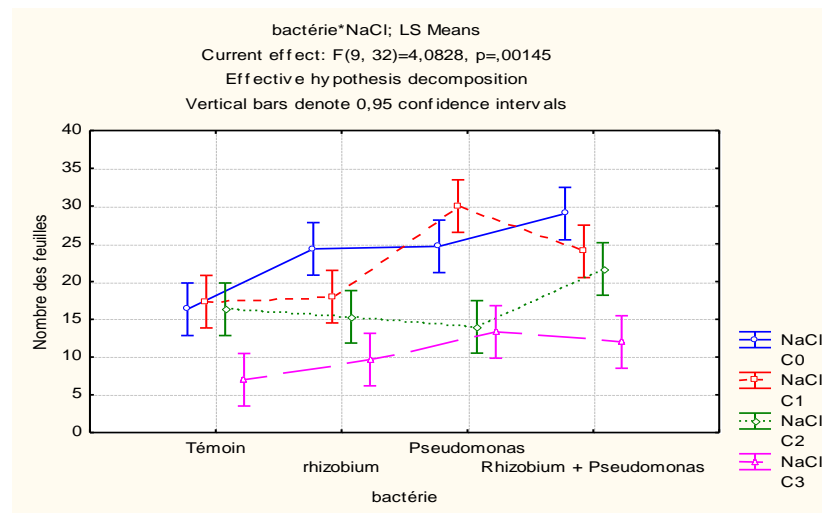


Figure 3.3: Variation du nombre des feuilles en fonction de l'effet conjugué des doses de NaCl et des PGPR.

A la concentration de 8g/l, la combinaison Rh+Ps entraîne une augmentation en nombre de feuilles qui atteint 21,66 par rapport aux plants non bactérisés (16,33). Avec l'application individuelle des souches de *Rhizobium* et de *Pseudomonas* le nombre de feuille est, respectivement, de 15,33 et de 14. Chez le témoin non bactérisé, avec la concentration de 12 g/l, le nombre de feuilles moyen est de 7 feuilles, alors qu'en application de la bactérisation, il y a une nette progression : *Pseudomonas* 13,33 feuilles; la combinaison Rh+Ps 12 feuilles et *Rhizobium* 9,66 feuilles (Figure 3.3, Tableau3.1).

1.3.2 Surface foliaire

L'examen des surfaces foliaires montre des effets de phytostimulation très hautement significatifs, en présence de l'inoculation bactérienne (Appendice B, annexe 2). En effet, nous avons enregistré une très bonne augmentation chez tous les plants bactérisés par rapport à ceux non bactérisés (Figure 3.4). La coinoculation des deux souches s'est montrée plus efficiente avec une moyenne de 498,94 cm², suivi par la souche *Pseudomonas* avec 326,48 cm², alors que la souche *Rhizobium* a enregistré la plus faible surface foliaire avec une valeur de 314,65 cm² (Tableau 3.1).

D'après les résultats, nous avons remarqué que l'application des doses du NaCl sur les plants d'haricot a induit une nette différence qui est très hautement significative (appendice C, annexe 2) de la surface foliaire par rapport à leurs témoins et ce, pour les différentes doses testées (Figure 3.5). En effet, il semble qu'à 3 et à 8g/l la surface foliaire a été stimulée donnant des valeurs respectives de 236,82 et 168,965 cm², tandis que la dose 12g/l fait chuter la surface foliaire à 67,352 cm² (Tableau 3.1).

Les résultats de variations de la surface foliaire en fonction de la bactérisation et des traitements salins sont présentés dans la figure 3.5, cette figure montre que l'augmentation de la dose du sel chez tous les plants bactérisés s'accompagne d'une diminution de la surface foliaire.

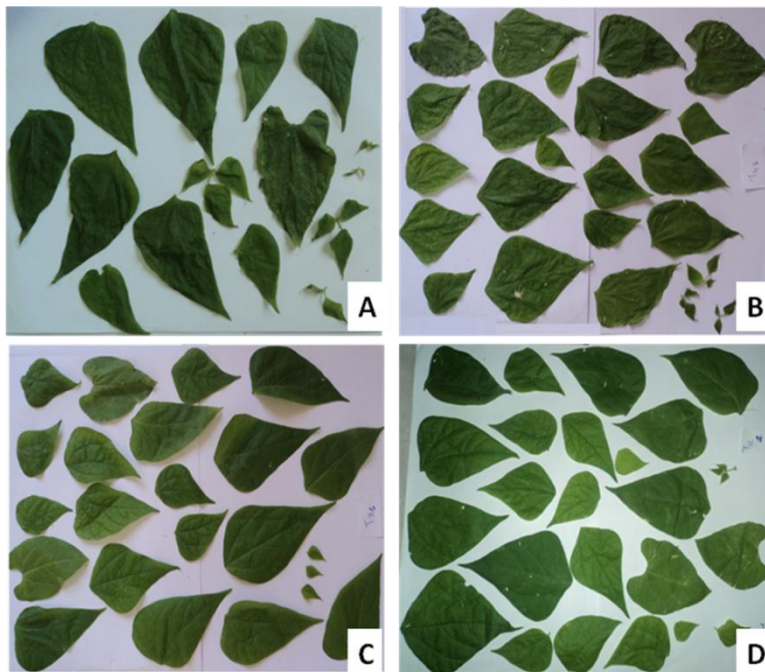


Figure 3.4: Effet de l'inoculation individuelle ou combinée des deux souches PGPR sur la variation de la surface foliaire.

A : Traitement sans bactérie.

B : Traitement inoculé par *Rhizobium phaseoli*.

C : Traitement inoculé par *Pseudomonas C7R12*

D : Traitement inoculé par la combinaison *Rhizobium sp+* *Pseudomonas C7R12*.

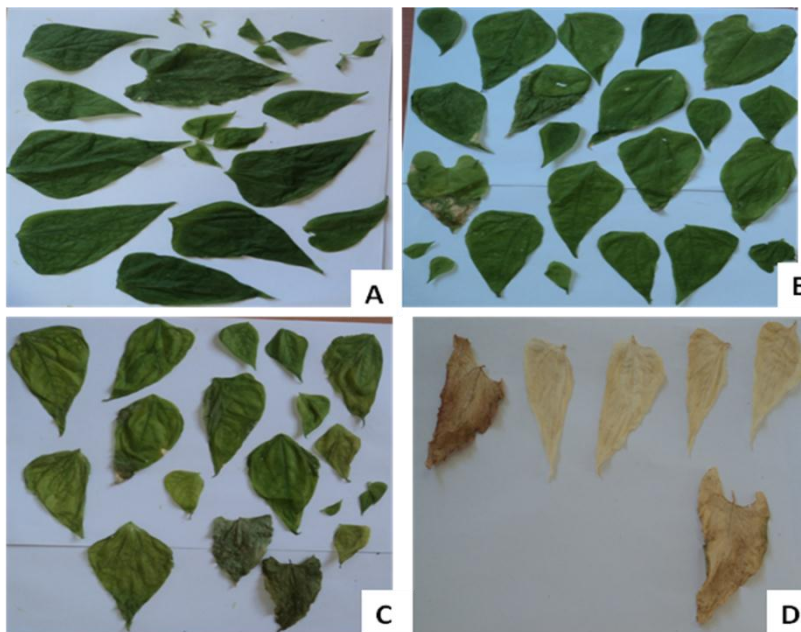


Figure 3.5 : Effet du NaCl sur la surface foliaire du haricot.

A: 0 g/l NaCl,

B: 3 g/l NaCl,

C: 8 g/l NaCl,

D: 12 g/l NaCl.

L'efficacité des deux souches, en utilisation individuelle ou combinée, diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration en sel, à l'exception de la souche *Pseudomonas C7R12* où elle s'est montrée légèrement stimulée par rapport à son témoin bactérisé non stressé, avec des valeurs respectives de 343, 954 et 326,482 cm². A 12g/l, l'effet a été très prononcé surtout avec l'utilisation individuelle de *Rhizobium phaseoli* qui s'est montrée très sensible par rapport à son témoin bactérisé non stressé, avec des valeurs respectives de 87, 284 et 314, 654 cm². La combinaison des deux souches a été également

affectée très négativement par rapport à son témoin bactérisé non stressé, respectivement, avec les valeurs de 152,56 et 498,944 cm², tandis que l'utilisation individuelle de *Pseudomonas* s'est montrée faiblement affecté par rapport à son témoin bactérisé non stressé, avec des valeurs respectives de 162,970 et 326,482 cm² (Figure 3.6, Tableau 3.1).

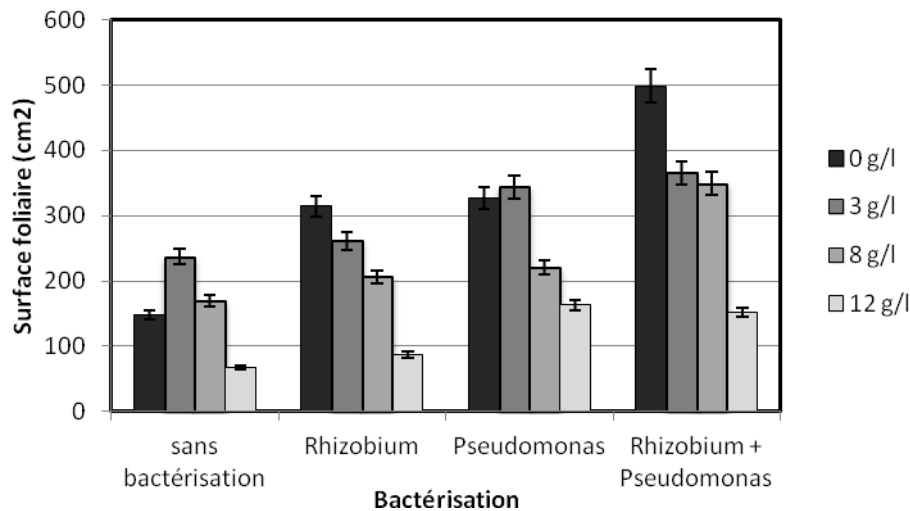


Figure 3.6 : Variation de la surface foliaire des plants bactérisés et non bactérisés aux différentes doses de NaCl.

Les traitements bactériens conduits en conditions salines enregistrent de bons résultats par rapport aux autres traitements stressés et non bactérisés. Nous remarquons une variabilité de réponse entre les différentes applications bactériennes (Figure 3.7) :

- A 3g/l les plants bactérisés avec *Rhizobium* ont révélé la plus faible valeur (260,81 cm²), suivie par ceux bactérisés avec *Pseudomonas* (343,954 cm²), tandis que la combinaison Rh+Ps a montré le meilleur résultat avec une moyenne de 365,246 cm².
- A 8g/l, l'application individuelle des deux souches *Rhizobium* et *Pseudomonas* a donné pratiquement le même effet avec des valeurs respectives de 205,82 et 220,70 cm², alors que leur combinaison a presque doublé la surface foliaire obtenue, avec une moyenne de 349,223 cm².

- L'application sévère du NaCl (12g/l) provoque une diminution considérable de la surface foliaire, mais l'application de *Pseudomonas*, individuelle ou combinée avec *Rhizobium*, fait augmenter la surface foliaire d'une manière très considérable de l'ordre de 162,97 et 152,56 cm² respectivement, par rapport au témoin stressé non bactérisé (67,352 cm²), et même par rapport au témoin non bactérisé et non stressé (148,165 cm²). L'augmentation de la surface foliaire induite par l'application individuelle de *Rhizobium* demeure la plus faible (87,28 cm²) (Figure 3.7, Tableau 3.1).

L'analyse statistique des données a révélé une différence très hautement significative en fonction de l'apport des PGPR et les traitements salins (Appendice D, Annexe 2).

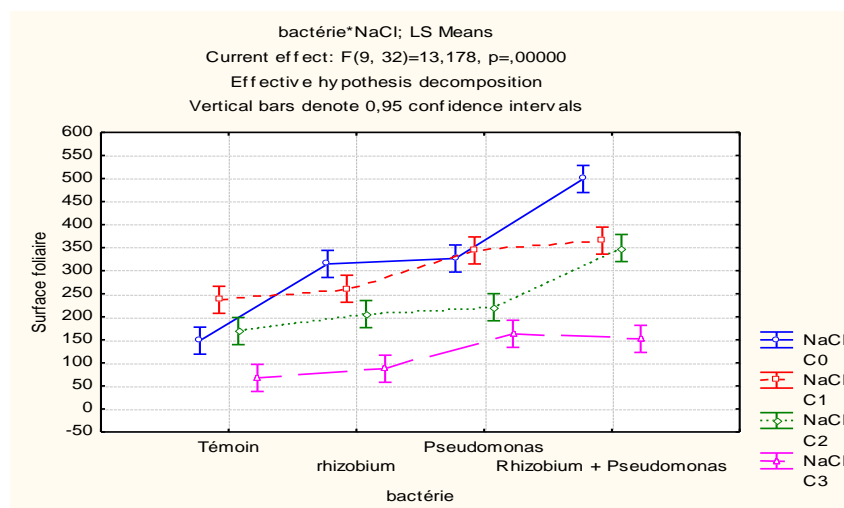


Figure 3.7 : Effet conjugué des deux facteurs (PGPR X NaCl) sur la variation de la surface foliaire

1.3.3 Biomasse fraîche aérienne

L'analyse obtenue des différentes moyennes de la biomasse fraîche aérienne, montre qu'il existe une variation très hautement significative, en fonction de l'inoculation bactérienne (Appendice B, Annexe 3).

Le poids frais aérien a marqué une augmentation très considérable chez les traitements inoculés par les PGPR (Figure 3.8), cependant, la combinaison des

deux souches a induit le plus important résultat avec une moyenne de 29, 2 mg. l'application individuelle de *Rhizobium* ou de *Pseudomonas* a donnée des résultats rapprochés, respectivement, de 22 et 22,83 mg (Tableau 3.1).

L'application des différentes concentrations en NaCl a hautement influencé l'élaboration de la biomasse fraiche aérienne (Appendice C, Annexe 3). A cet effet, Les résultats des moyennes obtenues montrent que hormis la plus faible concentration du sel (3g/l) où la biomasse fraiche aérienne a été stimulé avec une valeur de 13, 66 mg par rapport au témoin 10,97 mg, le stress salin influence très négativement la biomasse fraiche aérienne, qui a diminué de à 7,46 mg à 8g/l et de 1,08 mg à 12g/l (Figure 3.9).

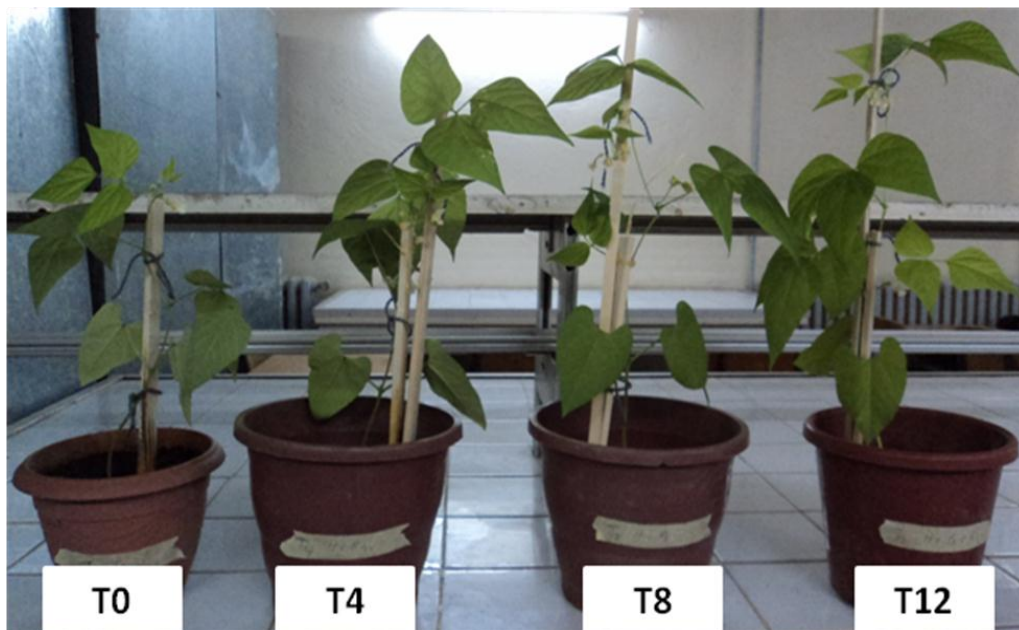


Figure 3.8: Effet de l'inoculation individuelle ou combinée des deux souches PGPR sur la biomasse fraiche aérienne.

(**T0** : Traitement sans bactérie, **T4** : Traitement avec *Rhizobium phaseoli*, **T8** : Traitement avec *Pseudomonas C7R12*, **T12** : Traitement avec *Rhizobium phaseoli* + *Pseudomonas C7R12*).

Selon l'analyse de la variance, la variation de la biomasse fraiche aérienne en fonction de la souche bactérienne et du niveau de NaCl est hautement significative (Appendice D, Annexe 3). tous les plants bactérisés et stressés ont réagi avec une diminution de leur poids frais aérien par rapport aux plants bactérisés non stressés. Cependant, l'effet du NaCl s'est traduit pratiquement de la même manière lors de l'application de *Rhizobium* individuellement ou en combinaison avec *Pseudomonas*; citant le cas de 12 g/l où le poids frais à diminué de 22 à 2,437 mg avec *Rhizobium* et de 29,2 à 6,627 mg avec la

coinoculation des deux souches. La souche *Pseudomonas* a montré un effet plus efficient, où le poids est passé de 22,833 à 4,437 mg (Figure 3.9, Tableau 3.1).

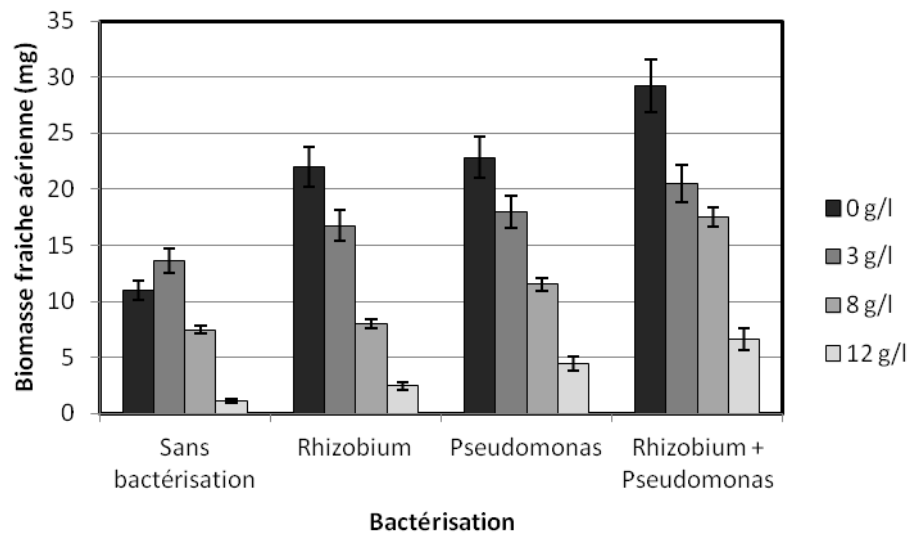


Figure 3.9 : Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la biomasse fraîche aérienne des plants bactérisés et non bactérisés.

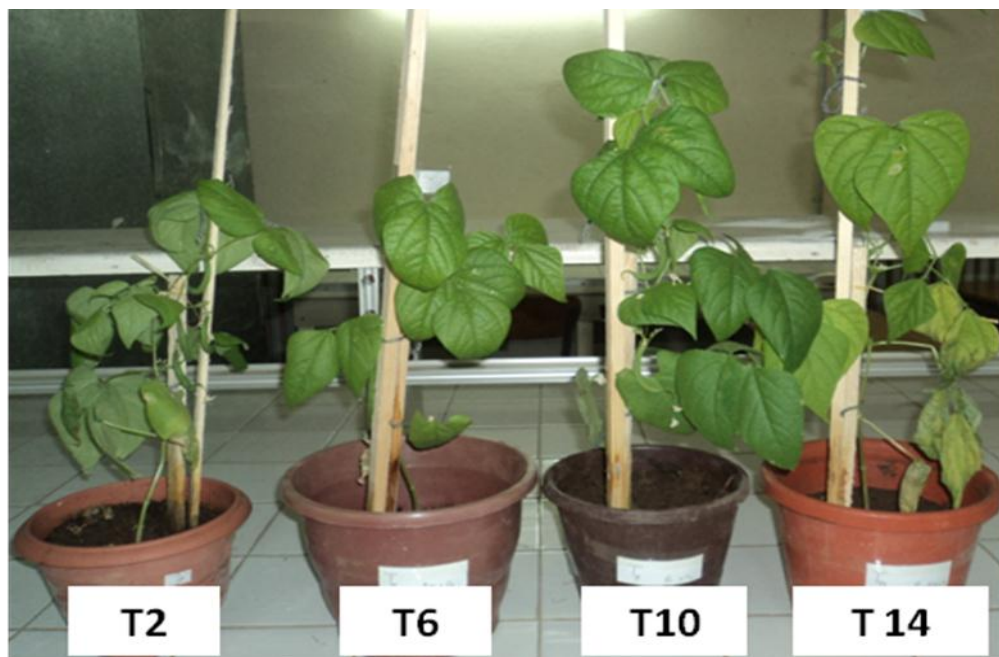


Figure 3.10 : Effet de l'application des PGPR et des doses du NaCl sur la biomasse fraîche aérienne.

T2 : 8g/l NaCl. **T6** : 8g/l NaCl + *Rhizobium phaseoli*.

T10 : 8g/l NaCl + *Pseudomonas C7R12*.

T14 : 8g/l NaCl + *Rhizobium phaseoli* + *Pseudomonas C7R12*.

Les souches bactériennes appliquées ont montrés un effet phytostimulateur sur ce paramètre quelque soit la concentration en NaCl (Figure 3.10). En effet, tous les plants stressés et bactérisés ont réagit avec une augmentation de leur poids frais par rapport aux plants stressés non bactérisés. Toutefois, il est à signaler que les meilleurs résultats sont ceux enregistrés chez la combinaison des deux bactéries à 3, 8 et 12 g/l avec des moyennes de 20,53, 17,53 et 6,62 mg respectivement. La bactérisation des plants avec *Rhizobium* a montré le résultat le plus faible avec des valeurs de 16,76, 7,96 et 2,47 mg respectivement aux concentrations de 3, 6 et 12 g/l. la bactérisation des plants avec *Pseudomonas* a révélé des résultats modérés avec une moyenne de 17,93 mg à 3 g/l, 11,5 mg à 8g/l et 4,43 mg à 12 g/l (Figure 3.11,Tableau 3.1).

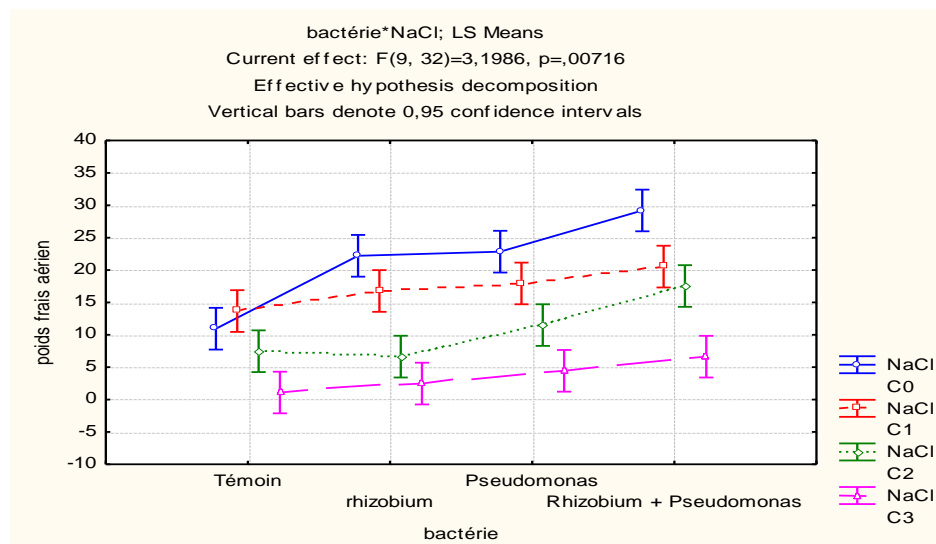


Figure 3.11 : Variation de la biomasse fraîche aérienne en fonction de l'effet conjugué des doses du NaCl et des PGPR.

1.3.4 Biomasse sèche aérienne

L'examen de la biomasse sèche aérienne montre également des variations très hautement significatives en fonction de l'apport des PGPR (Appendice B, Annexe 4). La meilleure biomasse sèche aérienne a été enregistrée chez les plants inoculés par la combinaison des deux souches (1,82 mg), suivie par ceux inoculés par *Pseudomonas* (1,58 mg) et ceux inoculés par *Rhizobium* ont un poids, considéré comme le plus faible, de 1,39 mg (Figure 3.12, Tableau 3.1).

L'application des différents niveaux de sel a influencé significativement l'élaboration de la matière sèche aérienne, où elle a été sensiblement réduite

(0,33 mg à 12g/l), légèrement stimulée à 3g/l (0,99 mg), et elle n'a pas été affecté à 8 g/l (Appendice C, Annexe 4).

Pour tous les plants bactérisés et stressés, la biomasse sèche aérienne a diminué progressivement avec l'augmentation du NaCl. A 3 g/l, la diminution a été légèrement faible avec des valeurs de 1,303 par rapport à 1,390 mg en application de *Rhizobium*, 1,230 par rapport à 1,583 mg pour *Pseudomonas* et 1,373 par rapport à 1,823 mg en cas de la coinoculation des deux souches. A 12 g/l, l'application individuelle des deux souches a été plus sensible par rapport à leur coinoculation, où nous avons enregistré une diminution de 1,390 à 0,679 mg pour *Rhizobium* et de 1,583 à 0,757 mg pour *Pseudomonas* et de 1,823 à 1,013 mg lors de la coinoculation (Figure 3.12, Tableau 3.1).

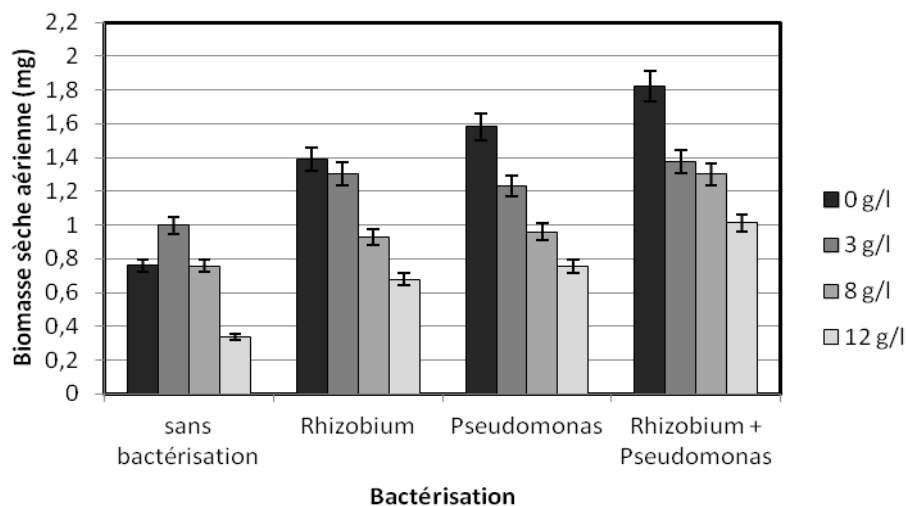


Figure 3.12 : Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la biomasse sèche aérienne des plants bactérisés et non bactérisés.

L'analyse statistique obtenue indique que l'interaction des deux facteurs (PGPR X NaCl) influence de façon hautement significative l'élaboration de la matière sèche aérienne (Appendice D, Annexe 4). En effet, et comparativement aux plants stressés non bactérisés, nous avons remarqué une amélioration considérable de la biomasse sèche aérienne quelque soit la dose du NaCl (Figure 3.13), à 3g/l l'inoculation de plants avec la combinaison Rh+Ps a donné le meilleur résultat, suivi par la souche *Rhizobium* et enfin la souche *Pseudomonas* avec des valeurs respectives de 1,37, 1,30 et 1,23 mg. A 8g/l le meilleur résultat est enregistré chez la combinaison Rh+Ps avec une moyenne de 1,30 mg suivi par

0,96 mg avec la souche *Pseudomonas* et 0,93 mg avec la souche *Rhizobium*, ces résultats sont supérieurs même au témoin non stressé. A 12g/l la combinaison Rh+Ps demeure celle qui détient le meilleur résultat avec une valeur de 1,01 mg par rapport au témoin stressé non bactérisé (0,33 mg) et même par rapport au témoin non stressé et non bactérisé (0,76 mg) suivi par la souche *Pseudomonas* avec une moyenne de 0,75mg et 0,67 mg avec la souche *Rhizobium* (Tableau 3.1).

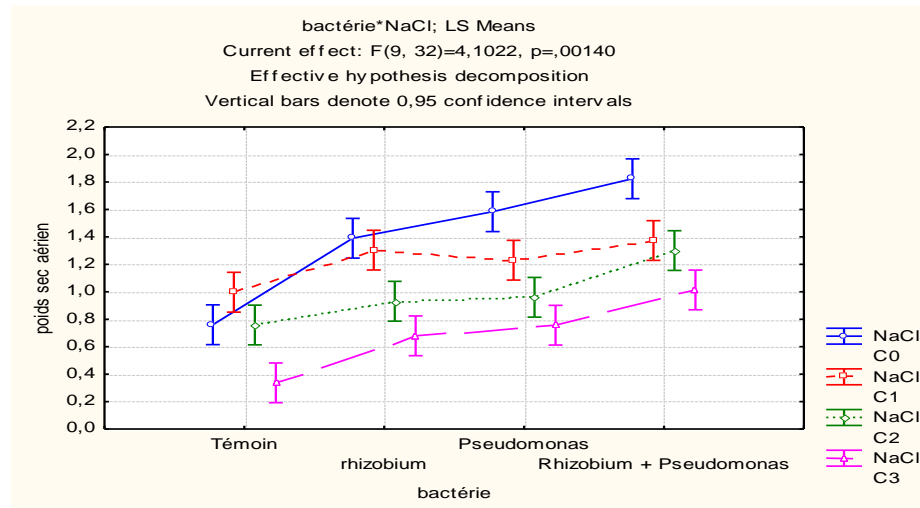


Figure 3.13: Variation du poids sec aérien en fonction de l'effet conjugué des doses du NaCl et des PGPR.

1.3.5 Longueur des tiges

D'après l'analyse statistique (ANOVA), la longueur de la tige s'est montrée significativement hautement influencée par l'apport des PGPR (Appendice B, Annexe 5) avec une moyenne de 38,66 cm chez les traitements inoculés par *Rhizobium* et de 37,33 cm chez ceux inoculés par *Pseudomonas*. Le résultat le plus important est enregistré chez les traitements inoculés par la combinaison *Rhizobium + Pseudomonas* avec une longueur de 46,66 cm (Tableau 3.1).

L'effet du NaCl a induit une variation de la longueur de la tige chez tous les plants conduits sous stress salin (Figure 3.14). Cependant, à la concentration 3g/l, la longueur de la tige semble avoir été stimulée par rapport au témoin non stressé avec des valeurs respectives de 30,66 et 29,66 cm. Au-delà de cette concentration, la longueur de la tige commence à diminuer, et à ce propos on note des valeurs de 26,83 cm à 8g/l et de 27,33 cm à 12g/l.

L'analyse statistique des résultats montre qu'il n'existe aucune variation significative de ce paramètre sous l'effet de la salinité (Appendice C, Annexe 5).

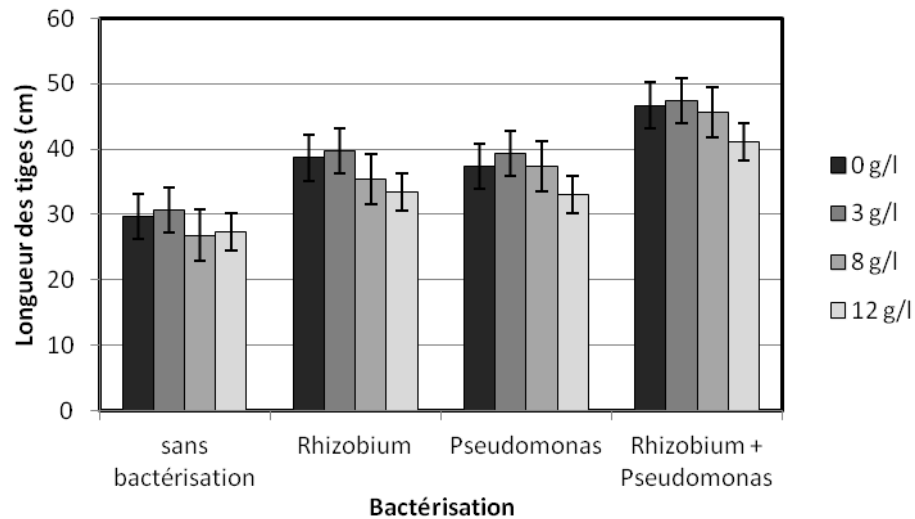


Figure 3.14 : Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la longueur des tiges des plants bactérisés et non bactérisés.

Hormis à la plus faible concentration testée (3 g/l en NaCl) où la longueur de la tige a été légèrement stimulée pour les trois applications bactériennes, la salinité a influencé négativement ce paramètre chez tous les plants bactérisés stressés par rapport à ceux bactérisés non stressés; la diminution enregistrés n'était pas très prononcée, cependant avec *Rhizobium* nous avons enregistré une moyenne de 35,333 cm à 8 g/l et 33,500 cm à 12 g/l par rapport à 38,667 cm du témoin. Avec *Pseudomonas*, la diminution n'a été enregistrée qu'à 12 g/l par rapport au témoin bactérisé non stressé, avec des valeurs respectives de 33 et 37,333 cm. Concernant la coinoculation, en comparaison au témoin bactérisé non stressé, où la longueur est de 46,667 cm, la diminution était légèrement faible à la concentration de 8 g/l avec 45,667 cm, et plus ou moins faible à 12 g/l avec 41,167 cm (Figure 3.14, Tableau 3.1).

Concernant l'application des souches PGPR, et selon l'ANOVA il s'avère que la longueur de la tige varie d'une manière non significative en fonction de l'interaction (PGPR X NaCl) (Appendice D, Annexe 5).

Néanmoins, tous les plants stressé bactérisés ont montré une augmentation de la longueur de la tige par rapport à ceux stressés non bactérisés et même par rapport à ceux non stressés et non bactérisés (figure 3.15) avec la supériorité des résultats obtenus suite à l'inoculation des plants par la combinaison Rh+Ps où nous avons enregistré des longueur de 47,33 cm à 3 g/l, 45,66 cm à 8g/l et 41,16 cm à 12 g/l. La longueur de la tige a été stimulé pratiquement de la même manière par l'inoculation individuelle avec les deux souches *Rhizobium* et *Pseudomonas* respectivement avec des valeurs de 39,66 et 39,33 cm à 3 g/l, 35,33 et 37,33 cm à 8 g/l, et 33,5 et 33 cm à 12 g/l (Tableau 3.1).

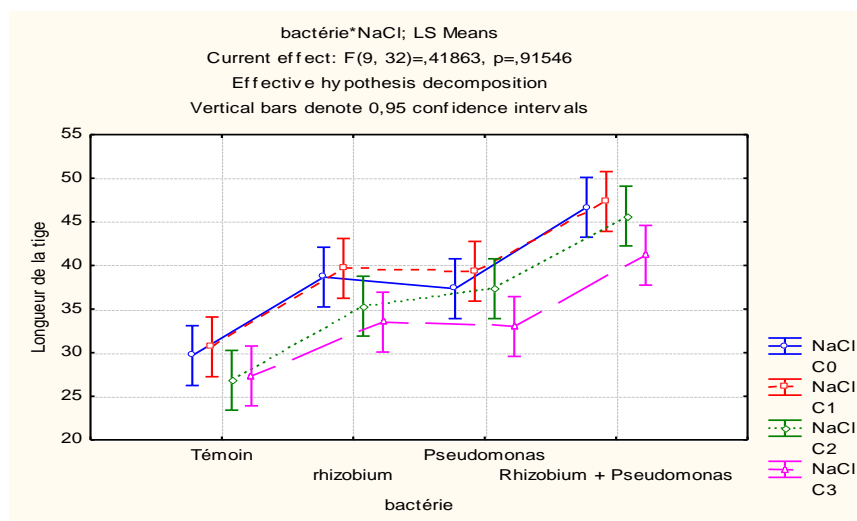


Tableau 3.1: Effet de l'application conjuguée des différentes concentrations de NaCl et des souches PGPR sur l'élaboration des paramètres morphologiques de la partie aérienne.

		Témoin (sans bactéries)				<i>Rhizobium phaseoli</i> (Rh)				<i>Pseudomonas C7R12</i> (Ps)				Rh + Ps			
NaCl (g/l)		c0	c1	c2	c3	c0	c1	c2	c3	c0	c1	c2	c3	c0	c1	c2	c3
Nombre de feuilles **		16,333 ^a	17,333	16,333	7,00	24,333	18	15,333	9,667	24,667	30,00	14,00	13,333	29,00	24,00	21,667	12,00
		± 3,512 ^b	± 5,132	± 2,517	± 1,00	± 2,082	± 2,646	± 2,082	± 2,517	± 2,517	± 1,732	± 2,646	± 3,786	± 3,00	± 2,646	± 4,041	± 3,00
Surface foliaire ***		148,16	236,82		67,35	314,65	260,81	205,82	87,28	326,48	343,95	220,70	162,97		365,24		
		5	3	168,96	±	4	3	4	±	2	4	4	0	498,944	6	349,223	152,56
		± 23	± 29,304	± 19,501	± 19,10	± 22,219	± 16,269	± 19,605	± 4	± 18,92	± 25,703	± 28,924	± 28,869	± 17,607	± 35,180	± 31,582	± 27,187
Poids aérien **	frais	10,97	13,667	7,467	1,087	22	16,767	7,967	2,473	22,833	17,933	11,5	4,437	29,2	20,533	17,533	6,627
		± 2,730	± 4,718	± 2,312	± 0,163	± 3,2	± 2,804	± 1,102	± 0,709	± 4,215	± 3,899	± 1,559	± 1,055	± 2,358	± 3,516	± 1,856	± 1,448
Poids aérien **	secs	0,760	0,997	0,758	0,337	1,390	1,303	0,931	0,679	1,583	1,230	0,960	0,757	1,823	1,373	1,300	1,013
		± 0,080	± 0,181	± 0,291	± 0,103	± 0,075	± 0,070	± 0,087	± 0,035	± 0,081	± 0,180	± 0,066	± 0,060	± 0,131	± 0,101	± 0,098	± 0,068
Longueur des tiges -					27,33				33,50								
		29,667	30,667	26,833	3	38,667	39,667	35,333	0	37,333	39,333	37,333	33,00	46,667	47,333	45,667	41,167
	± 3,514	± 2,082	± 2,566	± 3,512	± 1,528	± 0,577	± 2,517	± 1,803	± 4,163	± 4,933	± 4,619	± 2,646	± 2,309	± 1,528	± 2,517	± 2,021	

C0 : 0 g/l, C1 : 3 g/l, C2 : 8 g/l, C3 : 12g/l.

a : moyenne issue de trois répétitions, b : ecartype.

Effet des l'interaction des deux facteurs (PGPR X NaCl) : - Non significatif, * Significatif, ** Hautement significatif, ***très hautement significatif.

1.4 Paramètres morphologiques de la partie racinaire

1.4.1 Biomasse fraîche racinaire

L'analyse de la variance montre qu'il existe une variation très hautement significative entre les différentes moyennes de la biomasse fraîche racinaire en fonction de l'application des souches bactériennes (Appendice B, Annexe 6). Les deux souches, que ce soit individuellement ou en combinaison, ont montré des résultats nettement supérieurs à ceux du témoin non bactérisé, dont leur combinaison induit toujours le meilleur résultat avec une moyenne de 0,72 mg, suivi par la souche *Rhizobium* avec 0,40 mg et enfin *Pseudomonas* avec une moyenne de 0,30 mg (Tableau 3.2).

D'après les analyses statistiques, les résultats de la biomasse fraîche racinaire montrent que sa variation n'est pas significative en fonction de l'application du NaCl (Appendice C, Annexe 6). La comparaison des résultats en fonction des différentes doses appliquées montre que la réduction la plus élevée est enregistrée chez les plants conduits à 12g/l avec 0,10 mg, cependant à 3 et à 8g/l, la biomasse fraîche racinaire est négativement influencée de la même manière avec une moyenne de 0,14 mg (Figure 3.16, Tableau 3.2).

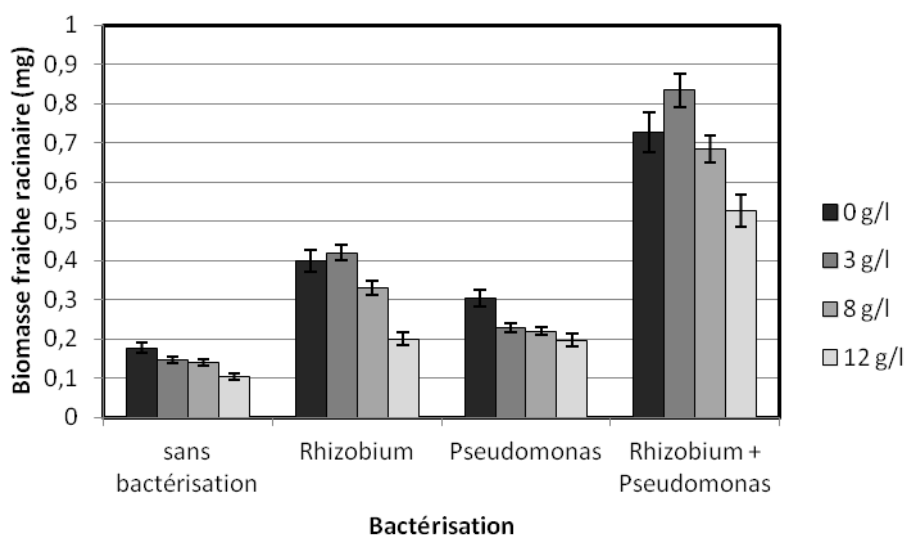


Figure 3.16 : Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la biomasse fraîche racinaire des plants bactérisés et non bactérisés.

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté qu'à l'exception de la dose 3 g/l, les doses de NaCl influencent de manière négative la biomasse fraîche

racinaire des plants bactérisés stressés par rapport à ceux bactérisés non stressés. En effet, l'application de la combinaison des deux souches semble plus efficace par rapport à leurs applications individuelles, où en comparaison au témoin (0,727 mg) nous avons enregistré un poids de 0,527 mg à 12 g/l et de 0,683 mg à 8 g/l. tandis que pour l'application individuelle de la souche *Pseudomonas* la diminution à 12 g/l est plus ou moins faible par rapport à son témoin bactérisé non stressé avec des valeurs respectives de 0,197 et 0,303 mg. L'application individuelle de *Rhizobium* a été fortement affectée par rapport à son témoin bactérisé non stressé avec des valeurs respectives de 0,200 à 0,400 mg à 12 g/l (Figure 3.16, Tableau 3.2).

L'estimation de ce paramètre a révélé un effet phytostimulateur chez tous les plants bactérisés conduits en milieu salin par rapport aux témoins stressés non bactérisés (Figure 3.17), avec une variation très hautement significative (Appendice D, Annexe 6).

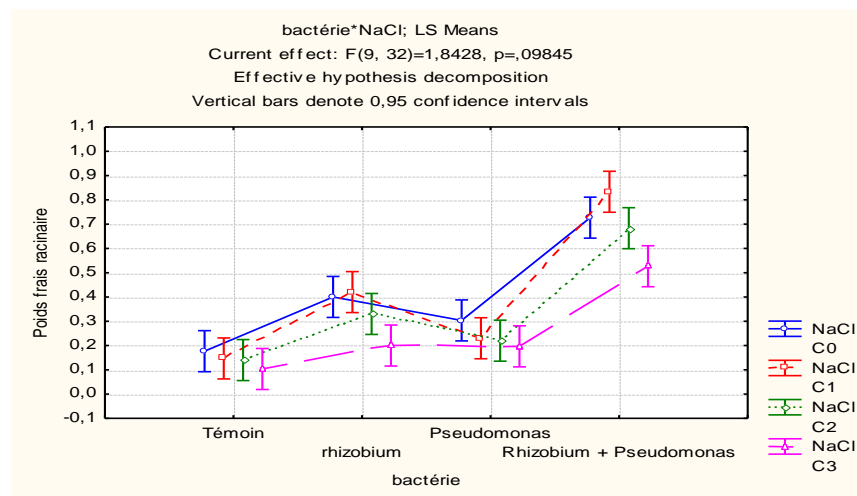


Figure 3.17: Effet conjugué de la salinité et des PGPR sur la biomasse fraîche racinaire.

En effet, à la même dose du sel l'amélioration de la biomasse fraîche racinaire est différente en fonction de la souche utilisée, cependant il est à noter la supériorité des résultats obtenus par l'application combinée des deux souches avec des valeurs de 0,83, 0,68 et 0,52 mg respectivement à 3g/l, 8g/l et 12 g/l. Des résultats aussi appréciables ont été obtenus par l'application individuelle de *Rhizobium* avec des valeurs de 0,42 mg à 3g/l, 0,33 mg à 8g/l et 0,20 mg à 12 g/l.

Les résultats de phytostimulation les moins appréciables sont enregistrés chez les plants inoculés par *Pseudomonas* avec des valeurs de 0,23 mg à 3 g/l, 0,22 mg à 8g/l et 0,19 à 12 g/l (Tableau 3.2).

1.4.2 Biomasse sèche racinaire

Selon l'ANOVA, il se démontre que la bactérisation a induit un effet de phytostimulation très hautement significatif sur la variation de la biomasse sèche racinaire (Appendice B, Annexe 7), par rapport au témoin non bactérisé (0,09 mg) le meilleur résultat de 0,50 mg est enregistré chez les plants bactérisés avec la combinaison des deux souches, les plants inoculés par la souche *Rhizobium* ont enregistré une valeur de 0,31 mg, alors que l'inoculation des plants par la souche *Pseudomonas* a enregistré le résultat le plus faible de 0,16 mg (Tableau 3.2).

L'analyse de la variance fait révéler que l'application des différentes doses de NaCl n'a aucun effet significatif sur la production en biomasse sèche racinaire (Appendice C, Annexe 7). En comparaison avec le témoin non stressé (0,09 mg), cette dernière diminue proportionnellement avec l'augmentation de la dose en NaCl de l'ordre de 0,07 mg à 3g/l, 0,06 mg à 8g/l et 0,05 mg à 12g/l (Tableau 3.2, Figure 3.18).

En comparant les résultats de chaque traitement bactérien stressé par rapport à son témoin bactérisé non stressé, il s'avère que pour l'application individuelle de *Pseudomonas*, la biomasse sèche racinaire a diminué progressivement avec l'augmentation de NaCl et atteint 0,097 mg à 12 g/l par rapport à 0,163 mg du témoin. L'application individuelle ou combinée de *Rhizobium* n'a été affectée qu'à 8 et 12 g/l où la biomasse sèche racinaire est respectivement de 0,243 et 0,130 mg par rapport à 0,317 mg du témoin pour l'application individuelle et de 0,423 et 0,370 mg par rapport à 0,507 mg du témoin pour l'application combinée des deux souches (Figure 3.18, Tableau 3.2)

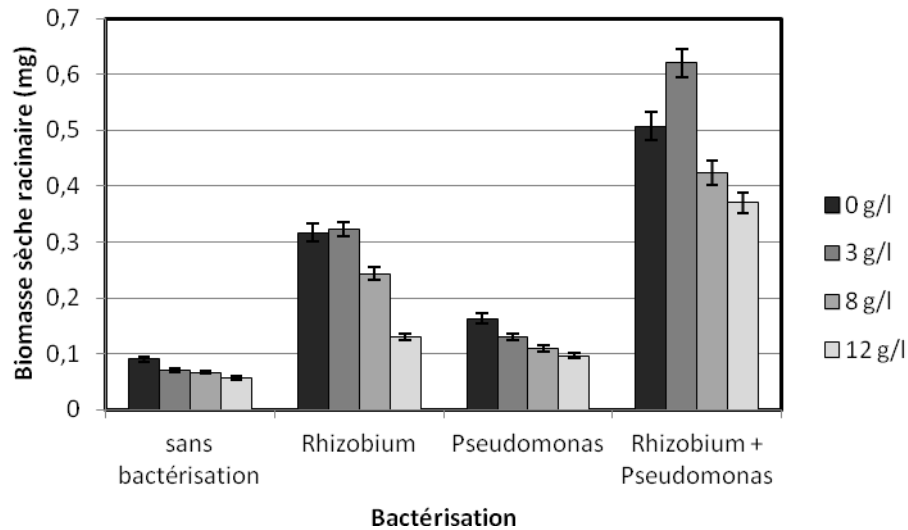


Figure 3.18 : Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la biomasse sèche racinaire des plants bactérisés et non bactérisés.

Selon l'ANOVA, la variabilité de la biomasse sèche racinaire n'a montré aucun effet significatif avec l'interaction des deux facteurs (Appendice D, Annexe 7).

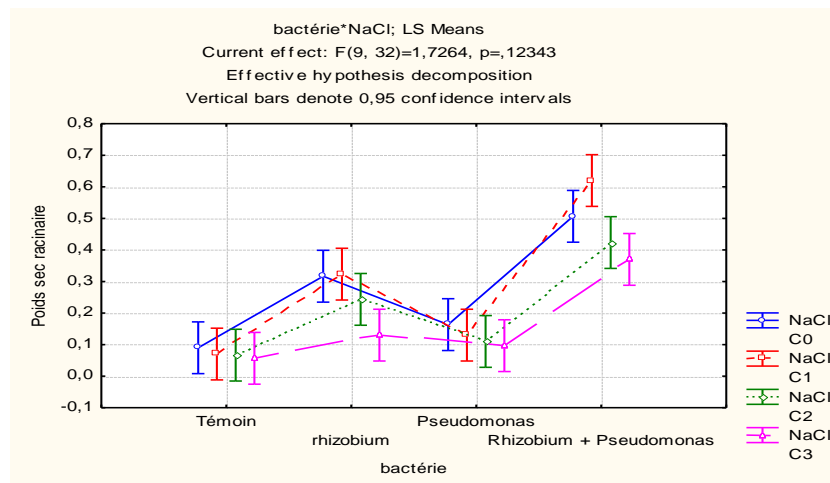


Figure 3.19: Variation du poids sec racinaire en fonction de l'effet conjugué des doses de NaCl et des PGPR

Néanmoins, l'estimation des résultats nous laisse constater que l'élaboration de la matière sèche racinaire est positivement influencée par l'apport des PGPR en milieu salin avec une variabilité de réponse en fonction de la souche utilisée (Figure 3.19). La combinaison des deux souches donne toujours les meilleurs résultats de l'ordre de 0,62 mg à 3 g/l, 0,42 mg à 8g/l et 0,37 mg à 12 g/l. l'application de *Rhizobium* a enregistré des valeurs plus ou moins considérables de l'ordre de 0,32 mg à 3 g/l, 0,24 mg à 8g/l, et 0,13 mg à 12 g/l. Les résultats de

stimulation les plus faibles ont été obtenus avec la souche *Pseudomonas* donnant des résultats de 0,13, 0,11 et 0,09 mg respectivement aux concentrations de 3 g/l, 8 g/l et 12 g/l en NaCl (Tableau 3.2).

1.4.3 Longueur des racines

D'après les résultats obtenus, la longueur racinaire est hautement influencée par l'apport des PGPR (Appendice B, Annexe 8). La phytostimulation est variable selon la souche bactérienne, où par rapport à leur témoin non bactérisé dont la longueur est de 13 cm, nous avons enregistré une augmentation à 30,66 cm chez les plants bactérisés avec *Pseudomonas*, suivi par une longueur de 29,66 cm chez les plants bactérisés par la combinaison *Rhizobium+Pseudomonas*, et une longueur plus faible de 22,33 cm chez les plants bactérisés par *Rhizobium* (Tableau 3.2).

D'après les résultats des moyennes obtenues, l'application des différentes doses de NaCl sur les plants de haricot a induit une nette différence de la longueur des racines par rapport à leurs témoins (Tableau 3.2).

L'ANOVA montre que l'allongement de la racine n'est pas significativement dépendant de la concentration en NaCl (Appendice C, Annexe 8). Ce paramètre a été moins sensible au stress salin et il n'a été affecté qu'à 12g/l avec une faible diminution, enregistrant une moyenne de 12 cm par rapport à 13 cm du témoin non stressé, par contre il a été stimulé aux doses 3 et 8g/l, donnant des valeurs respectives de 13,33 et 15 cm (Figure 3.20).

La comparaison, entre les traitement bactérisés stressés par rapport à leurs témoins bactérisés non stressés, montre que l'application de *Rhizobium* individuellement est très faiblement influencée par l'augmentation de la dose du NaCl où elle a marqué une moyenne de 21 cm à 12 g/l par rapport à son témoin bactérisé non stressé (22,333 cm). L'application individuelle de *Pseudomonas* et la coinoculation des deux souches se sont montrées légèrement plus sensibles avec des valeurs de 23,667cm par rapport au témoin (30,667 cm) pour *Pseudomonas*, et 23,667 cm par rapport au témoin (29,667 cm) pour la coinoculation des deux souches (Tableau 3.2).

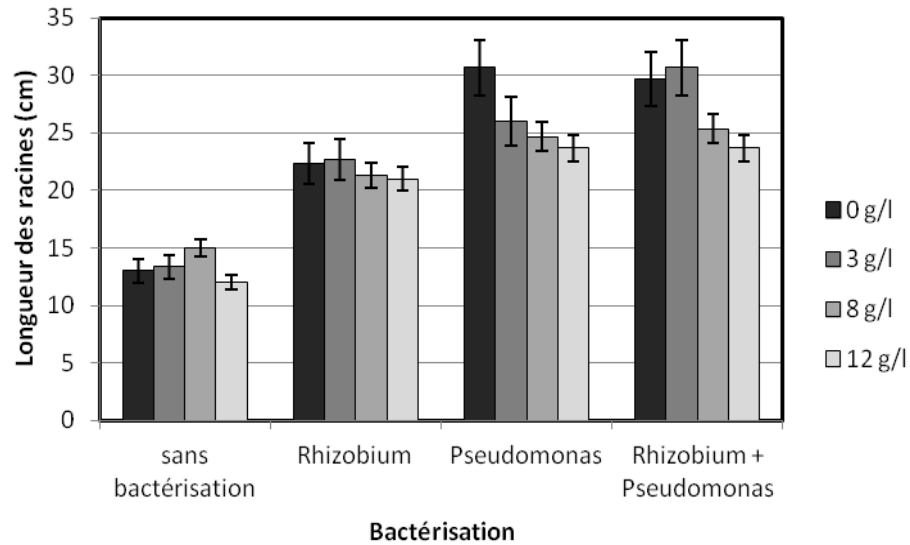


Figure 3.20 : Effet des différentes doses de NaCl sur la variation de la longueur des racines des plants bactérisés et non bactérisés.

Malgré qu'aucun effet significatif n'a été révélé sur la variabilité de la longueur de la racine en fonction de l'application des deux facteurs (Appendice D, Annexe 8), la comparaison des résultats obtenus montre clairement l'effet phytostimulateur des PGPR sur l'élongation de la racine en milieu salin (Figure 3.21).

A la même dose de NaCl et comparativement aux témoins non bactérisés, la phytostimulation est variable en fonction de la souche appliquée, toutefois il est à signaler que les meilleurs résultats sont obtenus avec la combinaison des deux souches Rh+Ps et l'application individuelle de *Pseudomonas* avec des longueurs de 30,66 et 26 cm, respectivement, à 3 g/l, 25,33 et 24,66 cm à 8g/l, et 23,66 cm à 12 g/l. L'application de *Rhizobium* donne les résultats les plus faibles avec des valeurs de 22,66 cm à 3 g/l, 21,33 cm à 8g/l et 21 cm à 12 g/l (Tableau 3.2).

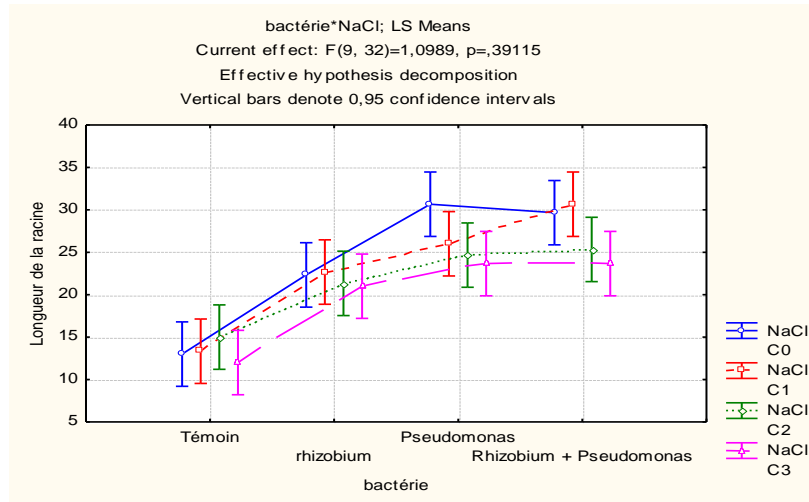


Figure 3.21: Variation de la longueur de la racine en fonction de l'effet conjugué des doses de NaCl et des PGPR

1.5 Nombre de nodules

Les résultats de l'analyse de la variance indiquent un effet très hautement significatif de l'inoculation bactérienne sur le développement du nombre de nodules (Appendice B, Annexe 9). Il s'avère que la combinaison de *Rhizobium* avec *Pseudomonas* améliore significativement le nombre de nodules des plants et enregistre une moyenne de 95,33 nodules par rapport à ceux inoculés seulement avec *Rhizobium* (76,33 nodules) (Tableau 3.2). Chez les témoins non bactérisés et les plants bactérisés avec *Pseudomonas* seule, aucun nodule n'a été dénombré à cause de l'absence de Rhizobia fixatrices d'azote atmosphérique.

On s'appuyant sur l'ANOVA, il s'avère que les différentes doses de NaCl appliquées influencent de façon très hautement significative le nombre de nodules (Appendice C, Annexe 9). Les résultats obtenus indiquent que l'accroissement de la teneur en NaCl au niveau du milieu influe de manière négative sur le nombre de nodules par plant. En comparaison au témoin non stressé (76,33 nodules), ce nombre chute progressivement dès la plus faible concentration (75 nodules), et atteint 57,66 nodules à 8g/l, et n'est que de 20 nodules à 12g/l (Figure 3.22, Tableau 3.2).

Concernant l'effet de l'interaction des deux facteurs (NaCl X PGPR), la comparaison se fait entre les plants bactérisés par *Rhizobium* et ceux bactérisés par la combinaison Rh+Ps conduits sous les différentes concentrations salines, du fait que l'absence de *Rhizobium* dans le substrat ne permette pas le développement des nodules.

Dans ce contexte, les résultats montrent que tous les plants bactérisés stressés ont développé moins de nodules par rapport à leurs témoins bactérisés non stressés. En effet, l'application combinée des deux souches s'avère plus résistante à la dose 12 g/l (29 nodules) par rapport à 95 du témoin non stressé, tandis qu'avec l'application individuelle le nombre est de 20 nodules par rapport à 76 du témoin non stressé (Tableau 3.2).

D'après l'analyse statistique des résultats, il s'avère que l'effet conjugué des deux facteurs n'exerce aucun effet significatif sur le nombre de nodule (Appendice D, Annexe 9). Malgré ça, l'application combinée de *Rhizobium* et *Pseudomonas* a induit un effet phytostimulateur du nombre de nodules en comparaison avec l'application individuelle de *Rhizobium*, et ce pour toutes les doses de NaCl testées (Figure 3.23), avec une légère augmentation qui passe de 75 à 86 nodules à 3g/l, de 57 à 68 à 8g/l, et de 20 à 29 nodules à 12 g/l.

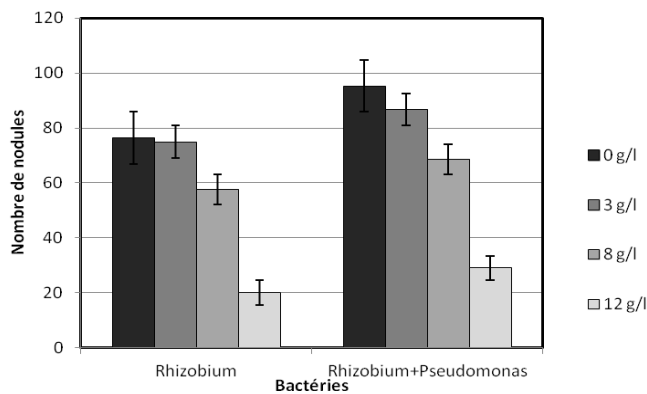


Figure 3.22 : Effet des différentes doses de NaCl sur la variation du nombre de nodules des plants bactérisés et non bactérisés.

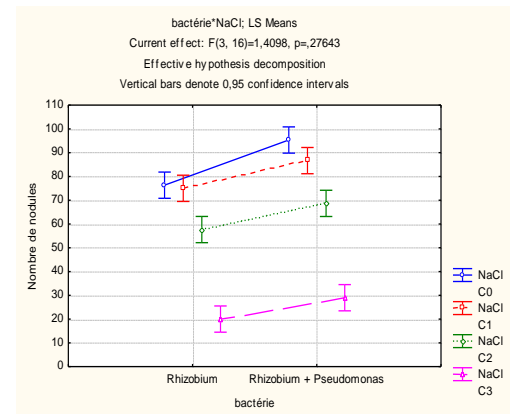


Figure 3.23: Variation du nombre de nodules en fonction de l'effet conjugué des doses du NaCl et des PGPR.

Tableau 3.2: Effet de l'application conjuguée des différentes doses de NaCl et des souches PGPR sur l'élaboration des paramètres morphologiques de la partie racinaire et du nombre de nodules.

	Témoin (sans bactéries)				<i>Rhizobium phaseoli</i> (Rh)				<i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 (Ps)				Rh + Ps			
	c0	c1	c2	c3	c0	c1	c2	c3	c0	c1	c2	c3	c0	c1	c2	c3
Poids frais racinaire (mg)	0,177 ^a ± 0,015 ^b	0,147 ± 0,031	0,140 ± 0,046	0,103 ± 0,035	0,400 ± 0,080	0,420 ± 0,080	0,330 ± 0,072	0,200 ± 0,030	0,303 ± 0,061	0,230 ± 0,050	0,220 ± 0,053	0,197 ± 0,070	0,727 ± 0,116	0,833 ± 0,080	0,683 ± 0,095	0,527 ± 0,127

Poids sec racinaire (mg)	0,090 ± 0,010	0,070 ± 0,020	0,067 ± 0,031	0,057 ± 0,025	0,317 ± 0,075	0,323 ± 0,070	0,243 ± 0,061	0,130 ± 0,036	0,163 ± 0,038	0,130 ± 0,056	0,110 ± 0,044	0,097 ± 0,042	0,507 ± 0,035	0,620 ± 0,177	0,423 ± 0,091	0,370 ± 0,106
-																
Longueur des racines (cm)	13 ± 2	13,33 ± 4,726	15 ± 1,732	12 ± 2,646	22,33 ± 3,055	22,667 ± 3,055	21,333 ± 2,517	21 ± 3,606	30,667 ± 5,686	26 ± 2	24,667 ± 2,082	23,667 ± 2,517	29,667 ± 4,041	30,667 ± 2,082	25,333 ± 3,512	23,667 ± 3,512
-																
Nombre de nodules	0	0	0	0	76,333 ± 2,517	75 ± 3,606	57,667 ± 3,215	20 ± 1	0	0	0	0	95,333 ± 3,512	86,667 ± 2,517	68,667 ± 9,609	29 ± 4,583
-																

C0 : 0g/l, C1 : 3g/l, C2 : 8g/l, C3 : 12g/l.

a : moyenne issue de trois répétitions, b : ecartype.

Effet de l'interaction des deux facteurs (souches X NaCl) : - Non significatif, * Significatif, ** Hautement significatif, *** Très hautement significatif.

1.6 Evaluation des gains

En absence du sel, les gains en phytostimulation sont nettement meilleurs, notamment en surface foliaire et en biomasses fraîche et sèche aérienne et racinaire (Tableau 3.3). la coinoculation des deux souches s'est montrée la plus efficace pour tous les paramètres de phytostimulation mesurés avec des gains allant de 57,30 % à 462 %, à l'exception de la longueur de la racine où le meilleur résultat est obtenu suite à l'application individuelle de *Pseudomonas* (135,89%) (Tableau 3.3).

La comparaison des gains relatifs à l'application individuelle de *Rhizobium* ou de *Pseudomonas* a montré que les deux souches se sont montrées efficaces pour un paramètre et moins pour l'autre. En effet l'application individuelle de *Pseudomonas* a induit des gains supérieurs à ceux induits par *Rhizobium* pour les cas de la surface foliaire, du poids frais aérien, du poids sec aérien et du nombre de feuilles, alors que l'application individuelle de *Rhizobium* a induit des gains de longueur de la tige, du poids frais racinaire et du poids sec racinaire supérieurs à ceux induits par *Pseudomonas*.

Pour le nombre de nodules, les résultats montrent que l'application combinée des deux souches améliore la situation nodulaire avec 24,89%.

Concernant les résultats de phytostimulation en présence du sel, nous avons remarqué que parmi tous les paramètres mesurés, les biomasses fraîche et sèche racinaire ainsi que la longueur des racines sont les paramètres les mieux stimulés, en présence de l'inoculation individuelle ou combinée des deux souches.

Selon les résultats, il s'avère également que quelque soit la dose du sel, la coinoculation des deux souches demeure celle qui induit les meilleurs résultats pour tous les paramètres avec des gains allant de 32,65% à 785,71% à l'exception de la surface foliaire à 12 g/l et de nombre de feuilles à 3 et à 12 g/l, où la souche *Pseudomonas* s'est montrée plus efficace (Tableau 3.3)

Nous observons également une variabilité des réponses des autres applications bactériennes individuelles en fonction de la variation des doses de NaCl. En effet, pour le même paramètre mesuré, une souche se montre efficace à une dose donnée alors que l'autre se montre efficace à une autre dose ; à l'exemple du poids sec aérien où à 3 g/l *Rhizobium* a induit un meilleur gain

(30,76%) par rapport à celui de *Pseudomonas* (23,41%), alors qu'à 8 g/l et 12 g/l *Pseudomonas* s'est montré plus efficace avec un gain de 26,64% par rapport à 22,82 % et 124,75 % par rapport à 101,78% respectivement. Nous notons également l'exemple de la longueur de la tige, où à 3 g/l et à 12 g/l *Rhizobium* s'est montrée efficace et le contraire à 8 g/l (Tableau 3.3).

Pour les autres paramètres, et quelque soit la dose testée nous enregistrons parfois la supériorité des résultats de l'application individuelle de la souche *Pseudomonas* et parfois le contraire ; citant le cas de la surface foliaire, du poids frais aérien et de la longueur de la racine où les meilleurs résultats sont enregistrés chez les plants inoculés par *Pseudomonas* individuellement, tandis que les meilleurs résultats en poids frais racinaire et en poids sec racinaire sont enregistrés chez les plants inoculés par *Rhizobium* individuellement.

Concernant le nombre de nodules, les résultats montrent que l'application combinée des deux souches l'améliore quelque soit la dose de NaCl, avec des gains de 15,55% à 3g/l, 19,09% à 8 g/l et 45% à 12 g/l (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Evaluation des effets comparatifs des différentes applications bactériennes en présence et en absence du sel (%).

paramètres	phytostimulation sans sel			Phytostimulation avec sel								
	Rh	Ps	Rh + Ps	Rh			Ps			Rh + Ps		
				C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Nombre des feuilles	48,97	51,02	77,55	3,84	-6,12	38,09	73,76	-14,28	90,47	38,46	32,65	71,42
Surface foliaire	112,36	120,35	236,74	10,13	21,81	29,59	45,23	30,62	141,96	54,22	106,68	125,76
Poids frais aérien	100,54	108,14	166,18	22,68	6,69	127,60	31,21	54,01	308,28	50,24	134,82	509,81
Poids sec aérien	82,89	108,33	139,91	30,76	22,82	101,78	23,41	26,64	124,75	37,79	71,50	200,99
Longueur de la tige	30,33	25,84	57,30	29,34	31,67	22,56	28,26	39,13	20,73	54,34	70,18	50,60
Poids frais racinaire	126,41	71,69	311,32	186,36	135,71	93,54	56,81	57,14	90,32	468,18	388,09	409,67
Poids sec racinaire	251,58	81,48	462,96	361,90	265	129,41	85,71	65	70,58	785,71	535	552,94
Longueur de la racine	71,79	135,89	128,20	70	42,22	75	95	64,44	97,22	130	68,88	97,22
Nombre de nodules			24,89							15,55	19,07	45

Rh : *Rhizobium phaseoli*.

Ps : *Pseudomonas fluorescens C7R12*.

1.7 Teneur en sucres solubles

Un effet très hautement significatif de l'application du sel sur le taux d'accumulation des sucres solubles a été décelé par l'analyse de variance (Appendice C, Annexe 10). Les résultats obtenus montrent que les plantes stressées ont réagi par une forte augmentation des quantités de sucres au niveau de leurs tissus (Figure 3.24). En effet, nous avons enregistré un pourcentage de progression de 127,65% chez les plants menés à 3g/l, 70,80% à 8g/l, et de 133,64% à 12 g/l (Tableau 3.4).

Suite à l'interaction des deux facteurs (NaCl X PGPR), l'analyse de la variance montre que l'accumulation des sucres solubles chez les plants conduits en milieu salin est fortement dépendante de la nature des souches bactériennes (Appendice D, Annexe 10). En effet, les résultats indiquent que la présence des souches PGPR individuellement ou en combinaison aboutit à la réduction de la teneur en sucre solubles (Figure 3.25), et l'action reste variables en fonction du traitement bactérien appliqué. Nous avons enregistré des valeurs maximales avec la présence de la combinaison Rh+Ps avec une réduction de 57,41% à 3 g/l, 29,82% à 8g/l, et 26,48% à 12 g/l. La présence de *Rhizobium* a réduit la teneur en sucres de 43,32% à 3 g/l, et 4,72% à 12 g/l, alors que *Pseudomonas* la réduit de 32,57% à 3 g/l et 24,43% à 12 g/l. A 8g/l, l'application individuelle des souches à exercé un effet inverse sur l'accumulation des sucres avec une augmentation de 1,32% et 6,45% respectivement avec *Pseudomonas* et *Rhizobium* (Tableau 3.4)

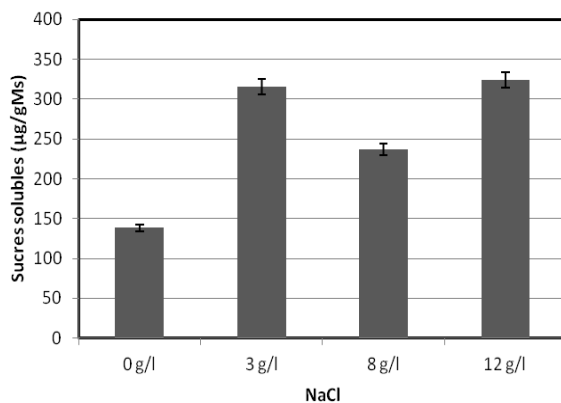


Figure 3.24 : Variation de la teneur en sucres solubles en fonction des doses du NaCl.

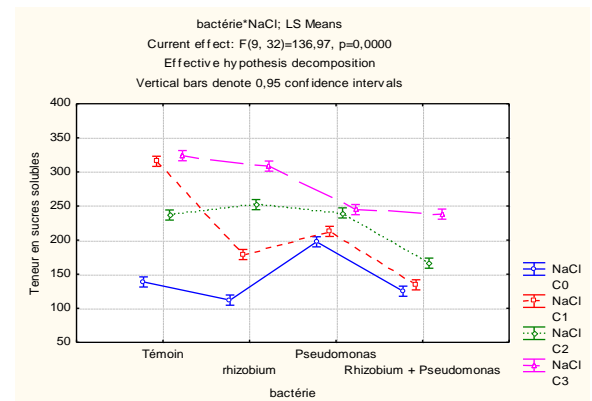


Figure 3.25: Variation de la teneur en sucres solubles en fonction de l'effet conjugué des doses de NaCl et des PGPR.

1.8 Teneur en proline

L'analyse des résultats de la proline permet de mettre en évidence un effet très hautement significatif de l'application des différentes doses de sel sur l'accumulation de la proline foliaire (Appendice C, Annexe 11). Le stress salin appliqué a provoqué une augmentation considérable de l'accumulation de cette protéine (Figure 3.26, Tableau 3.4), cette augmentation est de 23,79% à 3 g/l et de 37,33% à 8g/l, à 12g/l la teneur en proline augmente d'une manière très prononcée avec un taux qui dépasse 600%.

En ce qui concerne l'application combinée des deux facteurs (NaCl X PGPR), l'analyse de la variance de la teneur en proline a révélé une différence très hautement significative pour tous les plants conduits en stress salin en fonction de la souche bactérienne appliquée (Appendice D, Annexe 11).

La bactérisation des plants permet d'atténuer considérablement les effets du stress salin (Figure 3.27). Il est à noter que dans l'ensemble, l'inoculation des plants par *Rhizobium* ou la souche *Pseudomonas* individuellement ou par la coinoculation des deux souches réduit considérablement l'accumulation de la proline sous l'effet du NaCl. Les résultats les plus appréciables sont issus de l'utilisation combinée des deux souches avec une diminution de 22,01% à 3 g/l, 21% à 8g/l et 63,36% à 12 g/l (Tableau 3.4).

L'utilisation de *Pseudomonas* a révélé des résultats modérés avec une diminution de 0,8% à 3 g/l, 17% à 8g/l, et 13,61% à 12 g/l, tandis que les résultats les plus faibles sont apportés par l'utilisation individuelle de *Rhizobium*, avec une diminution de l'ordre de 16% à 3 g/l, 5,87% à 8g/l, et 9,01% à 12 g/l (Tableau 3.4).

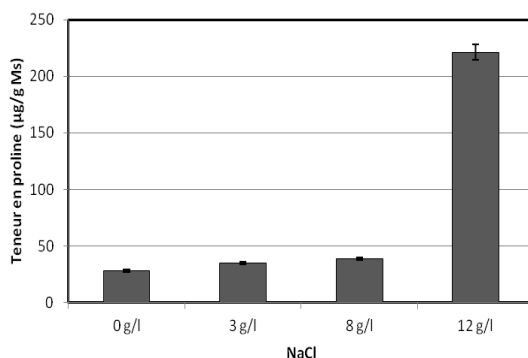


Figure 3.26: Effet des doses de NaCl sur la teneur en Proline.

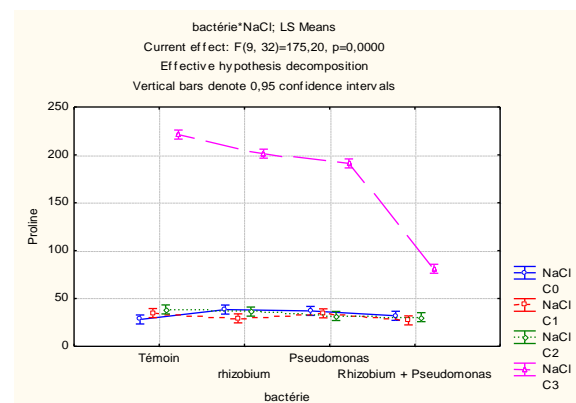


Figure 3.27: Effet conjugué des doses de NaCl et des PGPR sur la teneur en proline.

Tableau 3.4: Effet de l'application conjuguée des différentes doses de NaCl et des souches PGPR sur l'élaboration des paramètres physiologiques.

	Témoin (sans bactéries)				<i>Rhizobium phaseoli</i>				<i>Pseudomonas fluorescens C7R12</i>				<i>Rhizobium phaseoli</i> + <i>Pseudomonas fluorescens C7R12</i>			
	c0	c1	c2	c3	c0	c1	c2	c3	c0	c1	c2	c3	c0	c1	c2	c3
Teneur en proline	28,097															
a		34,783	38,587	221,22	38,420	29,217	36,320	201,28	36,933	34,473	31,737	191,09	31,920	27,127	30,483	81,037
±		±	±	0±	±	±	±	7±	±	±	±	0±	±	±	±	±
**	2,092 ^b	2,542	3,576	4,272	3,912	4,106	2,697	3,730	3,191	4,178	1,790	8,153	3,915	3,763	3,106	5,055
Teneur en sucre soluble	138,63	315,59	236,78	323,90	111,99	178,87	252,06	308,59	197,49	212,79	239,92	244,76	125,062	134,400	166,158	238,124
0		4	9	9	3	0	3	5	6	0	5	7				
±		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
***	4,177	6,682	4,958	10,814	6,651	7,143	4,576	4,284	8,617	8,524	4,960	5,618	5,259	4,177	4,268	6,029

Effet de l'interaction des deux facteurs (souches X NaCl) : - Non significatif, * Significatif, ** Hautement significatif, *** Très hautement significatif

C0 : 0g/l, C1 : 3g/l, C2 : 8g/l, C3 : 12g/l.

a : moyenne issue de trois répétitions, b : ecartype.

CHAPTITRE 4

DISCUSSION

Nos expérimentations ont permis de mettre en évidence des effets de phytostimulation appréciables sur l'ensemble des paramètres mesurés et même d'atténuation des effets néfastes du NaCl depuis le stade de germination.

A l'exception de l'utilisation individuelle des deux souches en milieu dépourvu du sel, l'effet de leur combinaison s'est traduit par une rapidité du nombre des graines germées où la durée de 60h était nécessaire pour induire un effet positif. Ceci peut être expliqué par le fait que les PGPR régulent le taux de l'éthylène dans les racines en favorisant sa production au début de la germination, pour la levée de la dormance de la graine permettant ainsi d'augmenter le taux de la germination [153].

En absence du sel, l'effet de l'application des deux souches sur le taux de germination n'était pas vraiment apparent par rapport aux graines non bactérisées. Dans d'autres travaux [154], il a été rapporté que certaines souches d'*Azospirillum*, de *Pseudomonas* et d'*Azotobacter* pourraient affecter la germination des semences et la croissance des semis du blé et de tournesol jusqu'à 100% supérieure par rapport aux témoins non bactérisés. Ces constatations peuvent être dues, soit à la durée de la bactérisation et/ou à la concentration de l'inoculum qui est insuffisante. En effet Jacoud et *al.* [155] rapportent que l'inoculation des bactéries PGPR sur la plante est dépendante à la fois de la densité de l'inoculum, mais également, de la période de contact pour obtenir un effet sur la croissance. Cette période va de la germination à l'émergence de la racicule.

La présence des différentes concentrations de NaCl dans le milieu de germination a influencé négativement le nombre de graines germées, ainsi que leur cinétique d'évolution. Cet effet est légèrement faible aux concentrations de 3 et de 8 g/l, mais à des concentrations plus élevées il devient plus sensible, ces résultats peuvent être expliqué par le fait que pendant la germination, l'émergence

de la radicule serait contrôlée par l'osmolarité du milieu, La diminution du taux de germination final correspond soit à une augmentation de la pression osmotique externe, ce qui affecte l'absorption de l'eau par les graines et/ou bien à une accumulation des ions Na⁺ et Cl⁻ dans l'embryon [156]. L'effet toxique du sel peut conduire à l'altération des processus métaboliques de la germination et dans le cas extrême à la mort de l'embryon par excès d'ions. Le retard de la germination des graines induit par l'augmentation de la concentration saline est expliqué par le temps nécessaire à la graine de mettre en place des mécanismes, lui permettant d'ajuster sa pression osmotique interne [157].

Malgré l'effet néfaste du NaCl sur la capacité germinative des graines, néanmoins l'apport des différentes applications bactériennes surtout la combinaison des deux souches, a influencé positivement le taux final des graines germées et même la période nécessaire à la germination. De nombreux travaux ont prouvé que l'utilisation des PGPR, telles que *Pseudomonas* PMZ2 [158], *Azotobacter chroococcum* C2 [159] et *Azotobacter* sp. 17 et 20 [160] ont induit une meilleure germination des graines de tomates, de poivre, de laitue, du radis, du maïs et des plants de soja.

Bien que les études mentionnées sur l'effet des souches bactériennes sur la germination des différentes espèces végétales aient été menées dans des conditions optimales, Kaymak *et al.* [161] ont suggéré que *Agrobacterium rubi* A16, *Burkholderia gladii* BA7, *P. putida* BA8, *B. subtilis* BA142, *B. megaterium* M3, appliquées sous stress salin, pourrait induire un pourcentage de germination plus élevé. Cet effet bénéfique s'explique par le fait que les PGPR régulent l'osmolarité du milieu par la libération de molécules osmorégulatrices. Ces molécules osmotiquement actives conservent la pression de turgescence positive nécessaire à la division cellulaire.

L'inoculation des plants par les différents traitements bactériens a révélé un effet de phytostimulation appréciable sur la majorité des paramètres mesurés en absence et en présence du sel, de façon variable en fonction des deux souches bactériennes, de leur utilisation individuelle ou en combinaison et de la concentration du sel. En effet, nous avons constaté qu'en absence du sel, les résultats de tous les paramètres morphologiques étudiés (biomasses fraîche et sèche des parties aériennes et racinaires, longueur de la tige, longueur de la

racine, surface foliaire, nombre de feuilles et nodulation) sont meilleurs avec la coinoculation de la souche *Pseudomonas C7R12* avec *Rhizobium phaseoli*. Cependant, d'après la comparaison de leurs gains, nous avons retenu que les effets phytostimulateurs n'ont pas influencé significativement les paramètres de développement relatifs à la structure et à la forme, telles que la longueur de la tige et le nombre de feuilles, toutefois les gains des autres paramètres sont encourageants, telles que la surface foliaire, les biomasses fraîche et sèche aérienne et racinaire qui ont montré des gains très appréciables. Ceci nous permettra de suggérer que les mécanismes adoptés par les deux souches agissent sur l'amélioration de la physiologie de la plante et l'augmentation des réserves en minéraux.

La plupart des plantes légumineuses sont associées symbiotiquement avec les Rhizobia, ce qui entraîne une fixation active de l'Azote, qui joue un rôle essentiel dans la production de ces cultures. La stimulation de la nodulation et de la fixation symbiotique d'azote par la coinoculation des Rhizobia avec les PGPR, spécialement les *Pseudomonas*, s'avère d'une grande importance dans l'amélioration de la disponibilité de l'azote [162, 163, 164]. Nos résultats obtenus en nombre de nodules montrent que la coinoculation des deux bactéries en absence du sel, stimule significativement le nombre de nodules. Des constats similaires [165], ont rapporté que par rapport à l'inoculation individuelle par *Rhizobium*, la coinoculation de *Rhizobium* avec les *Pseudomonas* stimule significativement la croissance aérienne et racinaire de la plante ainsi que sa nodulation.

L'amélioration du nombre de nodules peut être dû à la capacité de la souche *Pseudomonas* a solubilisé le phosphore et le rendre assimilable par la plante. Il est connu que le phosphore initie la formation de nodules, augmente leur nombre et il est essentiel dans le développement et le fonctionnement de ces nodules [166, 167].

Plusieurs études ont récemment montré que en plus de la stimulation de la nodulation et de la fixation d'Azote, l'inoculation des *Rhizobium* avec quelques souches PGPR augmente la croissance et le rendement des légumineuses [164] Ces PGPR contribuent dans l'amélioration de la croissance de la plante par différentes manières : la synthèse de phytohormones (auxine, cytokinines),

solubilisation d'éléments minéraux et la chélation du fer [168, 169, 170, 165], la production de l'AIA, et peuvent également inhiber les pathogènes telluriques par la production de métabolites antimicrobiens, tels que les antibiotiques et le HCN, ou bien par la compétition par rapport aux nutriments et à l'espace [171].

En s'appuyant sur nos résultats, et en absence des souches bactériennes, il a été possible de démontrer l'effet délétère du NaCl sur la croissance des plantes; le développement des nodules et la production de la proline et des sucres. L'exposition des plantules à des concentrations de 12g/l de NaCl s'est traduite par une régression notable de tous les paramètres morphologiques mesurés. Cet effet est différent selon le caractère mesuré : la longueur de la tige et de la racine ne semblent pas trop influencée par la forte concentration de sel (7% de réduction), alors que les autres paramètres sont grandement touchés : 54,54% de réduction en surface foliaire, 90,09% et 41,50 en biomasse fraîche aérienne et racinaire respectivement, 55,70% et 37,03% en biomasse sèche aérienne et racinaire respectivement et 57,14% en nombre de feuilles.

Sur le plan cellulaire, la diminution de la fabrication de la matière sèche est due à la baisse du nombre de divisions cellulaires [172]. Cette baisse résulte d'une perturbation physiologique des plantes en question et pourrait être considérée comme un critère approprié de la tolérance ou de la sensibilité à la salinité.

Il faut signaler que les effets de la salinité sur les paramètres mesurés ne sont pas toujours négatifs, nous avons observé que dans la plupart des mesures, des concentrations de 3g/l et de 8g/l stimule la croissance morphologique, à l'exemple de la surface foliaire (59,83% à 3g/l et 14,03% à 8g/l), la biomasse fraîche et sèche aérienne, la longueur de la tige (24,58%, 31,14% et 3,37% respectivement à 3g/l), et la longueur racinaire (2,56% à 3g/l et 15,38% à 8g/l). Une réponse analogue a été signalée chez le trèfle cultivé en milieu hydroponique [173] et chez des variétés du haricot sensibles au sel [174].

La comparaison des résultats de la partie aérienne et ceux de la partie racinaire nous laisse constater que cette sensibilité au sel a touché plus la partie aérienne. Ceci est soutenu par les résultats de Munns et Termaat [137] qui ont mentionné que la croissance racinaire est moins touchée par rapport à celle de la

partie aérienne. En effet, le maintien d'une croissance racinaire constitue un caractère adaptatif dans un environnement de faible disponibilité en eau, tel que le milieu salin. L'allongement racinaire peut être dû à une augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans la construction du cytosquelette, telle que la xyloglucan endotransglycosylase [175]. Ces mêmes résultats sont en désaccord avec ceux montrés par Hamrouni et *al.* [176] qui ont indiqué que la plante s'adapte au stress salin en réduisant en premier lieu son système racinaire préservant ainsi la partie aérienne afin de maintenir et d'assurer la production des photosynthétats. Cette diminution observée chez les plantes de piment est expliquée par le fait que le NaCl agit en augmentant la pression osmotique du milieu, empêchant l'absorption en eau par le système racinaire [177, 178] et entraîne par conséquent, une réduction de la croissance.

Les résultats montrent également l'influence néfaste de la salinité sur la production nodulaire qui est réduite dès la plus faible concentration en NaCl. Cette réduction n'est pas si marquante et passe de 174 nodules chez les témoins à 170 nodules chez les plants conduits à 3g/l, mais elle s'accroît avec l'augmentation de la concentration saline et arrive jusqu'à 40 nodules à 12g/l, il s'avère que le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-rhizobia directement en inhibant le processus d'infection et le développement des nodules [179, 180]. En effet, il est suggéré que l'inhibition du nombre de nodules est le résultat de la biosynthèse de l'éthylène (signal secondaire de l'induction des mécanismes de défense chez les plantes), qui augmente dès la moindre perturbation environnementale et de son effet sur le développement de la plante, telle que l'élongation racinaire, qui est déterminante pour l'invasion par les rhizobia [181].

Le paramètre nombre de nodules n'est pas explicite pour estimer l'effet du sel sur la nodulation. Certains auteurs [179, 180] ont fait une classification selon les propriétés symbiotiques basées sur l'observation visuelle de formation de nodules et la couleur du feuillage. Une description détaillée de la forme, la couleur et la taille est meilleure pour montrer l'effet du sel sur les paramètres nodulaires résultants de l'association symbiotique.

Malgré l'effet délétère du sel discuté ci dessus, nous avons constaté qu'avec l'inoculation bactérienne, tous les plants bactérisés et stressés ont montré des résultats significativement supérieurs par rapport aux plants stressées non

bactérisés. Ces effets de l'inoculation bactérienne sur le développement du haricot, ont été également rapportés dans d'autres travaux [182, 183, 184, 185]. Kohler et al. [186] ont constaté que des souches spécifiques de *Pseudomonas* augmentent la croissance et la production de biomasse aérienne de la laitue sous des conditions de stress, il a été reporté que la réduction de la longueur et des biomasses sèche racinaire et aérienne sous stress hydrique et salin a été amélioré par l'inoculation avec *Azospirillum* [187].

En comparant l'effet de chaque traitement bactérien, quelque soit la concentration en NaCl, il s'avère que la combinaison des deux souches assure les meilleurs résultats sur la majorité des paramètres mesurés, à l'exception de la surface foliaire où à 12 g/l le meilleur résultat a été obtenu par la souche *Pseudomonas fluorescens*. Plusieurs études ont montrés l'effet positif de la coinoculation de souches de *Rhizobium* avec *Pseudomonas* sur la croissance des plantes sous différentes perturbations environnementales. Les conclusions tirées des travaux de Zahir et al. [188], montrent l'effet positif de l'utilisation combinée de *Pseudomonas* et *Rhizobium* dans la tolérance du Alfalfa au stress salin, et que la coinoculation augmente l'assimilation du K^+ , P, N et réduit l'accumulation du Na^+ . Dans ce contexte Giri et Mukerji [189] ont rapporté que l'accumulation de Na^+ était fortement influencée par le stockage d'autres cations, particulièrement K^+ , où l'augmentation de sa concentration dans la cellule induite par l'amélioration de son assimilation par les *Pseudomonas*, peut aider à diminuer l'assimilation du Na^+ , et enfin atténuer l'effet de la salinité.

L'utilisation des PGPR dans les systèmes de production agricole a commencé il y a environ 60 ans. Il est maintenant plus qu'évident que l'utilisation de tels micro-organismes peut améliorer la résistance ou l'adaptation des plantes aux stress environnementaux : sécheresse, salinité, carence en éléments nutritifs et contamination en métaux lourds [190]. En s'appuyant sur nos résultats, et dans quelques paramètres mesurés, la situation a dépassé largement la capacité de nos souches à améliorer la résistance des plantes au stress salin, où nous nous sommes retrouvés face à des situation de bioremediation complète, tel le cas de la surface foliaire et la biomasse sèche aérienne, où la coinoculation des deux souches en présence de 12 g/l de NaCl a neutralisé complètement l'effet du sel,

donnant des mesures qui dépassent même les mesures des plants non stressés et non inoculés (haricot dans le milieu naturel).

Le genre *Pseudomonas* est bien connu par sa polyvalence métabolique, qui lui confère l'utilisation exceptionnellement de la vaste gamme de composés organiques. Certaines espèces du genre peuvent métaboliser des polluants et neutraliser l'effet des stress environnementaux, tel que l'excès du Na⁺ dans le milieu, à l'exemple de *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. vesicularis*, et *P. paucimobilis*, ces espèces sont le plus souvent isolés et étudiés pour leurs capacités de bioremediation [190].

La capacité des PGPR à neutraliser l'effet du stress salin est relative à leur aptitude à développer des mécanismes moléculaires intrinsèques pour survivre et croître en vertu de l'augmentation de la salinité et ainsi montré leur effets bénéfiques dans la stimulation de la croissance de la plante [191]. Les bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinivibrio* sont parmi les PGPR les plus dominantes dans les sols salins [192].

L'amélioration qu'éprouvent les PGPR sur la croissance de la plante sous contrainte saline est dépendante de plusieurs mécanismes, parmi lesquels nous citons la production de l'ACC Désaminase qui stimule la croissance des plantes par la régulation de la production massive d'éthylène qui est stimulée par la moindre perturbation environnementale, telle que la salinité du milieu. L'augmentation de sa biosynthèse qui est due essentiellement à la présence de son précurseur immédiat (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)) peut réduire la croissance racinaire et par conséquent la croissance de la plante entière [193]. La majorité des PGPR tel que les *Pseudomonas* fluorescents possède une enzyme ACC deaminase qui hydrolyse l'ACC en ammonia et α ketobutyrate [194, 195]. Ces bactéries réduisent la production d'éthylène dans les plants après exposition à des concentrations croissantes de sel. Plusieurs études [193, 196], montrent qu'en présence de l'ACC Désaminase, la teneur en sodium de la plante n'a pas diminué alors que l'absorption du phosphore et du potassium a été légèrement augmentée, ce qui a contribué en partie à l'activation des processus impliqués dans la réduction de l'effet néfaste du sel. La bactérie a également

augmenté l'efficacité de l'utilisation de l'eau en milieu salin et a atténué la suppression de la photosynthèse [196, 197].

Parmi les autres mécanismes d'adaptation que les PGPR ont développé pour rétablir la pression cellulaire et réduire le potentiel osmotique entre la cellule et son environnement, et par la suite maintenir la division et l'élongation cellulaire sous des conditions de stress salin, est la production de l'AIA qui joue un rôle essentiel pour inciter la tolérance à la salinité [198]. Les auxines sont produites en excès par les plantes soumises au stress comme une stratégie métabolique pour faire face à de telles conditions [199], c'est un mécanisme adaptatif des plantes, mais sa production nécessite une quantité supplémentaire d'énergie avec les autres processus métaboliques de la plante. Cette utilisation supplémentaire d'énergie réduit le métabolisme de la plante, diminuant ainsi sa croissance. Cependant, l'inoculation de la plante avec des PGPR produisant de l'auxine peut améliorer la croissance de la plante en diminuant les besoins d'énergie [200].

La production d'exopolysaccharides bactérien (EPS) est considérée également comme un moyen de diminuer les effets du stress salin. En effet, l'EPS produit par les PGPR se lie aux cations Na^+ et diminue sa teneur, contribuant ainsi à atténuer l'effet du stress salin chez les végétaux [201]. La teneur en Na^+ de la laitue cultivé dans des conditions salines diminue grâce à l'inoculation par des souches productrices d'EPS, l'inoculation non seulement réduit la concentration de Na^+ et de Cl^- , mais également induit une augmentation marquée et progressive de la concentration en N, P, et K sous contrainte de la salinité, d'environ 5, 70 et 50%, respectivement [202].

Notre étude montre qu'en présence du sel et en absence des souches bactériennes, les teneurs en proline et en sucres solubles augmentent significativement avec l'augmentation de la concentration saline. Des résultats similaires ont été évoqués avec l'Atriplex halimus [203], l'orge [204], et l'haricot [205], ces études ont suggéré que la synthèse de ces osmoprotecteurs participe d'une manière importante dans la protection de la membrane cellulaire et à l'ajustement osmotique.

L'augmentation de la teneur en proline est légèrement faible à 3 et à 8g/l de NaCl par rapport au témoin. A 12g/l, la proline est synthétisée d'une manière très considérable et atteint un taux d'augmentation de 687,35%. Il a été signalé que la teneur en proline varie significativement suivant les concentrations du sel dans le milieu de culture [206]. Cette variation serait due à une compartimentation de l'acide aminé, d'où l'expression de sites de résistance de la plante à la contrainte saline [207].

La forte accumulation de la proline dans les feuilles de trèfle pourrait être le résultat d'une diminution de son oxydation et/ou d'une réduction de son utilisation dans la synthèse protéique. De même une hydrolyse des protéines riches en proline et/ou une synthèse activée de cet acide aminé aboutiraient à son accumulation dans les cellules [208].

L'augmentation de la teneur en sucres solubles est également variable en fonction de la concentration saline. En effet, dès la plus faible dose (3 g/l de NaCl) le taux d'augmentation est de 127,65% et arrive à 133,64% à 12g/l. Les hydrates de carbones comme les sucres (le glucose, le fructose, le saccharose et le fructane) et l'amidon s'accumulent sous le stress salin [209]. Mais ce constat n'est pas le même chez toutes les espèces végétales ; à l'exemple de la fève, où la salinité entraîne la diminution des sucres solubles [210] .

Avec l'augmentation de la salinité dans le milieu, les halophytes réalisent l'ajustement osmotique en concentrant les sels dans leurs tissus, où ils sont utilisés comme osmotocums, mais les quantités nécessaires d'accumuler deviennent rapidement toxiques, dès lors, une des stratégies d'adaptation consiste à synthétiser des osmo-protecteurs et à les accumuler dans le cytoplasme afin de contre balancer l'effet d'accumulation des ions dans la vacuole [210]. Ces solutés compatibles comprennent principalement la proline [211, 210], la glycine bêtaïne [212, 210], les sucres et les polyols [210].

Les résultats de l'effet de la salinité sur les plantes du haricot ont montré clairement la réduction de tous les paramètres morphologiques mesurés, cela pourrait être le résultat de l'effet délétère de la salinité sur les processus métaboliques et physiologiques de la plante, comme il peut être du à l'utilisation d'une quantité importante d'énergie afin que la plante puisse établir l'ajustement

osmotique, ce qui réduit automatiquement la croissance traduite par la chute de tous les paramètres morphologiques mesurés.

Il est maintenant évident que sous stress salin la plante accumule des quantités importantes de proline et de sucres solubles, considérées comme étant l'un des mécanismes de son adaptation développée pour tolérer les perturbations du milieu. D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que l'inoculation individuelle ou combinée des plantes par les deux souches *Rhizobium phaseoli* et *Pseudomonas fluorescens C7R12* réduit significativement cette accumulation avec la supériorité des résultats obtenus avec la coinoculation, où nous avons enregistré à 12g/l un taux de diminution de 63,36% de la teneur de proline et de 26,48% de la teneur en sucre par rapport aux plants stressés non bactérisés.

CONCLUSION

Au terme de ce travail, nos résultats montrent que la bactérisation des plants du haricot, en application individuelle ou combinée (coinoculation) avec deux souches PGPR (*Rhizobium phaseoli* et *Pseudomonas fluorescens C7R12*), a induit des effets positifs sur la phytostimulation en présence et en absence du NaCl. Cette phytostimulation s'est traduite par une amélioration du taux de germination final et de sa cinétique, ainsi que par des gains en croissance très appréciables sur les organes aériens et racinaires et sur la stimulation de la nodulation. L'effet phytostimulateur en absence du sel, est variable selon la souche et le paramètre mesuré, dont les meilleurs gains sont nettement apparents en biomasse sèche aérienne avec *Pseudomonas* et en biomasse sèche racinaire avec *Rhizobium*.

La comparaison des applications, individuelle et combinée des rhizobactéries, révèle que la coinoculation améliore considérablement l'effet phytostimulateur, se traduisant parfois avec des gains doublés ; à l'exemple de la surface foliaire où nous avons obtenu 236,74% de gain en coinoculation, contre 120,35% avec *Pseudomonas* et 112,36% avec *Rhizobium*.

L'effet du stress salin était marquant, chez les plants non bactérisés par les deux souches PGPR, s'est traduit par des activités dépressives sur tous les paramètres morphologiques mesurés. Le degré de sensibilité ou de tolérance dépend de l'intensité du stress. Cette baisse résulte d'une perturbation physiologique des plantes en question et pourrait être considérée comme un critère approprié à la tolérance ou à la sensibilité pour ce stress. L'action du sel a influencé également, chez les plants du haricot, les teneurs en proline et en sucres solubles totaux qui augmentent considérablement avec la concentration en NaCl. En outre, ce dernier a également réduit la croissance des plantes chez toutes les interactions expérimentées (haricot-*Rhizobium*, haricot-*Pseudomonas*, haricot-*Rhizobium-Pseudomonas*). Néanmoins, et par rapport aux plantes

stressés non bactériées, nous avons constaté un effet très positif de l'application des souches PGPR sur la tolérance des plantes au stress salin. Cet effet est variable selon l'application bactérienne, avec une supériorité relative lors des coinoculations de *Rhizobium phaseoli* avec *Pseudomonas fluorescens* C7R12.

Enfin, nous pouvons conclure que *Pseudomonas fluorescens* C7R12 montre un potentiel important dans la phytostimulation de la croissance et de la nodulation des plantes du haricot, en présence et en absence du NaCl, lorsqu'elle est coinoculée avec *Rhizobium phaseoli*, et assure même dans le cas de la forte concentration en NaCl (12 g/l) un effet de biorémediation et de neutralisation de l'effet du sel.

Il est évident qu'afin d'améliorer la croissance des plantes dans des conditions de salinité, il est nécessaire d'améliorer leur tolérance au stress. En raison de la complexité et la lourdeur des techniques de création de variétés tolérantes à la salinité, l'utilisation des PGPR, notamment *Pseudomonas* et *Rhizobium*, constitue une alternative intéressante dans l'amélioration de la croissance des plantes dans de telles conditions.

Avec la complexité relationnelle entre les communautés microbiennes telluriques, notamment entre les symbiotiques et les non symbiotiques, il est recommandé d'approfondir les connaissances sur les systèmes de communication de ces rhizobactéries. L'étude de ces rhizobactéries doit être reconduite et expérimentée dans des conditions expérimentales plus élaborées en déterminant l'impact des facteurs biotiques et abiotiques sur l'interaction plante-PGPR. Il est également souhaitable d'étudier, d'identifier et de quantifier les métabolites secondaires sécrétés par ces bactéries, comme les acides organiques, les produits volatiles, les sidérophores, les enzymes, l'ACC désaminase, les cytokinines et les gibbérellines par l'emploi des analyses biochimiques et moléculaires plus poussées, afin de déterminer leur degré d'implication dans les processus physiologiques étudiés.

APPENDICE A

LES MILIEUX DE CULTURES ET SOLUTIONS NUTRITIVES

Annexe 1 : Milieu B de King

- Peptone 20g.
- Glycérol 15ml.
- K_2HPO_4 1,5g.
- $MgSO_4$ 1,5g.
- Agar 15g.
- Eau distillée 1000ml.
- PH=7,2, autoclavage 20minutes à 120°C.

Annexe 2 : Milieu PDAE (Potato Dextrose Agar+ Extrait de levure)

- Pomme de terre 200g.
- Dextrose 20g.
- Extrait de levure : 0,25 g
- Agar 15g.
- Eau distillée 1000ml.
- PH=7, autoclavage 20 minutes à 120°C.

Annexe 3 : Solution de HOAGLAND

Produit	Formule chimique	Concentration en mg/l
Nitrate de potassium	KNO_3	191,90
Nitrate de calcium	$(NO_3)_2 Ca 4H_2O$	129,80
Nitrate d'Ammonium	$NO_3 NH_4$	210
Sulfate de magnésium	$SO_4Mg 7H_2O$	61,5
Phosphate monopotassique	PO_4H_2K	54,40
Hydrogenophosphate dipotassium	$PO_4K_2H 3H_2O$	34,23
Chlorure de manganèse	$Cl_2Mn 4H_2O$	1,80
Sulfate de cuivre	$CuSO_4 5H_2O$	0,176
Sulfate de zinc	$Zn SO_4 7H_2O$	0,219
Acide borique	H_3BO_3	2,861
Molybdate d'Ammonium	$MO_7O_{24} (NH_4) 7H_2O$	0,285
Complexe ferrique EDTA ferrique	$C_{10}H_{12}FeN_2NaO_8$	0,050

APPENDICE B
RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES DE LA PROMOTION DE LA
CROISSANCE *IN PLANTA* EN ABSENCE DU NaCl.

Annexe 1 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR sur la le nombre des feuilles

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	6674083	1	6674083	834,2604	0,000
Souches	250,917	3	83,639	10,4549	0,003
Erreur	64,000	8	8,000		

Annexe 2 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR sur la surface foliaire

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	1244681	1	1244681	1704,262	0,000
Souches	184805	3	61602	84,347	0,000
Erreur	5843	8	730		

Annexe 3 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR sur la le poids frais aérien

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	5440,873	1	5440,873	507,8504	0,000
Souches	518,702	3	172,901	16,1385	0,000
Erreur	85,708	8	10,714		

Annexe 4 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR sur le poids sec aérien

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	23,15741	1	23,15741	2589,831	0,000
Souches	1,86616	3	0,62205	69,568	0,000
Erreur	0,07153	8	0,00894		

Annexe 5 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR sur la longueur de la tige

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	17404,08	1	17404,08	1864,723	0,000
Souches	436,25	3	145,42	15,580	0,001055
Erreur	74,67	8	9,33		

Annexe 6 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR sur le poids frais de la partie racinaire

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	1,936033	1	1,936033	325,3838	0,000000
Souches	0,497767	3	0,165922	27,8861	0,000138
Erreur	0,047600	8	0,005950		

Annexe 7 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR sur le poids sec de la partie racinaire

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	0,869408	1	0,869408	414,0040	0,000000
Souches	0,305892	3	0,101964	48,5542	0,000018
Erreur	0,016800	8	0,002100		

Annexe 8 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR sur la longueur de la racine

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	6864,083	1	6864,083	442,8441	0,000000
Souches	600,917	3	200,306	12,9229	0,001957
Erreur	124,000	8	15,500		

Annexe 9 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR sur le nombre des nodules

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	98826,75	1	98826,75	5647,243	0,000000
Souches	99164,25	3	33054,75	1888,843	0,000000
Erreur	140,00	8	17,50		

APPENDICE C

RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES DE L'EFFET DU NaCl SUR LES PLANTS D'HARICOT.

Annexe 1: Modèle ANOVA appliqué aux effets du NaCl sur le nombre des feuilles

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	2436,750	1	2436,750	211,8913	0,000000
NaCl	212,250	3	70,750	6,1522	0,017905
Erreur	92,000	8	11,500		

Annexe 2: Modèle ANOVA appliqué aux effets du NaCl sur la surface foliaire

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	289514,4	1	289514,4	542,8185	0,000000
NaCl	43855,4	3	14618,5	27,4086	0,000147
Erreur	4266,8	8	533,4		

Annexe 3 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du NaCl sur le poids frais de la partie aérienne

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	824,6892	1	824,6892	94,56388	0,000010
Souches	265,4908	3	88,4969	10,14760	0,004213
Erreur	69,7678	8	8,7210		

Annexe 4: Modèle ANOVA appliqué aux effets du NaCl sur le poids sec de la partie aérienne

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. Origine	6,097576	1	6,097576	181,3154	0,000001
NaCl	0,678982	3	0,226327	6,7300	0,014027
Erreur	0,269037	8	0,033630		

Annexe 5 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du NaCl sur la longueur de la tige

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	9832,688	1	9832,688	1105,314	0,000000
NaCl	30,396	3	10,132	1,139	0,390225
Erreur	71,167	8	8,896		

Annexe 6 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du NaCl sur le poids frais de la partie racinaire

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	0,240833	1	0,240833	214,0741	0,000000
NaCl	0,008167	3	0,002722	2,4198	0,141301
Erreur	0,009000	8	0,001125		

Annexe 7 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du NaCl sur le poids sec de la partie racinaire

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	0,060208	1	0,060208	116,5323	0,000005
NaCl	0,001758	3	0,000586	1,1344	0,391779
Erreur	0,004133	8	0,000517		

Annexe 8 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du NaCl sur la surface foliaire

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	2133,333	1	2133,333	234,8624	0,000000
NaCl	14,000	3	4,667	0,5138	0,684120
Erreur	72,667	8	9,083		

Annexe 9 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du NaCl sur le nombre des nodules

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	39330,75	1	39330,75	5130,098	0,000000
NaCl	6200,92	3	2066,97	269,605	0,000000
Erreur	61,33	8	7,67		

Annexe 10 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du NaCl sur la teneur en sucres solubles

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	772549,8	1	772549,8	15175,55	0,000000
NaCl	66861,6	3	22287,2	437,80	0,000000
Erreur	407,3	8	50,9		

Annexe 11 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du NaCl sur la teneur en proline

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	78095,01	1	78095,01	7460,998	0,000000
NaCl	79184,55	3	26394,85	2521,697	0,000000
Erreur	83,74	8	10,47		

APPENDICE D

RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES DE LA PROMOTION DE LA CROISSANCE *IN PLANTA* EN PRESENCE DU NaCl.

Annexe 1 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR en interaction aux doses de NaCl sur le nombre des feuilles

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	16096,69	1	16096,69	1839,621	0,000000
Bactéries X NaCl	321,52	9	35,72	4,083	0,001449
Erreur	280,00	32	8,75		

Annexe 2 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR en interaction au NaCl sur la surface foliaire

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	2885307	1	2885307	5260,499	0,000000
Bactéries X NaCl	87545	9	9727	17,735	0,000000
Erreur	17552	32	548		

Annexe 3 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR en interaction au NaCl sur le poids frais de la partie aérienne

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	8413,490	1	8413,490	1122,590	0,000000
Bactéries X NaCl	215,755	9	23,973	3,199	0,007157
Erreur	239,831	32	7,495		

Annexe 4 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR en interaction aux doses de NaCl sur le poids sec de la partie aérienne

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	55,43775	1	55,43775	3658,307	0,000000
Bactéries X NaCl	0,55948	9	0,06216	4,102	0,001401
Erreur	0,48493	32	0,01515		

Annexe 5 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR en interaction aux doses de NaCl sur la longueur de la tige

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	65158,17	1	65158,17	7670,367	0,000000
Bactéries X NaCl	32,01	9	3,56	0,419	0,915464
Erreur	271,83	32	8,49		

Annexe 6 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR en interaction aux doses de NaCl sur le poids frais de la partie racinaire

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	4,159519	1	4,159519	787,9120	0,000000
Bactéries X NaCl	2,100335	9	0,233371	44,2060	0,000000
Erreur	0,168933	32	0,005279		

Annexe 7 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR en interaction aux doses de NaCl sur le poids sec de la partie racinaire

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	0,392408	1	0,392408	256,6158	0,000000
Bactéries X NaCl	0,006008	9	0,000668	0,4366	0,904916
Erreur	0,048933	32	0,001529		

Annexe 8 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR en interaction aux doses de NaCl sur la longueur de la racine

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	23629,69	1	23629,69	2268,450	0,000000
Bactéries X NaCl	103,02	9	11,45	1,099	0,391154
Erreur	333,33	32	10,42		

Annexe 9 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR en interaction aux doses de NaCl sur le nombre des nodules

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	97028,17	1	97028,17	4771,877	0,000000
Bactéries X NaCl	86,00	3	28,67	1,410	0,276428
Erreur	325,33	16	20,33		

Annexe 10 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR en interaction aux doses de NaCl sur la teneur en sucres solubles

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	2199702	1	2199702	54913,84	0,000000
Bactéries X NaCl	49378	9	5486	136,97	0,000000
Erreur	1282	32	40		

Annexe 11 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de deux souches PGPR en interaction aux doses de NaCl sur la teneur en proline

Effets	Sommes des carrés	D.D.L	Carrés moyens	F- ratio	P
ord. origine	223910,6	1	223910,6	13928,10	0,000000
Bactéries X NaCl	25348,9	9	2816,5	175,20	0,000000
Erreur	514,4	32	16,1		

APPENDICE E

LES TABLEAUX DES RESULTATS

Annexe 1 : Variation du taux de germination en fonction de l'inoculation bactérienne et des doses de NaCl pendant un séjour de 5 jours.

Bactérisation	NaCl (g/l)	Séjour de germination (h)									
		12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
sans bactérisation	C0	0	0	20	40	70	80	100	100	100	100
	C1	0	0	20	50	60	80	90	90	90	90
	C2	0	0	10	30	30	40	60	80	80	90
	C3	0	0	0	0	0	20	30	40	50	50
<i>Rhizobium</i> sp	C0	0	0	30	40	70	90	100	100	100	100
	C1	0	0	30	40	50	70	80	100	100	100
	C2	0	0	20	40	40	50	70	100	100	100
	C3	0	0	0	0	20	30	40	60	70	80
<i>Pseudomonas</i> C7R12	C0	0	0	40	60	60	80	100	100	100	100
	C1	0	0	30	40	70	80	100	100	100	100
	C2	0	0	30	30	50	60	80	80	100	100
	C3	0	0	0	0	30	30	40	70	80	80
<i>Rhizobium</i> sp + <i>Pseudomonas</i> C7R12	C0	0	0	70	80	100	100	100	100	100	100
	C1	0	0	70	80	90	100	100	100	100	100
	C2	0	0	50	50	70	90	90	100	100	100
	C3	0	0	0	30	40	60	70	90	90	90

APPENDICE F SYMBOLES

°C : degré celsius.

µg : microgramme

ACC : 1- aminocyclopropane-1-carboxylate

ADP : Adénosine di phosphate

AIA : Acide indole acétique

ATP : Adénosine triphosphate

Cm : centimètre

DAPG : 2,4-Diacetyl PhloroGlucinol

Do : densité optique.

EPS : Exopolysaccharide.

FSN : fixation symbiotique de l'azote

g : gramme

HR : hypersensibilité

ISR : Resistance systémique induite.

l : litre

LPS : Lipopolysaccharide

MF : matière fraîche

ml : millimètre

PGPR : bactéries rhizosphériques promotrices de la croissance des plantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. **Kouassi, M., 2001.** La lutte biologique: une alternative viable à l'utilisation des pesticides? *VertigO*. 2(2).
2. **Fravel, D. R., 2005.** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:337-359.
3. **Thakore, Y., 2006.** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2(3):294-208.
4. **Harish S., Kavino M., Kumar N., Saravanakumar D., Soorianathasundaram K. et Samiyappan R., 2008.** Biohardening with plant growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistance against Banana bunchy top virus. *Appl. Soil Ecol.*, vol. 39, p.p : 187-200.
5. **Burd GI, Dixon DG, Glick BR., 2000.** Plant growth-promoting bacteria that decrease heavymetal toxicity in plants. *Can J Microbiol* 2000;46:237–45.
6. **Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA., 2005.** Use of plant growth-promotingbacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, andfuture prospects. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:4951–9.
7. **Martins SJ, Vasconcelos de Medeiros FH, Magela de Souza R, Vilela de Resende ML, Martins Ribeiro Junior P., 2013.** Biological control of bacterial wilt of common bean byplant growth-promoting Rhizobacteria. *Biol Control*;66:65–71.
8. **Raaijmakers, J.M., Vlami, M. and de Souza, J.T., 2009.** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81(1-4):537-547.
9. **Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., van der Sluis, I., Schippers, B. and Bakker, P.A.H.M., 2002.** Dose-response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. 85(10):1075-1081.
10. **Bakker PAHM, Pieterse CMJ, van Loon LC., 2007.** Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97: 239-243

11. **Dita MA, Rispaill N, Prats E, Rubiales D, Singh KB., 2006.** Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147:1-24.
12. **B.Nejimi C. Daoud, M. Carvajal, M.C. Martínez-Ballesta., 2010.** Improvement of the adaptation of *Lygeum spartum* L. to salinity under the presence of calcium. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 41(19), 2301–2317.
13. **I. Türkan, T. Demiral., 2009.** Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 67, 2–9.
14. **CIAT., 1992.** Constraints to and opportunities for improving bean production. A planning document 1993–98. An achievement document 1987-92, CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Cali, Colombia.
15. **Jansa J, A Bationo, E Frossard, IM Rao., 2011.** Options for Improving Plant Nutrition to Increase Common Bean Productivity in Africa. *Fighting poverty in sub-saharan africa: the multiple roles of legumes in integrated soil fertility management* 2011:201-240.
16. **Ahmad M, Zahir ZA, Asghar HN, AsgharM., 2011.** Inducing salt tolerance in mung bean through co-inoculation with *Rhizobium* and PGPR containing ACC-deaminase. *Can J Microbiol* 57:578-589.
17. **Anjum MA, Zahir ZA, Arshad M, Ashraf M., 2011.** Isolation and screening of rhizobia for auxin biosynthesis and growth promotion of mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings under axenic conditions. *Soil Environ* 30:18-26.
18. **Shaharoon B, Arshad M, Zahir ZA., 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.
19. **Gull M, Hafeez FY, Saleem M., 2004.** Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. *Aust J Exp Agric* 44:623-628.
20. **Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcón, R. et Azcón-Aguilar, C., 2005.** Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1761-1778.
21. **Van Loon, L.C., 2007.** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119:243-254.
22. **Kloepper JW, Schroth MN., 1978.** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceedings of the IVth International Conference on Plant*

- Pathogenic Bacteria Vol. 2. Station de Pathologie Vegetale et Phyto-Bacteriologie; 1978. p. 879–82.
23. **Murray JD., 2011.** Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Mol Plant Microbe Interact* 2011;24:631–9.
 24. **Okon Y, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ., 1998.** Biotechnology of biofertilization and phyto-stimulation. In: Altman A, editor. *Agricultural Biotechnology*. New York:Marcel Dekker; 1998. p. 327–49
 25. **Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C., 2009.** Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 2009;321:305–39.
 26. **Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G., 2008.** Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from compost and microfauna. *Micro-biol Res* 2008;163:234–42.
 27. **Mehnaz S, Lazarovits G., 2006.** Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb Ecol* 2006;51:326–35.
 28. **Mantelin S, Touraine B., 2004.** Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J Exp Bot* 2004;55:27–34.
 29. **Kuiper I, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ., 2001.** Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 2001;14:1197–205.
 30. **Denton B., 2007.** Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. *MMG 445 Basic Biotechnol* 2007;3:1–5.
 31. **Desbrosses G, Contesto C, Varoquaux F, Galland M, Touraine B., 2009.** PGPR–*Arabidopsis* interactions is a useful system to study signalling pathways involved in plant developmental control. *Plant Signal Behav* 2009;4:321–3.
 32. **Argueso CT, Hansen M, Kieber J., 2007.** Regulation of ethylene biosynthesis. *J Plant Growth Regul* 2007;26:92–105.
 33. **Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J., 2007.** Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 2007;119:329–39.
 34. **Boiero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassan F, Luna V., 2007.** Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and

possible physiological and technological implications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;74:874–80.

35. **Steenhoudt, O., Vanderleyden, J., 2000.** Azospirillum, a free-living nitrogenfixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24:487-506.
36. **Vessey, J.K., 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255:571- 586.
37. **Glick BR., 2012.** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*; 2012:1–15, <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>.
38. **Frey-Klett, P., Garbaye, J. et Tarkka, M., 2007.** The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176: 22-36.
39. **Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougel, C., Lemanceau, P. et Berta, G., 2009.** Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19: 81-90.
40. **Berg G., 2009.** Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;84:11–8.
41. **Bonmatin, J.M., Laprevote, O. and Peypoux, F., 2003.** Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity–structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6(6):541-556.
42. **Lin, T.P., Chen, C.L., Fu, H.C., Wu, C.Y., Lin, G.H., Huang, S.H., Chang, L.K. and Liu, S.T., 2005.** Functional analysis of fengycin synthetase FenD. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gene Structure and Expression.* 1730(2):159-164.
43. **Rahman, M.S., Ano, T. and Shoda, M., 2007.** Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol.* 127(3):503-507.
44. **Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P., Phongpaichit, S., 2006.** Purification, characterization and synergistic activity of [β]-1, 3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb. Technol.* 38(7):990-997.
45. **Haas, D. and Defago, G., 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(4):307-319.

46. **McGowan, S.J., Barnard, A.M.L., Bosgelmez, G., Sebahia, M., Simpson, N.J.L., Thomson, N.R., Todd, D.E., Welch, M., Whitehead, N.A. and Salmond, G.P.C., 2005.** Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol. Microbiol.* 55(2):526-545.
47. **Whipps, J.M., 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511.
48. **Ramos Solano B, Barriuso Maicas J, Pereyra de la Iglesia MT, Domenech J, GutiérrezMañero FJ., 2008.** Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhi-zobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic diseaseprotection, and biotic elicitors. *Phytopathology* 2008;98:451–7.
49. **Pereira P, Ibáñez SG, Agostini E, Miriam Etcheverry M., 2011.** Effects of maize inoculation with *Fusarium verticillioides* and with two bacterial biocontrol agentson seedlings growth and antioxidative enzymatic activities. *Appl Soil Ecol*2011;51:52–9.
50. **Krey T, Vassilev N, Baum C, Eichler-Löbermann B., 2013.** Effects of long-term phosphorusapplication and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorusnutrition under field conditions. *Eur J Soil Biol* 55:124–30.
51. **Rana A, Joshi M, Prasanna R, Shivay YS, Nain L., 2012.** Biofortification of wheat throughinoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *Eur J Soil Biol* 2012;50:118–26.
52. **Schalk IJ, Hannauer M, Braud A., 2012.** New roles for bacterial siderophores in metal trans- port and tolerance. *Environ Microbiol* 2011;13:2844–54.
53. **Suryanarayanan, T.S., Thirumalai, E., Prakash, C.P., Rajulu, M.B.G., Thirunavukkarasu N., 2009.** Fungi from two forests of southern India: a comparative study of endophytes, phellophytes, and leaf litter fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 55:419, 426.
54. **Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodriguez, M.I., Chulze, S., Etcheverry, M., 2005.** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Res. Microbiol.* 156(5-6):748-754.
55. **Elhassan, G.A., Abdelgani, M.E., Osman, A.G., Mohamed, S.S. et Abdelgadir, B.S., 2010.** Potential production and application of biofertilizers in Sudan Pakistan. *Journal of Nutrition*, 9: 926-934.

- 56. Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M.N., van Tuinen, D., Redecker, D. et Wipf, D., 2010.** Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*.
- 57. Bhattacharjee, R.B., Singh, A., Mukhopadhyay, S.N., 2008.** Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 199-209. *Biol. Biochem.* 35:973-978.
- 58. Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X., Gardan, L., 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* 20, 51-53.
- 59. Palleroni, N.J., 2009.** The genus *Pseudomonas*. Dans "Practical handbook of microbiology", 2ème édition, Goldman, E. et Green, L.H. (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group, Etats-Unis, p. 231- 242.
- 60. Migula, W., 1894.** Über ein neues System der Bakterien. *Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe*, 1:235-238.
- 61. Palleroni, N.J., 2005.** Genus I *Pseudomonas*. Dans "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The proteobacteria", 2ème édition, vol. 2, part. B, Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. et Garrity, G.M. (Eds). Springer, New-York, Etats-Unis, p. 323-379.
- 62. Höfte, M. et de Vos, P., 2006.** Plant pathogenic *Pseudomonas* species. Dans "Plant-associated bacteria", part. 3, Gnanamanickam, S.S. (Eds). Springer, Pays-Bas, p 507-533.
- 63. Dubuis, C., Keel, C., Haas, D., 2007.** Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. Dans "New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research", Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M. et Cooke, B.M. (Eds). Springer, Pays-Bas, p 311-328.
- 64. Rana A, Joshi M, Prasanna R, Shivay YS, Nain L., 2012.** Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *Eur J Soil Biol* 2012;50:118–26.
- 65. McKellar, R.C., 2007.** Role of nutrient limitation in the competition between *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Protect* 70, 1739–1743.

- 66. Kloepper J, Leong J, Teintze M, Schroth M., 1980.** Pseudomonas siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiol.* 4 : 317-320.
- 67. Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P.A.H.M. et Briat, J.F., 2009.** Role of iron in plant–microbe interactions. *Advances in Botanical Research*, 51:491-549.
- 68. Loper J.E. & Henkels M.D., 1997.** Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 99–105.
- 69. Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielson, T.F., 1999.** Inhibition of vibrio anguillarum by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 969–973.
- 70. Simoes, M., Simoes, L.C., Pereira, M.O., Vieira, M.J., 2008.** Antagonism between *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* in planktonic systems and in biofilms. *Biofouling* 24(5), 339–349.
- 71. Raaijmakers, J. M., D. M. Weller., and L. S. Thomashow., 1997.** Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl Environ Microbiol* Vol. 63, No. 3, 881-887.
- 72. Voisard C, Keel C, Haas D, Defago G., 1988.** Biological control of damping off of sugar-beet and cotton with *Chaetomium globosum* and a fluorescent *Pseudomonas*. *Can J Microbiol* 34, 631-637.
- 73. Digat, B., 1992.** Control biologique et stimulation de la germination par la bactérisation. *Phytoma. Défense des végétaux.* 441 : 34-38.
- 74. Gerretsen, F.C., 1984.** The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plante. *Plant Soil* 1, 51-81.
- 75. Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G., 2008.** Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from compost and microfauna. *Micro-biol Res* 2008;163:234–42..
- 76. Swarnalakshmi K, Prasanna R, Kumar A, Pattnaik S, Chakravarty K, Shivay YS, et al., 2013.** Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofilm fertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat. *Eur J Soil Biol* 55:107–16.

- 77. Libbert E, Kaiser W, Kunert R., 1969.** Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. VI. *Physiol Plant* 22,432-439.
- 78. Brown ME., 1974.** Seed and root bacterization. *Annu Rev Phytopathol* 12, 181-197.
- 79. Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC., 2008.** Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu. Rev. Genet.* 42: 413-441.
- 80. Harrison MJ., 2005.** Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 19-42.
- 81. Sprent JI., 2008.** 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *J. Exp. Bot.* 59: 1081-1084.
- 82. Biondi EG, Reisinger SJ, Skerker JM, Arif M, Perchuk BS, Ryan KR, Laub MT., 2006.** Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature* 444: 899-904.
- 83. Franche C, Lindström K, Elmerich C., 2009.** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321: 35-59.
- 84. Zhang J, Subramanian S, Stacey G, Yu O., 2009.** Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant J.* 57: 171-183.
- 85. Vinuesa P, León-Barrios M, Silva C, Willems A, Jarabo-Lorenzo A, Pérez-Galdona R, Werner D, Martínez-Romero E., 2005.** *Bradyrhizobium canariense* sp. nov, an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:569-575.
- 86. Drevon JJ, Deransart C, Fleurat-Lessard P, Jaillard B, Ndjiondjop MN, Payre H, Ribet J, Roy G, Serraj R., 1995.** Is the symbiotic fixation osmoregulated by reversible contraction of cells in the legume-nodule innercortex? In: Tikhonovitch, I.A, Provorov, N.A, Romanov, V.I, Newton, W.E. (Eds.), *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. Kluwer Academic, Dordrecht, p.598.
- 87. Parsons R, Day DA., 1990.** Mechanism of soybean nodule adaptation to different oxygen pressures. *Plant, Cell et Environment*, 13: 501-512.

- 88. Ndakidemi PA, Dakora FD, Nkonya EM, Ringo D, Mansoor H., 2006.** Yield and economic benefits of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* L. Merr.) inoculation in northern Tanzania. *Aust J Exp Agric* 46(4):571-577.
- 89. Sutton WD., 1983.** Nodule developpe, et and senescence. In: Broughton ZJ, ed. Nitrogen fixation, Volume 1 (Legumes). Oxford: Clarendon Press. 144-212
- 90. Hirsch AM., 1992.** Tansley Review no 40: Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* 122:211-237.
- 91. Dixon ROD, Wheeler CT., 1986.** Nitrogen fixation in plants. Blackie. Glasgow. 152p.
- 92. Yamamoto H, J Nomata, Y Fuita., 2008.** Functional expression of nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus* in *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7:1238-1242.
- 93. Valverde A, Igual JM, Peix A, Cervantes E, Velázquez E., 2006.** *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2631-2637.
- 94. Maréchal R, Mascherpa JM, Stainier F., 1978.** Etude taxonomique d'un groupe complex d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* sur la base de données morphologiques et polliniques traitées par l'analyse informatique. *Boisiera* 28: 273.
- 95. Freytag GF, Debouck DG., 2002.** Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. *Sida Bot Misc* 23. Botanical Research Institute of Texas.
- 96. Renard S., Goffork J.P., Frankinet., 2007.** Optimisation de l'efficience de l'azote dans les rotations intégrant les cultures de légumes industriels en Hesbaye. Les dossiers de la recherche agricoles.
- 97. Gepts P, Francisco JL, Aragão Everaldo de Barros, Matthew W. Blair, Rosana Brondani., 2008.** Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics, In: P.H. Moore, R. Ming (eds.), *Genomics of Tropical Crop Plant*. Springe, pp. 113-143.
- 98. Sharma KK, Lavanya M., 2002.** Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. *JIRCAS Working Report* 23:61-73.

- 99. Teran H, Singh SP., 2002.** Comparison of sources and lines selected for drought resistance in common bean. *Crop Sci* 42: 64-70.
- 100. Martinez JP, Silva H, Ledent JF, Pinto M., 2007.** Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy* 26: 30-38.
- 101. Rainey KM, Griffiths PD., 2005.** Inheritance of heat tolerance during reproductive development in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130:700-706.
- 102. Jansa J, A Bationo, E Frossard, IM Rao., 2011.** Options for Improving Plant Nutrition to Increase Common Bean Productivity in Africa. Fighting poverty in sub-saharan africa: the multiple roles of legumes in integrated soil fertility management 2011:201-240.
- 103. Geetanjali M, Neera G, 2008.** Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol Plant.* 30:595–618.
- 104. Witcombe, J.R., Hollington, P.A., Howarth, C.J., Reader, S., and Steele, K.A., 2009.** Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363(1492) : 703–716. doi:10.1098/rstb.2007.2179. PMID:17761467.
- 105. Rengasamy P., 2006.** World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot* 57:1017-1023.
- 106. Tester, M., and Langridge, P., 2010.** Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 327(5967) : 818–822. doi:10.1126/science.1183700. PMID:20150489.
- 107. Takahashi, R., Liu, S., and Takano, T., 2009.** Isolation and characterization of plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter genes from salt-sensitive and salt-tolerant reed plants. *J. Plant Physiol.* 166(3) : 301–309. doi:10.1016/j.jplph.2008.04.002. PMID:18565619.
- 108. Parida A.K., Das A.B., 2005.** Salt tolerance and salinity effect on plants: review. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* Vol.60, pp. 324-349.
- 109. Yamaguchi, T., and Blumwald, E., 2006.** Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci.* 10(12) :615–620. doi:10.1016/j.tplants.2005.10.002. PMID:16280254.

110. **Beijerinck MW., 1888.** Die Bacterien der papilionaceen-Knöllchen. Bot. Ztg. 46:725-735.
111. **Schneider A., 1892.** Observations on some American rhizobia. Bull. Torrey Bot. Club 19:203-218.
112. **Dangeard PA., 1926.** Recherches sur les tubercules radicaux des Légumineuses. Le Botaniste, Series 16, Pads. 270 p.
113. **Mouhsine B, Prell J, Filali-Maltouf A, Priefer UB, Aurag J., 2007.** Diversity, phylogeny and distribution of bean rhizobia in salt-affected soils of North-West Morocco. Symbioses 43:83-96.
114. **Jordan DC., 1984.** Family III. Rhizobiaceae, p. 234-242. In N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins Co, Baltimore, Md.
115. **Martinez Romero E, Segovia L, Martins Mercante F, Franco A, Graham P, Pardo MA., 1991.** Rhizobium tropici, a novel species nodulating Phaseolus vulgaris L. beans et Leucaena sp. International Journal of Systematic Bacteriology, 417-426.
116. **Segovia L, Young JPW, Martinez-Romero E., 1993.** Reclassification of American Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli type 1 strains as Rhizobium etli sp. Nov. Int. J. Syst. Bactcriol. 43:374-377.
117. **Michiels J, Moris M, Dombrecht B, Verreth C, Vanderleyden J, 1998.** Differential regulation of Rhizobium etli rpoN2 gene expression during symbiosis and free-living growth. J Bacteriol 180:3620-3628.
118. **Amarger N, Macheret V, Laguerre G., 1997.** Rhizobium gallicum sp. nov. and Rhizobium giardinii sp. nov, from Phaseolus vulgaris nodules. Int.J. of Syst. Bact. 47:996-1006.
119. **Hungria M, Franco Aet Sprent JI., 1993.** New sources of high temperature tolerant rhizobia for Phaseolus vulgaris L. Plant and Soil 149:103-109.
120. **Van Rhijn P, Desair Vlassak K, Vanderleyden J., 1994.** Functional analysis of nodD genes of Rhizobium tropici CIAT899. Mol. Plant Microbe Interact. 7:666-677.
121. **Herrera MA, Bedmar EJ, Olivares J., 1985.** Host specificity of Rhizobium strains isolated from nitrogen-fixing trees and nitrogenase activities of strain GRH2 in symbiosis with Prosopis chilensis. Plant Sci. 42:177-182.

122. **Cesar AI, Esther MG, Daniel M, Ruben L, Estibaliz L, Erena GQ., 2011.** Physiological response of legume nodules to drought. *Plant stress*. 5:24-31.
123. **Borucki W, Sujkowska M, 2008.** The effects of sodium chloride salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Acta Phys. Plant*. 30:293-301.
124. **Zahran HH, Sprent JI., 1986.** Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*, *Planta* 167:303-309.
125. **Faghire M, Bargaz A, Farissi M, Palma F, Mandri B, Lluch C, Tejera García NA, Herrera-Cervera JA, Oufdou K, Ghoulam C., 2011.** Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55:69-75.
126. **Bargaz A, Drevon JJ, Oufdou K, Mandri B, Faghire M, Ghoulam C., 2011.** Nodule phosphorus requirement and O₂ uptake in common bean genotypes under phosphorus deficiency. *Acta Agric Scan Section B-Soil and Plant Sci*. 61:602-611.
127. **Serrat R., 2002.** Response of symbiotic nitrogen fixation to drought and salinity stress. *Physiology Molecular Biology Plant* 8: 77-86.
128. **Lopez M, Herrera-Cervera JA, Iribarne C, Tejera NA, Lluch C., 2008.** Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: nodule carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology* 165: 641-650.
129. **Vadez V, Rodier F, Payre H, Drevon JJ., 1996.** Nodule conductance to O₂ and nitrogenase-linked respiration in bean genotypes varying in the tolerance of N₂ fixation to P deficiency, *Plant Physiol Biochem* 34:871-878.
130. **Serraj R, Roy G, Devron JJ., 1994.** Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and their permeability to oxygen diffusion. *Physiol Plant* 91:161-168.
131. **Kahn ML, McDermott TM, Udvardi MK., 1998.** Carbon and Nitrogen Metabolism in Rhizobia En: "The rhizobiaceae" HP Spaink, A Kondorosi, PJJ Hooykaas (Eds.). pp.461-485 Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Netherland.

132. **Gálvez L, González EM, Arrese-Igor C., 2005.** Evidence of carbon flux shortage and carbon/nitrogen interactions in pea nodules in conditions of water stress. *J Exp Bot* 56: 2551-2560.
133. **Geetanjali M, Neera G., 2008.** Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol Plant.* 30:595–618.
134. **Zhu JK., 2003.** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Cur. Opin. in plant biology* 6:441-445.
135. **Sanders D, Brownlee C, Harper JF., 1999.** Communicating with calcium. *Plant Cell* 11, 691-706.
136. **Fukuda A, Chiba K, Maeda M, Nakamura A, Maeshima M, Tanaka Y., 2004.** Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter from barley. *J Exp Bot* 55:585–94.
137. **Munns R, Termaat A, 1986.** Whole plant responses to salinity. *Aust J Plant Physiol* 13:143-160.
138. **Wu Y, Spollen WG, Sharp RE, Hetherington PR, Fry SC, 1994.** Root growth maintenance at low water potentials increased activity of xyloglucan endotransglycosylase and it's possible regulation by abscisic acid. *Plant Physiol* 106: 607-615.
139. **Jia W, Wang Y, Zhang S, Zhang J., 2002.** Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J Exp Bot* 53:2201-2206.
140. **Lopez M, Tejera GNA, Iribarne C, Lluch C, Cervera HJA., 2008.** Trehalose and trehalase in root nodules of *Medicago truncatula* and *Phaseolus vulgaris* in response to salt stress. *Physiologia Plantarum.* 134:575–582.
141. **López-Gómez M, Lluch C., 2012.** Trehalose and Abiotic Stress Tolerance. *Abiotic stress responses in plants.* 253-265, DOI: 10.1007/978-1-4614-0634-1_14.
142. **Tejera NA, Campos R, Sanjuan J, Lluch C., 2005.** Effect of sodium chloride on growth, nutrient accumulation, and nitrogen fixation of common bean plants in symbiosis with isogenic strains. *Journal of Plant Nutrition* 28: 1907-1921.

- 143. Verdoy D, De la Pena TC, Redondo FJ, Lucas MM, Pueyo JJ., 2006.** Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress. *Plant Cell and Environment* 29: 1913-1923.
- 144. Shao N, KriegerLiszky A, Schroda M, Beko CF., 2007.** A reporter system for the individual detection of hydrogen peroxide and singlet oxygen: its use for the assay of reactive oxygen species produced in vivo. *The Plant Journal* 50:475-48.
- 145. Burris RH., 1991.** Nitrogenases. *Journal of Biological Chemistry* 266: 9339-9342.
- 146. Puppo A, B Halliwell., 1988.** Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is hemoglobin a biological Fenton reagent? *Biochem. Jour.* 249:185-190.
- 147. Rubio LM, Ludden PW., 2008.** Biosynthesis of the iron molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annual Review of Microbiology* 62: 93-111.
- 148. King.E.O, Wark.M.K and Raney., 1954.** Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and chemical medicine* N°44, 1954, pp.301-307.
- 149. Hoagland, D.R. and Arnon, D.I., 1938.** The water culture method for growing plants without soil, *California Agriculture Exp. Sta. Circ.*, pp. 347.
- 150. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton P.A., Ruberg A. & Smith F.. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry.* 28:3:350-356.
- 151. Troll, W. & J. Lindsley., 1955.** A photometric method for the determination of proline. *J. Biol. Chem.* 215: 655-660.
- 152. Monneveux, P. & M. Nemmar., 1986.** Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie*, 6 : 583-590.
- 153. Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Azarova,T., Makarova,N., Lugtenberg, B.J.J., 2006.** Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:250–56.

154. **Shaukat, K., Affrasayab, S. and Hasnain, S., 2006.** Growth responses of *Helianthus annuus* to plant growth promoting rhizobacteria used as a biofertilizer., *J. Agri. Res.*, vol.1(6), pp.573-581.
155. **Jacoud, C., Job, D., Wadoux, P., Bally, R., 1999.** Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can. J. Microbiol.* 45: 339-342.
156. **Groome M.C., Axler S. & Gfford D.J., 1991.** Hydrolysis of lipid and protein reserves in lobolly pine seeds in relation to protein electrophoretic patterns following imbibition. *Physiol. Plant*, 83, 99-106.
157. **Bliss R.D., Platt-Aloria K.A. & Thomson W.W., 1986.** Osmotic sensitivity in relation to sensitivity in germination barley seeds. *Plant Cell and Env.* 9,721-725.
158. **Zaidi, SFA., 2003.** Biocontrol of *Fusarium oxysporium* by plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) in soybean. *Ann. Agr. Res.* 24:676–678.
159. **Basavaraju, O., A.R.M. Rao et T.H. Shankarappa., 2002.** Effect of *Azotobacter* inoculation and nitrogen levels on growth and yield of radish (*Raphanus sativus* L.). *In: Proceedings of Microbial Technology for Sustainable Development and Productivity*, (Ed., Rajak D.C.), Jabalpur, Biotechnology of Microbes and Sustainable Utilization, pp. 155-160.
160. **Reyes, I., L. Alvarez, H. El-Ayoubi et A. Valery., 2008.** Selection and evaluation of growth promoting rhizobacteria on pepper and maize. *Bioagro.* 20:37–48.
161. **Kaymak, HC., I. Guvenc, F. Yarali et MF. Donmez., 2009.** The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. *Turk J Agric Forest*, 33:173–179.
162. **B. Shaharoon, M. Arshad, Z.A. Zahir., 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 (2), 155-159.
163. **K.V.B.R. Tilak, N. Ranganayaki, C. Manoharachari., 2006.** Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Eur. J. Soil. Sci.*, 57 (1), 67-71.

- 164. L.A. Pirlak, M.B. Köse., 2009.** Effects of plant growth promoting rhizobacteria on yield and some fruit properties of strawberry, *J. Plant Nutr.*, 32 (7), 1173-1184.
- 165. D. Egamberdieva, G. Berg, K. Lindström, L.A. Räsänen., 2010.** Co-inoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.). *Eur. J. Soil Biol.*, 46, 269-272.
- 166. Waluyo SH, Lie TA, Mannetje L., 2004.** Effect of phosphate on nodule primordia of soybean (*Glycine max*) in acid soils in rhizotron experiments. *Ind. J. Agric. Sci.* 5: 27-44.
- 167. Tagoe SO, Horiuchi T, Matsui T., 2008.** Effects of carbonized and dried chicken manures on the growth, yield, and N content of soybean. *Plant Soil.* 306: 211-220.
- 168. A. Robin, G. Vansuyt, P. Hinsinger, J.M. Meyer, J.F. Briat, P. LEMANCEAU., 2008.** Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition. *Adv. Agron.* 99, 183-225.
- 169. M.M. Collavino, P.A. Sansberro, L.A. Mroginski, O.M. AGUILAR., 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 (7), 727-738.
- 170. A.O. Adesemoyea, H.A. TorBERTB, J.W. Kloeppera., 2010.** Increased plant uptake of nitrogen from 15N-depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. *Appl. Soil Ecol.*, 46 (1), 54–58.
- 171. B.R. Glick, B. Todorovic, J. Czarny, Z. Cheng, J. Duan, B. Mcconkey., 2007.** Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 26 (5), 227–242.
- 172. Benamar B., Daguin F. & Kaid-Harche M., 2009.** Effet du stress salin sur la germination et la croissance in vitro du pistachier (*Pistacia vera* L.). *Comptes Rendus Biologies*, 332, 752-758.
- 173. Ben Khaled L, Morte Gómez A, Honrubia M, Oihabi A., 2003.** Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le *Rhizobium*. *Agronomie* 23: 553-560.

- 174. Jeffrey R, Seemann, Christa Critchley., 1985.** Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 164: 51–16.
- 175. Wu Y, Spollen WG, Sharp RE, Hetherington PR, Fry SC., 1994.** Root growth maintenance at low water potentials increased activity of xyloglucan endotransglycosylase and its possible regulation by abscisic acid. *Plant Physiol* 106: 607-615.
- 176. Hamrouni L., Hanana M., Abdelly C. et Ghorbel A., 2011.** Exclusion du chlorure et inclusion du sodium : deux mécanismes concomitants de tolérance à la salinité chez la vigne sauvage *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (var. 'sejnène') *Biochim. agronom. Soc. Environ.* 15 (3), 387-400.
- 177. Marschner, H., 1995.** Saline soils, *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.
- 178. Navarro, J.M., Garrido, C., Carvajal, M., Martinez, V., 2002.** Yield and fruit quality of pepper plants under sulphate and chloride salinity. *J. Hort. Sci. Biotech.* 77, 52–57.
- 179. Zahran HH., 1999.** *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:968-989.
- 180. Cesar AI, Esther MG, Daniel M, Ruben L, Estibaliz L, Erena GQ., 2011.** Physiological response of legume nodules to drought. *Plant stress.* 5:24-31.
- 181. Oldroyd GE, Engstrom EM, Long SR., 2001.** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 13: 1835-49.
- 182. Wood M, Cooper JE, Holding AJ., 1984.** Soil acidity factors and nodulation of *Trifolium repens*. *Plant Soil* 78(3):367-379.
- 183. Peoples MB, Lilley DM, Burnett VF, Ridley AM, Garden DL., 1995.** Effects of surface application of lime and superphosphate to acid soils on growth and N₂ fixation by subterranean clover in mixed pasture sward. *Soil Biol. Biochem.* 27(4-5):663-671.
- 184. Ndakidemi PA, Dakora FD, Nkonya EM, Ringo D, Mansoor H., 2006.** Yield and economic benefits of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* L. Merr.) inoculation in northern Tanzania. *Aust J Exp Agric* 46(4):571-577.

- 185. Bambara S, Ndakidemi PA., 2010.** *Phaseolus vulgaris* response to *Rhizobium* inoculation, lime and molybdenum in selected low pH soil in Western Cape, South Africa. *Afr J Agr Res* 5(14):1804-1811.
- 186. Kohler J, Caravaca F, Carrasco L, Roldán A., 2006.** Contribution of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* to aggregate stabilization and promotion of biological fertility in rhizosphere soil of lettuce plants under field conditions. *Soil Use Manage* 22:298–304.
- 187. Bacilio M, Rodriguez H, Moreno M, Hernandez JP, Bashan Y., 2004.** Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Boil Fertil Soil* 40:188–193.
- 188. Zahir ZA, Ghani U, Naveed M, Nadeem SM, Asghar HN., 2009.** Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of Alfalfa under salt-stressed conditions. *Arch Microbiol* 191:415-424.
- 189. Giri B, Mukerji KG .2004.** Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza* 14:307–312.
- 190. Sheng, X.F. (2005).** Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Soil Biol. Biochem.*, **37**: 1918-1922.
- 191. Tripathi, A.K., T. Nagarajan, S.C. Verma et D.L. Rudulier (2002).** Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in *A. brasilense* Sp7 under salinity stress. *Curr. Microbiol.*, **44**: 363-367.
- 192. Ahmad, F., I. Ahmad et M.S. Khan (2005).** Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.*, **29**: 29-34.
- 193. Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa TM., 2007.** Characterization of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC) deaminase containing *Methylobacterium oryzae* and interactions with auxins and ACC regulation of ethylene in canola (*Brassica campestris*). *Planta* 226:867-876.
- 194. Mayak S, Tirosh T, Glick BR., 1999.** Effect of wild-type and mutant plant growth promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. *J Plant Growth Regul* 18:49-53.

- 195. Tahir M, Arshad M, Naveed M, Zahir ZA, Shaharoon B, Ahmad R., 2006.** Enrichment of recycled organic waste with N fertilizer and PGPR containing ACC-deaminase for improving growth and yield of tomato. *Soil Environ* 25:105-112.
- 196. Belimov AA, Dodd IC, Hontzeas N, Theobald JC, Safronova VI, Davies WJ., 2009.** Rhizosphere bacteria containing ACCdeaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signaling. *New Phytologist* 181:413-423.
- 197. Belimov AA, Dodd IC, Safronova VI, Davies WJ., 2009.** ACCdeaminase-containing rhizobacteria improve vegetative development and yield of potato plants grown under waterlimited conditions. *Aspects Appl Biol* 98:163-169.
- 198. Malhotra M, Srivastava S., 2006.** Targeted engineering of *Azospirillum brasiliense* with indole acetamide pathway for indole acetic acid over-expression. *Can J Microbiol* 52:1078-1084.
- 199. Yurekli F, Porgali ZB, Turkan I., 2004.** Variations in abscisic acid, indole-3-acetic acid, gibberellic acid and zeatin concentrations in two bean species subjected to salt stress. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 46:201-212.
- 200. Zahir ZA, Shah MK, Naveed M, Akhter MJ., 2010.** Substratedependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. *J Microbiol Biotechnol* 20:1288-1294.
- 201. Ashraf, M., S. Hasnain, O. Berge et T. Mahmood., 2004.** Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biol. Fertil. Soils*, 40: 157-162.
- 202. Vivas, A., B. Biro, E. Campos, J. M. Barea et R. Azcón., 2003.** Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mossae*) and *Brevibacillus* sp. Isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environ. Pollut.*, 126: 179-189.
- 203. Djerroudi –Zidane O, Belkhodja M, Bissati S, Hadjadj S., 2010.** Effet du Stress Salin sur l'accumulation de Proline chez deux espèces d'Atriplex halimus L. et Atriplex canescens (Pursh) Nutt. *European Journal of Scientific Research*: Vol.41, n°2, pp 249-260.

- 204. Hassani A, Dellal A, Belkhodja, Kaid- Harche M., 2008.** Effet de la Salinité sur l'eau et certains osmolytes chez l'orge (*Hordeum Vulgare* L.). European Journal of scientific Research Vol.23n°.1. PP. 61-69.
- 205. B. Nedjimi., 2009.** Salt tolerance strategies of *Lygeum spartum* L.: A new fodder crop for Algerian saline steppes. *Flora*, 204, 747–754.
- 206. EL-iklil Y, Karrou M, Mrabet R, Benichou M., 2002.** Effet du stress salin sur la variation de certains métabolites chez *Lycopersicum esculentum* et *Lycopersicum sheesm Eanii*. Canadian Journal of Plant Science, 2002, vol 82n°, pp. 177-183.
- 207. Belkhodja M, Bidai Y., 2004.** Réponse de la germination des graines d'*Atriplex halimus* L. sous stress salin. *Revue Sécheresse*, N°4, vol.15, pp.331-335.
- 208. G. Karimi, M. Ghorbanli, H. Heidari, R.A. Khavari Nejad, M.H. Assareh., 2005.** The effects of NaCl on growth, water relations, osmolytes and ion content in halophyte plants *Biol. Plant.* 49(2), 301–304.
- 209. Parida A., Das A.B., Das P., 2002.** NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera ariflora*, in hydroponic cultures. *J. Plant Biol.* 45, 28–36.
- 210. - Parida A.K., Das A.B., 2005.** Salt tolerance and salinity effect on plants: review. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* Vol.60, pp. 324-349.
- 211. Singh S.C., Sinha R.P., Hader D.P., 2002.** Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protozool.* 41, 297–308.
- 212. Wang Y., Nil N., 2000..** Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase–oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 75, 623–627.