

## SOMMAIRE

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

### I. Etude bibliographique

<b>1. Situation des productions fourragères et pastorales en Algérie .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Les légumineuses .....</b>	<b>4</b>
2.1.Généralités sur les légumineuses .....	4
2.2.Les légumineuses fourragères .....	6
2.2.1. Le genre <i>Scorpiurus</i> .....	7
<i>Taxonomie du genre Scorpiurus</i> .....	8
2.2.2. Présentation de l'espèce <i>Scorpiurus muricatus</i> ssp. <i>sulcatus</i> .....	9
<i>Ecologie</i> .....	10
<i>Intérêts</i> .....	10
<b>3. Les rhizobia .....</b>	<b>11</b>
3.1.Taxonomie des Rhizobia .....	12
3.2.Les nouvelles modifications dans la classification des rhizobia .....	15
Le "Complexe <i>Rhizobium galegae</i> " .....	15
Le genre <i>Burkholderia</i> .....	16
<b>4. La symbiose rhizobia– légumineuse .....</b>	<b>16</b>
4.1.Le dialogue moléculaire établi entre les rhizobia et la plante hôte au cours de la nodulation .....	18
4.2.Les différents modes d'infection .....	19
4.3.Les formes de nodules formés sur les racines des légumineuses .....	22
<b>5. Les endophytes .....</b>	<b>26</b>
5.1.L'infection de la plantes par les endophytes.....	27
5.2.Le nodule, peut-il héberger des bactéries autres que les rhizobia? .....	27
5.3.Diversité des endophytes nodulaire .....	28
<b>6. Le Rôle du microbiome nodulaire dans l'amélioration de la croissance des légumineuses. .....</b>	<b>33</b>

### II. Matériel et méthodes

<b>1. Matériel biologique .....</b>	<b>36</b>
<b>1.1.Prospection de <i>Scorpiurus muricatus</i> dans l'ouest algérien .....</b>	<b>36</b>
<b>1.2.Echantillonage du sol, des graines et des nodules de <i>Scorpiurus muricatus</i> ssp. <i>sulcatus</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>2. Méthodes .....</b>	<b>37</b>
<b>2.1.Analyse physicochimique du sol .....</b>	<b>37</b>
2.1.1. Analyse physique .....	37

<i>Analyse granulométrique</i> .....	37
<i>Mesure du pH</i> .....	38
2.1.2. <i>Analyse chimique</i> .....	38
<i>La mesure de la conductivité électrique</i> .....	38
<i>Le dosage du calcaire total</i> .....	38
<i>Le dosage du calcaire actif</i> .....	39
<i>Le dosage du carbone et détermination du taux de la matière organique</i> .....	39
<i>Le dosage de l'azote</i> .....	40
<i>Le dosage du phosphore</i> .....	40
<b>2.2. Germination des graines de <i>Scorpiurus muricatus</i> ssp. <i>sulcatus</i></b> .....	<b>41</b>
<b>2.3. Piégeage des rhizobia associés à <i>Scorpiurus muricatus</i></b> .....	<b>41</b>
2.3.1. Obtention des plantes .....	41
2.3.2. Inoculation in vitro des plantes .....	42
<b>2.4. Isolement et sélection des isolats bactériens associés à <i>Scorpiurus muricatus</i></b> .....	<b>42</b>
2.4.1. Les bactéries nodulaires .....	42
2.4.2. Les bactéries racinaires .....	43
Désinfection des racines de <i>Scorpiurus muricatus</i> .....	43
Isolement et purification des endophytes .....	44
Conservation des endophytes racinaires .....	44
<b>2.5. Authentification des isolats nodulaires</b> .....	<b>44</b>
<b>2.6. Caractérisation moléculaire des isolats associés à <i>Scorpiurus muricatus</i></b> .....	<b>45</b>
2.6.1. Extraction de l'ADN génomique par choc thermique .....	45
2.6.2. La recherche du gène symbiotique ( <i>nodC</i> ) parmi les souches nodulaires associées à <i>Scorpiurus muricatus</i> .....	46
2.6.3. Evaluation de la diversité génétique des isolats de la collection par Rep-PCR .....	47
Amplification .....	48
<i>Les isolats nodulaires</i> .....	48
<i>Les isolats racinaires</i> .....	48
La migration des amplifiats et coloration des gels .....	48
Analyse des données de la rep-PCR .....	49
2.6.4. Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S .....	49
2.6.5. Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S .....	50
2.6.6. Analyse phylogénétique .....	50
<b>2.7. Recherche des caractéristiques PGP (Promoting growth plant) des isolats associés à <i>Scorpiurus muricatus</i></b> .....	<b>51</b>
2.7.1. Solubilisation du phosphate .....	51
2.7.2. Production d'AIA .....	51
<b>2.8. Inoculation de <i>Scorpiurus muricatus</i> par les isolats nodulaires et racinaires</b> .....	<b>52</b>
<i>Les isolats nodulaires</i> .....	52
<i>Les isolats racinaires</i> .....	52
<b>2.9. Analyse statistique</b> .....	<b>53</b>

### **III. Résultats et Discussion**

<b>1. Prospection et échantillonnage .....</b>	<b>54</b>
<b>2. Analyses physico-chimiques des sols .....</b>	<b>57</b>
<b>3. Optimisation des conditions de la germination des graines .....</b>	<b>59</b>
<b>4. Constitution d'une collection de souches bactérienne .....</b>	<b>61</b>
4.1. Piégeage des rhizobia .....	61
4.2. Isolement, purification et sélection des souches associées à <i>Scorpiurus muricatus</i> .....	61
<i>A partir des nodules</i> .....	61
<i>A partir des racines</i> .....	65
<b>5. Authentification des isolats nodulaires .....</b>	<b>67</b>
<b>6. Détection du gène de nodulation <i>nodC</i> .....</b>	<b>69</b>
<b>7. Evaluation de la diversité génétique des isolats de la collection par Rep-PCR et le séquençage de l'ADNr 16S .....</b>	<b>71</b>
<i>Les isolats nodulaires</i> .....	71
<i>Les isolats racinaires</i> .....	81
<b>8. Evaluation des caractéristique PGP des souches isolées de <i>Scorpiurus muricatus</i> ssp. <i>sulcatus</i> .....</b>	<b>89</b>
8.1. La Solubilisation du phosphate .....	89
<i>Les souches nodulaires</i> .....	89
<i>Les souches racinaires</i> .....	89
8.2. La production d'équivalent AIA .....	92
<i>Les souches nodulaires</i> .....	92
<i>Les souches racinaires</i> .....	93
<b>9. Effet de l'inoculation de <i>Scorpiurus muricatus</i> ssp. <i>sulcatus</i> par les souches nodulaires et racinaires .....</b>	<b>95</b>
<i>Les souches nodulaires</i> .....	95
<i>Les souches racinaires</i> .....	98
<b>Conclusion Et Perspectives .....</b>	<b>101</b>
<b>Références bibliographique .....</b>	<b>104</b>
<b>Annexes</b>	



# *Introduction*

## **Introduction**

L'Algérie est considérée comme un pays à vocation pastorale et fourragère en premier lieu, cependant, l'alimentation du bétail constitue incontestablement, l'une des contraintes majeures entravant l'essor de l'élevage (Abdelguerfi *et al.*, 2008). En effet, les spécialistes de la filière estiment le déficit fourrager à 60% (Nedjraoui, 2008). Quatre vingt deux pourcent des ressources fourragère proviennent de la jachère, des chaumes de céréales, des pacages, des parcours forestiers et steppiques ainsi que des cultures fourragères. Ces dernières ne couvrent que 8% de la demande, constituées par les fourrages secs (2/3 environ des surfaces fourragères), tandis que la part des fourrages verts qui sont plus nutritifs est faible (1/3) (Nedjraoui, 2002).

La culture des plantes fourragères a régressé en Algérie, ce qui a mené à l'augmentation de leur prix et a forcé les éleveurs à trouver des substituants peu satisfaisants en terme de qualité nutritionnelle (Hammadache, 2001). Pour remédier à cette situation, l'état a réorienté ses efforts vers le soutien de la culture fourragère, en impliquant l'Office Algérien Interprofessionnel des Céréales (OAIC) dans la production du fourrage vert tout en encourageant la rotation céréales-légumineuses fourragères (El-Moudjahid, 2016).

Les légumineuses constituent une source majeure de protéines pour l'alimentation humaine et animale (Terefework *et al.*, 2001). Elles contribuent à la fertilisation du sol grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec certaines bactéries du sol appelées rhizobia (Loi *et al.*, 2000 ; Graham et Vance, 2003). Le résultat de cette symbiose spécifique est la formation d'un nouvel organe appelé « nodule » sur les racines ou les tiges, à l'intérieur duquel les rhizobia s'installent et se différencient en bactéroïdes. Ces derniers réduisent l'azote de l'air en ammoniac assimilable par la plante et profitent des métabolites fournis par celle-ci afin d'assurer leur multiplication et l'énergie nécessaire à cette fixation symbiotique. La quantité d'azote fournie par an à la plante et au sol par cette voie est équivalente à celle synthétisée par la voie chimique (Graham, 1981).

Les légumineuses peuvent établir d'autres associations avec d'autres types de microorganismes bénéfiques tels que les endophytes. Ces microorganismes colonisent les tissus internes de la plante sans présenter aucun signe externe d'infection ou d'effet négatif sur leur hôte (Holliday 1989, Schulz et Boyle 2006). Les bactéries endophytes procurent beaucoup d'avantages à la plante et contribuent à l'amélioration de sa croissance (effet PGP : Plant Growth Promoting) via différents mécanismes : la production de phytohormones,

l'amélioration de la disponibilité des minéraux, la production de sidérophores et la lutte biologique contre les phytopathogènes (Santoyo *et al.*, 2016).

En Algérie, les espèces spontanées d'intérêt pastoral et fourrager, particulièrement les légumineuses, occupent une importante place dans la flore algérienne (Abdelguerfi et Laouar, 1999). *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* est une légumineuse méditerranéenne annuelle spontanée à écologie indifférente, assez commune en Algérie (Bensalem *et al.*, 1990). Elle présente beaucoup de qualités écologiques (système racinaire pivotant) (Ouzzane et Abdelguerfi, 1989) et fourragères (masse végétative importante, haute teneur en protéines, palatabilité et effets galactagogues) (Younsi, 1991 ; Licitra *et al.*, 1997 ; Di Giorgio *et al.*, 2009). Mais malheureusement elle a été négligée par les agriculteurs et les chercheurs (Abbate *et al.*, 2010).

Très peu d'études sont menées sur l'identification des bactéries associées à *Scorpiurus muricatus*, seuls les travaux de Safranova *et al.* (2004) et de Muresu *et al.* (2008) ont abordé les bactéries associées à cette plante. A notre connaissance aucune étude n'a été rapportée en littérature sur les bactéries colonisant les nodules et les racines de *S. muricatus* ssp. *sulcatus* dans la région sud de la Méditerranée. La rareté des travaux à travers le monde sur les interactions entre *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* et les microorganismes qui lui sont associés nous a conduit à nous y intéresser.

Ce travail est divisé en trois parties :

- La première partie concerne la prospection et l'échantillonnage de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* à partir de six régions de l'ouest algérien ainsi que l'isolement des microorganismes logés dans les nodules et les racines de *Scorpiurus muricatus*.
- Dans la deuxième partie, on a procédé à la caractérisation moléculaire des isolats de la collection, par l'amplification du gène *nodC*, la rep-PCR et un séquençage partiel de l'ADNr16S.
- Pour la troisième partie, on s'est intéressé aux caractéristiques PGP (Plant Growth Promoting) des souches isolées, évalués par l'étude de leur capacité à solubiliser le phosphore et à produire l'AIA (Acide Indole Acetic) et après inoculation des plantes de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus*.

**<Une expérience est une question que la science pose à la Nature. La mesure est l'enregistrement de la réponse de la Nature.> « Max Plank »**

# *Etude bibliographique*

## **1. Situation des productions fourragères et pastorales en Algérie**

La production fourragère est très limitée en Algérie (Abdelguerfi et Laouar, 2001 ; Abdelguerfi *et al.*, 2008 ; Nedjraoui et Bédrani, 2008). En effet, depuis la période coloniale, les terres pastorales ont subi de sévères dégradations, dues aux effets combinés d'une pression humaine et animale croissante et d'une sécheresse aggravante. Ces dégradations sont accentuées par le contexte d'affaiblissement de la gestion traditionnelle des territoires, provoquées par les changements socio-économiques et politiques et l'absence de mesures appropriées de la part de l'état et ses services techniques, pour substituer aux anciennes règles de gestion du patrimoine pastoral et écologique (Nouad, 2001).

Selon Kanoun *et al.* (2007) l'élevage constitue la première ressource renouvelable et joue un rôle vital dans l'agriculture et l'économie de l'Algérie. Toutefois la rentabilité de ce secteur est conditionnée principalement par l'alimentation fourragère. Abdelguerfi *et al.* (2008) ont indiqué que les productions fourragères et pastorales sont l'élément clé de la révolution agricole et agro-industrielle dans le monde, alors qu'en Algérie, l'alimentation du cheptel est considérée comme étant un problème crucial limitant la production animale. Adem (2002) estime que le déficit fourrager est de 58% en zone littorale, 32% en zone steppique et 29% au Sahara. Merouane (2008) et Hamadache (2001) ont reporté que les ressources fourragères en Algérie se composent essentiellement des chaumes de céréales, de la végétation de jachères pâturées, des parcours steppiques, forêts, maquis et d'un peu de fourrages cultivés. Les terres consacrées à la production fourragère couvrent 33 millions d'hectares répartis entre les prairies naturelles (0,1%), les cultures fourragères (1,6%), la jachère (10,6%) et les pacages et parcours (87,7%) (Nedjraoui, 2002).

En Algérie les cultures fourragères n'ont jamais eu la place qui leur ait due (Abdelguerfi et Laouar, 2001). En effet, la surface destinée à la culture fourragère est très faible et ne correspond qu'à 14% de la surface agricole totale (SAT) (Chabaca, 2009). Cette surface a beaucoup régressé, entre 1980 et 2007, où elle est passée de 0,593 à 0,494 millions d'hectares (Abdelguerfi *et al.*, 2008)

L'Algérie, par la richesse et la diversité de ses milieux et de ses terroirs constitue un immense réservoir de plantes diverses atteignant 3139 espèces (Quézel et Santa, 1962 ; Zeraïa, 1983), en particulier d'intérêt fourrager et ou pastoral (Abdelgherfi et Laouar 2001), toutefois la diversité des espèces utilisées dans la production fourragère est très limitée et les cultures de la vesce-avoine, de l'orge et de l'avoine, destinées à la production du foin, constituent les principales

cultures, en plus de quelques légumineuses provenant principalement des semences importées dont les plus performantes sont le trèfle semeur (*Trifolium subterraneum*) et la luzerne tronquée (*Medicago truncatula*) (Abdelguerfi *et al.*, 2008). Malgré le fait que ces espèces soient largement utilisées, elles restent inadaptées à de nombreuses situations à cause des contraintes climatiques, édaphiques, biologiques ou autres prévalant en Algérie (Nedjraoui, 2003 ; Abdelguerfi *et al.*, 2008)

Afin de diversifier les ressources fourragères et de réduire la jachère, de nombreuses études et expérimentations orientées par le Plan National de Développement Agricole (PNDA) sont entreprises. D'après Hamadache (2001), les cultures de remplacement proposées variaient selon les étages bioclimatiques, mais les précipitations restent le facteur qui conditionne la réussite de ces expériences. Il est recommandé de développer le potentiel végétal existant et d'adopter un nouveau système d'élevage plus performant. Une nouvelle démarche a été entreprise par le ministère au début de l'année 2016, se basant principalement sur l'élargissement du soutien aux cultures fourragères pour encourager les agriculteurs dans le cadre de la résorption des terres en jachère. Pour ce faire, les pouvoirs publics ont impliqué, pour la première fois, l'Office Algérien Interprofessionnel des Céréales (OAIC) dans la production du fourrage vert. L'OAIC a comme principal objectif l'absorption de 500000 ha de jachère d'ici 2019 dont 375000 ha par les fourrages (El-Moudjahid, 2016), en encourageant la rotation céréales-légumineuses fourragères, l'utilisation des semences indigènes mieux adaptées aux conditions climatiques et ayant une meilleure performance.

## **2. Les légumineuses**

### **2.1. Généralités sur les légumineuses**

Avec environ plus de 18000 espèces reparties en 750 genres, la famille des légumineuses (Fabacées) est la troisième plus grande famille d'Angiospermes après les Orchidacées et les Astéracées (Allen et Allen, 1981 ; Lewis *et al.*, 2005 ; Legume Phylogeny Working Group LPWG, 2013). Ayant une distribution mondiale et une grande importance écologique et économique, couvrant tous les principaux biomes et formant des constituants écologiquement importants des écosystèmes tempérés, méditerranéens, tropicaux, arides, saisonnièrement secs, des forêts tropicales et de savanes (Doyle et Luckow, 2003; Schrire *et al.*, 2005). Cette famille se subdivise en trois sous-familles, les Papilioïdeae, les Mimoïdeae et les Caesalpinoïdeae.

Les Caesalpinoideae, comprennent environ 150 genres et 2200 espèces. Ce sont principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. Seules 23 % des espèces (parmi celles investiguées) sont connues pour être nodulées par les rhizobia. Ces espèces se retrouvent dans les tribus des Caesalpinieae et Cassieae. Les tribus Cercideae, Detarieae et Amherstiaeae sont très peu nodulées (de Faria *et al.*, 1989).

Les Mimosoideae sont composées surtout d'arbres et d'arbustes présents dans les régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille possède à l'heure actuelle 62 genres et environ 2500 espèces, dont la majorité (90 %) sont nodulées parmi les 10 % testées (de Faria *et al.*, 1989).

Les espèces de la sous-famille Papilioideae sont présentes dans le monde entier (Rachie et Silvestre, 1977) avec 429 genres et plus de 12000 espèces dont 97 % parmi les espèces testées (21 % du total) sont nodulées par les rhizobia (de Faria *et al.*, 1989). Les plantes de cette sous-famille sont principalement des herbes mais comprennent aussi des arbres et des arbustes et sont présentes en régions tempérées et tropicales.

Une nouvelle classification des légumineuses a été proposée avec six sous-familles, basée sur les séquences de gènes MATK du plastide des 20% de toutes les espèces de légumineuses à travers 90% de tous les genres actuellement reconnus (LPWG, 2017). Les six sous-familles proposées sont les Caesalpinoideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae et Papilioideae res-circonscrit. Dans ce système, les Mimosoideae actuellement reconnues est un clade distinct niché dans les Caesalpinoideae re-circonscrits. Les espèces incluses dans les Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae et Duparquetioideae ne nodulent pas (Andrews et Andrews, 2017 ; LPWG, 2017 ; Sprent *et al.*, 2017)

Les légumineuses ont la capacité unique de pouvoir fixer l'azote atmosphérique en association avec les rhizobia par la formation de nodules sur les racines ou les tiges, à la seule exception du genre *Parasponia* (non legumineuse) de la famille des Ulmacées (Trinick et Hadobas, 1988 ; Lafay *et al.*, 2006 ; Behm *et al.* 2014). En effet les légumineuses sont d'un intérêt stratégique renforcé tant pour leur capacité à fournir de l'azote à faible coût aux systèmes de culture, que pour leurs répercussions environnementales. Utilisées comme culture principale, en association ou en culture intermédiaire, les légumineuses présentent des intérêts environnementaux (protection des eaux souterraines contre le lessivage des nitrates et des sols contre l'érosion et la désertification) et agronomiques indéniables (restitution de l'azote et d'autres éléments minéraux à la culture suivante, apport de matière organique, stimulation de l'activité

biologique des sols, diversification de la rotation, rupture des cycles de maladies et de ravageurs, ...) (Czernic *et al.*, 2015 ; Schneider *et al.*, 2015)

## **2.2.Les légumineuses fourragères**

Dans les pays du Maghreb et plus particulièrement en Algérie, la production fourragère et pastorale est très limitée et constitue souvent un frein au développement de l'élevage. Les espèces spontanées d'intérêt fourrager et pastoral, particulièrement les légumineuses, occupent une place importante dans la flore du bassin méditerranéen. L'une des voies les mieux indiquée est la valorisation de ces ressources phytogénétiques par leur introduction au niveau des terres réservées aux cultures fourragères ou au niveau des jachères, des parcours et des steppes. (Abdelguerfi *et al.*, 2008)

L'ensemble du pourtour méditerranéen abrite une flore très riche en légumineuses adaptées aux diverses conditions pédo-climatiques de ces régions (la sécheresse et la salinité), ayant développé des mécanismes d'adaptation particuliers avec des systèmes racinaires puissants. Plusieurs travaux de recherche sont effectués sur certaines espèces (herbacées et ligneuses) dans le but de limiter la désertification et d'augmenter les ressources pastorales (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar, 2004).

Bien que le bassin méditerranéen fait partie des zones les plus riches de la planète en diversité génétique, ces immenses réservoirs naturels spontanés sont hélas en cours de disparition, du fait des remaniements imposés par l'agronomie moderne (Pernes, 1984). D'après Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar (2004), l'érosion se manifeste de façon plus dramatique et plus variées dans la communauté sauvage que chez les formes domestiques : destruction directe d'écosystèmes forestiers, dégradation consécutives à une exploitation excessive de pâturages, effet spectaculaires de pollution à caractère brutal, déviations lentes dues à des pollutions insidieuses.

Hamilton *et al.* (2001), rapportent que le degré d'endémisme de la flore du bassin méditerranéen est très élevé ; sur 967 espèces appartenant à 18 genres de fabacées fourragères et/ou pastorales, 336 espèces sont endémiques à la région méditerranéenne (Tableau 1).

**Tableau1:** Nombre d'espèces de légumineuses fourragères dénombrées dans le monde et exclusivement Méditerranéennes ainsi que le pourcentage des espèces présentes dans les régions ouest-méditerranéennes (Hamilton *et al.*, 2001).

Genres	Nombre d'espèces de légumineuses dans le monde	Nombre d'espèces de légumineuses méditerranéennes	Nombre d'espèces de légumineuses exclusivement méditerranéennes	% d'espèces de légumineuses dans les régions Ouest de la méditerranéen*
<i>Hippocrepis</i>	29	28	19	54
<i>Ononis</i>	66	63	43	86
<i>Anthyllis</i>	16	16	10	56
<i>Onobrychis</i>	118	91	68	10
<i>Hedysarum</i>	69	37	28	30
<i>Omithopous</i>	6	6	2	100
<i>Trigonella</i>	71	44	22	11
<i>Coronilla</i>	10	10	3	70
<i>Vicia</i>	110	87	32	38
<i>Lathyrus</i>	80	61	22	41
<i>Medicago</i>	70	60	19	43
<i>Lotus</i>	99	58	25	60
<i>Trifolium</i>	161	117	37	43
<i>Dorycnium</i>	5	5	1	80
<i>Melilotus</i>	19	17	3	59
<i>Lupinus</i>	42	6	2	50
<i>Biserrula</i>	2	2	0	/0
<i>Scorpiurus</i>	2	2	0	100
<b>Total</b>	<b>976</b>	<b>710</b>	<b>336</b>	/

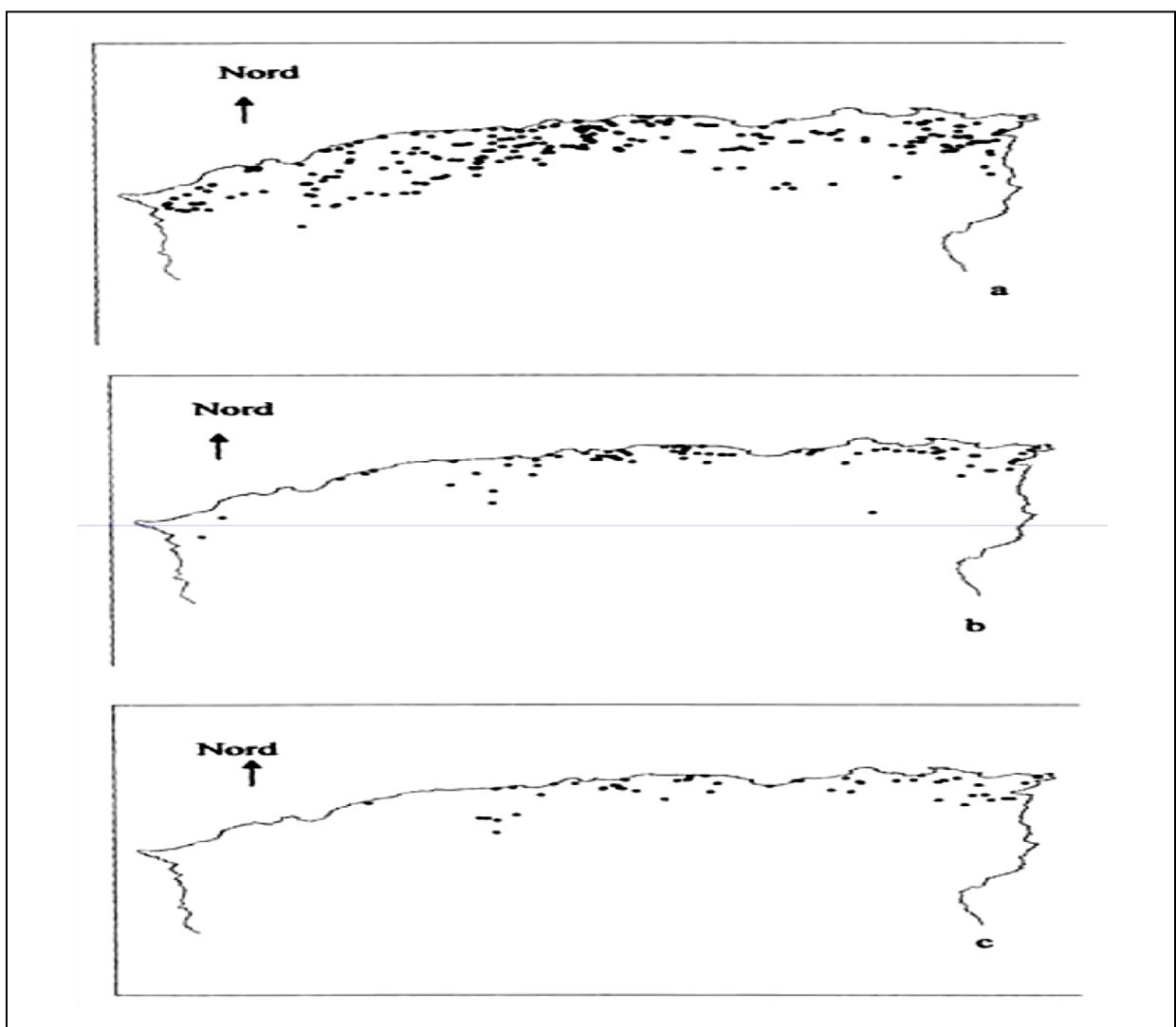
\* Régions Ouest de la Méditerranée (Algérie, Maroc, Tunisie).

### 2.2.1. Le genre *Scorpiurus*

Appelée chenillette ou scorpiure (taguourit en berbère, el ghagfa ou oudhinet ennâadja en arabe), les espèces du genre sont connues comme adventices des cultures et surtout comme plantes fourragères et pastorales spontanées très recherchées par le cheptel (M'hammedi Bouzina *et al.*, 2010). L'origine du genre semble être l'ouest du bassin méditerranéen et son aire de répartition est surtout méditerranéenne, avec une présence des espèces tétraploïdes sur tous les continents. En Algérie, sa présence est reportée sur tout le Tell (Quézel et Santa, 1962) et essentiellement au nord de la steppe (Abdelguerfi, 2001). M'hamed Bouzina *et al.* (2005) précisent leur distribution en Algérie (Figure 1) : *Scorpiurus vermiculatus* et *Scorpiurus muricatus* ssp. *subvillosum* sont généralement localisées dans la région nord du centre à l'est, tandis que *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* s'étend au nord d'est en ouest.

Les espèces du genre *Scorpiurus* font en Algérie l'objet d'investigations depuis plusieurs années. Bensalem (1982) a mis en évidence les potentialités fourragères, pastorale et

d'adaptation de *Scorpiurus*. Goumiri et Abdelguerfi (1991) ont souligné leur richesse en protéines et leur qualité fourragère. Grâce à une masse végétative importante, les espèces du genre permettent un bon recouvrement du sol (Younsi, 1991). Ouzzane (1988) a signalé que la forte croissance du système racinaire de type pivotant de *S. vermiculatus* permet une bonne fixation du sol. Ces espèces sont toutes indiquées pour intervenir au niveau de la résorption de la jachère, de la protection des sols contre l'érosion, de la mise en valeur et l'amélioration des parcours, de la réhabilitation des sites dégradés (Atallah *et al.*, 2008) et d'une manière générale dans l'augmentation de la production fourragère et pastorale (Younsi, 1991 ; Goumiri et Abdelguerfi 1991).



**Figure 1:** Distribution des espèces du genre *Scorpiurus* en Algérie (M'hammedi Bouzina, 2010).  
a: *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* ; b: *Scorpiurus vermiculatus*; c: *Scorpiurus muricatus* ssp.  
*Subvillosum*

### **Taxonomie du genre *Scorpiurus***

Selon Quézel et Santa (1962) le genre *Scorpiurus* appartient à la famille des fabacées de la tribu des Hedysarées. Certain auteurs classent ce genre dans la tribu des Loteae (Lewis *et al.*, 2005) ou celle des Coronilleae (Allan et Porter, 2000) et lui créent la sous tribu des Scorpiurinae (Talavera et Dominguez, 2000). Sa classification a été plusieurs fois revue et n'est pas encore très claire surtout pour le complexe d'espèces *Scorpiurus muricatus*. En Algérie, c'est la classification de Quézel et Santa (1962) qui est utilisée.

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Famille</b>	Fabaceae
<b>Sous Famille</b>	Papilionaceae
<b>Tribu</b>	Hedysareae
<b>Genre</b>	<i>Scorpiurus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Scorpiurus vermiculatus</i> L. <i>Scorpiurus muricatus</i> L.: espèce polymorphe dans laquelle on rencontre trois sous espèces: ssp <i>sulcatus</i> ssp <i>subvillosum</i> ssp <i>eumuricatus</i>

#### **2.2.2. Présentation de l'espèce *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus***

*Scorpiurus muricatus* subsp. *sulcatus* présente des tiges qui s'étalent radialement sur le sol à partir du noeud des cotylédons, (Dormer, 1945) et dépasse rarement 60-65 cm (Figure2). Le nombre de ramifications ainsi formées (3-10, parfois plus) varie considérablement en fonction de la fertilité des sols et la vigueur de la plante. Au cours de la croissance végétative, Les feuilles sont simples, solitaires ou opposées, de forme oblongue, mesurent 1-2 cm de large, 4-7 cm de long, avec stipules longues et pointues. L'inflorescence est formée de 2 à 5 petites fleurs de couleur jaune qui vire au rouge à maturité (Figure2). Les gousses sont plus ou moins resserrées entre les segments et fortement sillonnées, régulièrement contournées-enroulées, à spires toutes dans un même plan horizontal, à côtes intérieures lisses dont la couleur varie de jaune paille au violet foncé dans la partie exposée au soleil (Abbate *et al.*, 2010) (Figure 2). Les graines sont peu atténues aux deux bouts de couleur jaune, jaune clair ou brun à brun foncé (Figure 2) (Maymone *et al.*, 1953; Tutin *et al.*, 1968 ; Dominguez et Galiano, 1974b).



**Figure 2 :** Aspect de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* (a : Plante ; b : Fleur ; c : Gousse ; d : Graines)

### ***Ecologie***

En Algérie, *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* est fréquente et présente une adaptabilité très élevée aux différents facteurs écologiques, puisqu'elle se rencontre sur les milieux les plus variés de part la pluviométrie, l'altitude, la teneur en calcaire, l'exposition, etc. (Bensalem *et al.*, 1990). Cette espèce a une large amplitude écologique (M'hamed Bouzina *et al.*, 2005), dans ce sens, Abdelguerfi (1976) l'a comparée à *Medicago polymorpha*, espèce présente sur une large gamme de microclimats et de types de sols.

### ***Intérêts***

*Scorpiurus muricatus* ssp *sulcatus* est une espèce qui a une action prometteuse sur les pâturages, grâce à sa teneur élevée en protéines et qualité fourragère (Licitra *et al.*, 1997), ainsi que ses effets de palatabilité et de galactagogue (Di Giorgio *et al.*, 2009). Cette plante produit une masse végétative importante arrivant jusqu'à 100 cm de recouvrement et un puissant système racinaire pivotant qui permet une bonne fixation du sol et le protège des érosions

(Younsi, 1991). Beale *et al.* (1991) ont affirmé que c'est une espèce qui produit beaucoup de gousses avec un nombre important de graines (22,9 kg/ha).

Contrairement à sa distribution, la nodulation et les bactéries associées à *Scorpiurus muricatus* sont très peu étudiée ; à notre connaissance, à travers le monde, il n'existe que quelques rapports sur les bactéries associées à *S. muricatus* et aucune étude sur la région du sud de la Méditerranée. Safronova *et al.* (2004) sont les seuls chercheurs qui ont montré que 6 souches isolées des nodules de racines de *S. muricatus* provenant du sud d'Italie (Sardaigne) ont pu noduler leur plante hôte (*S. muricatus*) ainsi que *Lotus cytisoides*, *L. ornithopodiooides*, et *Ornithopus compressus*. Tandis que Muresu *et al.* (2008) n'ont pu isoler que six souches non symbiotique à partir des nodules de racines de *Scorpiurus muricatus*. Néanmoins le séquençage direct du contenu des nodules de *Scorpiurus muricatus* a révélé la présence de bactéries appartenant au genre *Mesorhizobium*, mais sans pouvoir les isoler et les étudier *in vitro*.

### **3. Les rhizobia**

Rhizobia est le nom générique pour une large gamme de bactéries qui ont la capacité de former des nodules sur les racines ou les tiges des légumineuses, dans le but de fixer l'azote atmosphérique (Sprent, 2001 ; Lindström et Martinez-Romero, 2005). Tous les rhizobia caractérisés sont des bactéries aérobies Gram- non sporulantes (Vincent, 1970 ; Bekki, 1983 ; Jordan, 1984), constituant 0,1 à 8% de la flore bactérienne totale du sol (Bottomley, 1992 ; Schortemeyer *et al.*, 1997). Ils sont distribués dans les classes *Alphaproteobacterie* et *Betaproteobacterie* du phylum *Proteobacterie* (Garrity *et al.*, 2005; Sprent, 2008). Jusqu'à 1982, les rhizobia ont été regroupés dans un seul genre *Rhizobium* alors qu'avec les nouvelles techniques utilisées dans la caractérisation des souches et l'augmentation du nombre de genres de légumineuses étudiées, les espèces décrites sont réparties en 23 genres (de Lajudie et Young, 2017) (Figure 3).

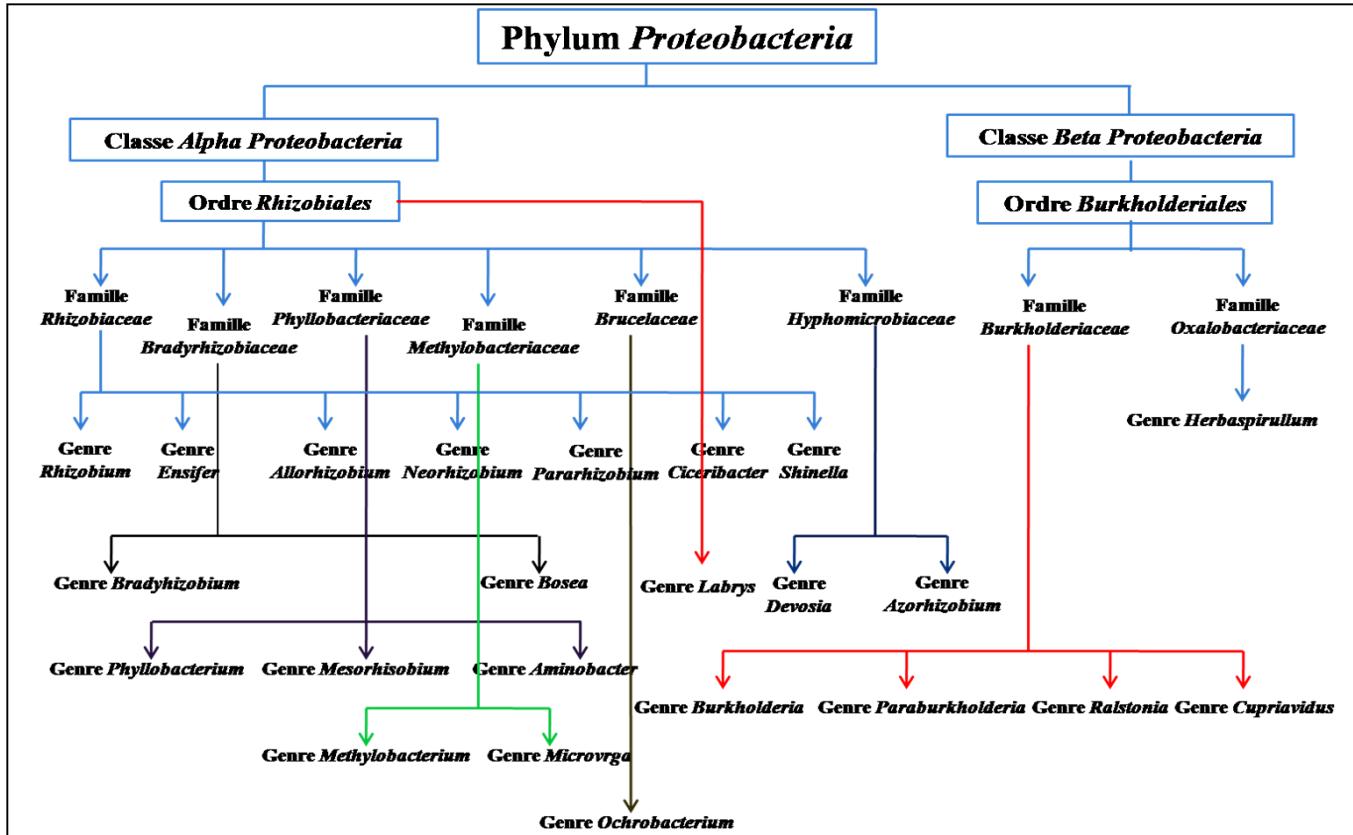


Figure 3: Diagramme schématique pour expliquer la taxonomie des rhizobia (de Lajudie et Young, 2017)

### 3.1. Taxonomie des Rhizobia

Les Rhizobia ont été classés pour la première fois par Beijerinck (1888) et Frank (1889), où ils ont regroupé toutes les bactéries isolées de nodosités de racines de légumineuses dans le genre *Rhizobium*. En se basant sur la spécificité de l'espèce bactérienne par rapport à la plante hôte, Fred *et al.* (1932) ont pu identifier six groupes d'inoculation croisée, *Rhizobium leguminosarum* pour *Lathyrus, Pisum, Vicia* et *Lens* ; *R. trifolii* pour *Trifolium* ; *R. phaseoli* pour *Phaseolus* ; *R. meliloti* pour *Glycine max* et *R. lupini* pour *Lupinus*. Les rhizobia qui n'ont pas pu être classés par groupe d'inoculation croisée ont été désignés par *Rhizobium* sp. Cependant, il est apparu rapidement que le concept de groupe d'inoculation croisée n'était pas utile pour classer les espèces de rhizobia en raison de la possibilité d'un transfert naturel de plasmides symbiotiques (pSym) parmi les souches bactériennes dans le sol, ce qui explique la présence chez une même légumineuse des rhizobiums génétiquement très distants (Johnston *et al.*, 1978 ; Brewin *et al.*, 1980b ; Prakash *et al.*, 1981 ; Mergaert *et al.*, 1997 ; Sullivan et Ronson, 1998 ; Finan, 2002 ; Nakatsukasa *et al.*, 2008).

En 1982, Jordan partage les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote en deux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, en se basant sur la vitesse de croissance sur milieu empirique enrichi en extrait de levure et en mannitol. Le genre *Rhizobium* regroupait les espèces à croissance rapide acidifiantes du milieu: *R. leguminosarum* avec trois biovar (*viciae*, *trifoli*, *phasioli*), *R. meliloti* et *R. loti* associées à la luzerne, au trèfle, au haricot et au pois. Tandis que le genre *Bradyrhizobium* regroupait les bactéries à croissance lente présentant un temps de génération supérieur à 6 heures et représenté par une seule espèce *B. japonicum*, considérés comme spécifiques aux plantes des genres : *Glycine*, *Lupinus*, *Ornithopus* et *Vigna*.

L'emplacement des gènes symbiotiques a également été utilisé comme un outil génotypique pour différencier entre les rhizobia à croissance rapide et à croissance lente. En effet, les gènes symbiotiques sont généralement localisés sur le chromosome pour les souches de *Bradyrhizobium* et sur les plasmides pour les souches de *Rhizobium*. Mais, une récente étude a montré que chez une souche de *Bradyrhizobium* DOA9, les gènes symbiotiques sont portés sur un mégaplasmide (Teamtisong *et al.*, 2013).

La taxonomie des rhizobia s'est considérablement modifiée après que Woese (1987) ait démontré l'utilité du gène codant pour l'ARNr 16S comme marqueur moléculaire pour évaluer la phylogénie et la taxonomie des procaryotes. La première séquence partielle du gène codant pour l'ARNr 16S a été publiée par Young *et al.* (1991) pour la souche *Rhizobium* BTAl1. C'est ainsi que Graham *et al.* (1991) ; Vandamme *et al.* (1996) proposèrent l'utilisation de la taxonomie polyphasique pour définir les nouveaux groupes. L'approche polyphasique nouvellement adoptée tient compte d'un maximum d'informations sur les caractéristiques phénotypiques, génotypiques et phylogéniques des différentes bactéries en se basant notamment sur un ensemble de techniques aux pouvoirs discriminatifs très variables. Cette approche se base sur l'utilisation des quatre caractéristiques suivantes:

- Les similitudes phénotypiques et / ou morphologiques.
- La similitude du génome.
- Le contenu de G (guanine) + C (cytosine) en pourcentage (coefficients de Chargaff).
- La similarité de séquence du gène codant pour l'ARNr 16S.

Le sous-comité international de la taxonomie de *Rhizobium* et *Agrobacterium* (ICSP) (<http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy>) est chargé d'organiser et de contrôler les critères utilisés dans la description des nouvelles espèces nodulant les légumineuses (Lindström et Young, 2011).

Les études basées sur des séquences de marqueurs moléculaires ont représenté une avancée significative dans la taxonomie rhizobienne et sont incluses dans la plupart des études. La combinaison de ces techniques a révélé à la fois une grande diversité génétique au sein de groupes bactériens qui avaient été considérés comme homogènes et des relations étroites entre des groupes considérés très éloignés. Cependant la structure conservée de la séquence de gène de l'ARNr 16S limite la puissance de différenciation parmi les espèces de rhizobia les plus proches (Ramirez-Bahena *et al.*, 2008). De ce fait, d'autres régions d'ADN ont été proposées comme marqueurs phylogénétiques alternatifs (Stackebrandt *et al.*, 2002) ayant un taux d'évolution plus rapide que l'ARNr 16S mais qui sont suffisamment conservés pour conserver l'information génétique, telles que l'espace intergénique de l'ARNr 16S-23S et les gènes appelés «gènes de ménage» situés sur le chromosome.

Dans le cas d'espèces hautement apparentées, où l'analyse du gène de l'ARNr 16S présente une faible résolution, l'utilisation de MLSA (Multilocus sequence analysis) peut discriminer correctement les espèces des sous-espèces (Ruppitsch *et al.*, 2015). En effet, les chercheurs suggèrent d'utiliser des gènes de ménage chromosomiques, tels que *atpD*, *recA* et *glnII* pour aider à la spéciation des espèces les plus proches de *R. leguminosarum* sv. *trifolii*, *R. leguminosarum* sv. *phaseoli* et *R. leguminosarum* sv. *viceae*. La phylogénie des gènes de ménage *recA* et *atpD* a d'abord été utilisée par Gaunt *et al.* (2001) et le gène *glnII* par Turner et Young (2000) ; Stepkowski *et al.* (2005); et Vinuesa *et al.* (2005) pour délimiter la phylogénie du rhizobium et des bactéries apparentées avec plus de confiance que ce qui était possible avec l'ADNr 16S seul. L'analyse des séquences multilocus (MLSA) a également été utilisé pour différencier et identifier de nouveaux taxons rhizobiens (Ribeiro *et al.*, 2009).

L'identité nucléotidique moyenne (the Average Nucleotide Identity ; ANI) est la mesure de la similitude génomique des nucléotides entre les régions codantes de 2 génomes de bactéries. Elle a été l'un des premiers résultats de l'application de la génomique dans la taxonomie. Selon Goris *et al.* (2007) et Scortichini *et al.* (2013), cette technique peut être utilisée dans la description des nouvelles espèces et remplacer l'hybridation ADN-ADN présentant beaucoup de limite ; on estime que les valeurs d'identité nucléotidique moyenne de 95 à 96% pourraient représenter la valeur 70% de l'hybridation d'ADN.

En plus des méthodes biochimiques utilisées pour expliquer les différences entre les espèces, telles que la composition de polysaccharides extra-cellulaires (Huber *et al.*, 1984), des profils d'acides gras (Tighe *et al.*, 2000), les méthodes de typage à base d'ADN (empreintes

génétiques) ont été adoptées dans les années 90. Elles sont principalement utilisées pour remplacer ou compléter les méthodes classiques de sous-typage phénotypique (Vandamme et al., 1996). Les techniques telles que le polymorphisme de la longueur du fragment de restriction (RFLP), le polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés (AFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) et Amplification des séquences répétitives (rep-PCR) ont été largement utilisées (Nick, 1998). Le principe de cette dernière méthode est l'utilisation d'amorces consensuelles (REP, ERIC et BOX) complémentaires à des séquences d'ADN très conservées et répétées qui sont présentes en plusieurs copies dans le génome de la plupart des bactéries Gram- et dans certaines bactéries Gram+.

La REP, ERIC et BOX-PCR sont des méthodes simples, rapides et fiables possédant le même pouvoir discriminatif (Laguerre et al., 1997). Un simple gel d'agarose peut permettre de séparer les fragments d'ADN, d'avoir une empreinte génétique spécifique à chaque souche. Cette méthode peut donner de bons profils analysables même avec un petit nombre de cellules mises en suspension dans le milieu réactionnel (de Bruijn, 1992). Ishii et Sadowsky (2009) ont rapporté que la rep-PCR est un outil puissant pour les études sur l'évolution et l'écologie microbienne.

### **3.2. Les nouvelles modifications dans la classification des rhizobia**

La découverte de nouvelles techniques taxonomique a permis de reclasser les espèces des rhizobia dans de nouveaux genres. La récente classification est publiée sur le site : [www.bacterio.net](http://www.bacterio.net).

#### **Le "Complexe *Rhizobium galegae*"**

L'espèce *Rhizobium galegae* a été décrite par Lindström (1989) pour un groupe de rhizobia isolé des nodules de *Galega orientalis* Lam. et *G. officinalis* L. en Finlande, en Nouvelle-Zélande, en Russie et en Angleterre. Ayant deux symbiovars, *orientalis* et *officinalis*. La position phylogénétique de *Rhizobium galegae* n'a pas été résolue depuis plusieurs décennies. Des études phylogénétiques antérieures l'ont regroupé avec *Rhizobium* ou *Agrobacterium*. Dans certaines études phylogénétiques, il a formé un propre clade distinct (Turner et Young, 2000; Young et al., 2001 ; Eardly et al., 2005 ; Martens et al., 2008). Par exemple, Jarvis et al. (1996) ont rapporté que *R. galegae* formait un groupe génétiquement distinct des autres espèces de *Rhizobium* sur la base de l'ARNr 16S. *R. galegae* a été placé près du genre *Agrobacterium* à partir de gènes d'ARNr 16S et 23S et de la composition d'acide gras

cellulaire, alors qu'il était regroupé avec *Rhizobium* sur la base de phylogénie du gène *DnaK* (Jarvis *et al.*, 1996; Eardly *et al.*, 2005). L'espèce a également formé un groupe distinct dans l'arbre de gène *glnA* (Turner et Young, 2001) et dans l'ADNr 16S de 160 souches d'alphaproteobactéries (Lindström *et al.*, 2015), récemment Mousavi *et al.* (2014) ont proposé le genre *Neorhizobium* pour regrouper le complexe *R. galegae* et certaines espèces de *Rhizobium* et *Agrobacterium*.

### **Le genre *Burkholderia***

Les souches de *Burkholderia* (*Burkholderiaceae*) ont été reconnues comme des bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR / PGPB) ou des agents de lutte biologique (Agents Bio Contrôle, ABC) (Raupach et Kloepfer, 1998). Cependant Moulin *et al.* (2001) ont démontré que les espèces de *Burkholderia* nodulent des légumineuses appartenant à la fois aux papilionidés et aux mimosoidés et fixent l'azote comme bactérioïdes dans les cellules nodulaires. Ces bactéries favorisent également la croissance de plantes agronomiquement importantes, telles que *Phaseolus vulgaris* (haricots communs) et *Vigna unguiculata* (le niébé), en produisant ou en mimant des phytohormones, en fournissant des nutriments (Barka *et al.*, 2000; Sessitsch *et al.*, 2005 ; Poupin *et al.*, 2013) et en agissant comme agents de lutte biologique (Barka *et al.*, 2000 ; Thakkar et Patel, 2015). Une division a été proposée de telle sorte que le groupe pathogène resterait dans le genre *Burkholderia* et un groupe contenant des espèces symbiotiques et environnementales serait transféré dans un nouveau genre appelé *Caballeronia* (Gyaneshwar *et al.*, 2011 ; Estrada-de los Santos *et al.*, 2013 ; Estrada-de los Santos *et al.*, 2016). Cependant, plusieurs de ces espèces ont plutôt été placées dans un nouveau genre appelé *Paraburkholderia* sur la base de séquences conservées (CSI) ainsi que des différences dans la teneur en G + C (Sawana *et al.*, 2014). À la suite de la scission entre *Burkholderia* et *Paraburkholderia*, Dobritsa *et al.* (2016) ont reclassé les espèces de *Burkholderia* qui étaient phylogénétiquement liées aux souches environnementales et symbiotiques en tant que *Paraburkholderia*, puis ont proposé *Caballeronia* comme nom de genre pour ce groupe nouvellement combiné (Dobritsa et Samadpour, 2016). Mais, finalement Le sous-comité international de la taxonomie de *Rhizobium* et *Agrobacterium* (ICSP) propose de garder le nom de *Paraburkholderia* (de Lajudie et Young, 2017).

### **4. La symbiose rhizobia– légumineuse**

La symbiose entre les rhizobia et les légumineuses représente à l'heure actuelle l'association la plus étudiée et la mieux connue, autant au niveau écologique et agronomique que moléculaire,

avec le séquençage des deux partenaires symbiotiques (Young et Haukka *et al.*, 1996 ; Lafay et Burdon, 1998 ; Wojciechowski, 2003). En effet, cette association a fait l'objet de plusieurs études depuis plus d'un siècle. En 1866, Woronin avait signalé pour la première fois la présence de microorganismes ressemblant aux bactéries dans les nodosités de *Lupinus mutabilis*. Hellriegel et Wilfarth (1888) ont montré que la formation des nodosités est le résultat d'une infection externe chez les espèces *Lupinus*, *Phaseolus*, *Ornithopus*, *Vicia*, et *Trifolium*. Cependant, la première preuve que les bactéries sont à l'origine de la formation des nodosités était fournie par Beyerinck (1888, 1890), en préparant des cultures pures d'organismes provenant des nodosités de *Vicia faba* et en infectant avec ces mêmes cultures des plants de fève cultivées sur un sol stérile.

En conditions limitantes en azote combiné accessible à la plante, les rhizobia induisent la formation de nodules au niveau racinaire ou caulinaire des légumineuses. Ces nodules sont de véritables organes d'échanges métaboliques entre les bactéries et la plante (Oke et Long, 1999 ; Prell et Poole, 2006) et représentent pour les rhizobia une niche écologique où ils peuvent se multiplier en grand nombre avant de se différencier en bactéroïdes sans être en compétition avec les autres microorganismes du sol (Verma, 1992). Les bactéroïdes, représentent la forme sous laquelle les rhizobia fixent l'azote de l'air et le transforment via le complexe enzymatique de la nitrogénase en ammonium, qu'ils échangent avec la plante contre des photosynthétats. La plante bénéficie ainsi de la possibilité de s'affranchir du manque d'azote dans le sol (Brewin, 1991). Lors de la différenciation, des modifications profondes du métabolisme des rhizobiums sont observées, accompagnées d'un changement marqué de la forme et de la taille des cellules bactériennes (Haag *et al.*, 2013). Trois morphotypes distincts de bactéroïdes sont observés chez différentes espèces de légumineuses (Oono *et al.*, 2010 ; Bonaldi *et al.*, 2011 ; Kondorosi *et al.*, 2013) : (1) bactéroïdes allongés ou (E-morphotype) décrits chez les espèces des genres *Medicago*, *Pisum* et *Vicia* et quelques espèces d'*Aeschynomene* ; (2) bactéroïdes sphériques élargis (S-morphotype) rencontrés chez certaines espèces du clade Dalbergioïde (comme *Aeschynomene indica*, *Aeschynomene evenia* et *Arachis hypogaea*); et (3) des bactéroïdes non modifiés (morphotype U), qui présentent une morphologie en forme de bâtonnet similaire aux bactéries libres vivant dans les légumineuses phaséoloïdes ou robinoïdes (*Phaseolus*, *Vigna*, *Lotus*, *Glycine* et *Sesbania* spp.). Toutefois, il a été reporté que c'est la plante hôte qui régit le morphotype du bactéroïde (Sen et Weaver, 1984, Mergaert *et al.*, 2006, Bonaldi *et al.*, 2011).

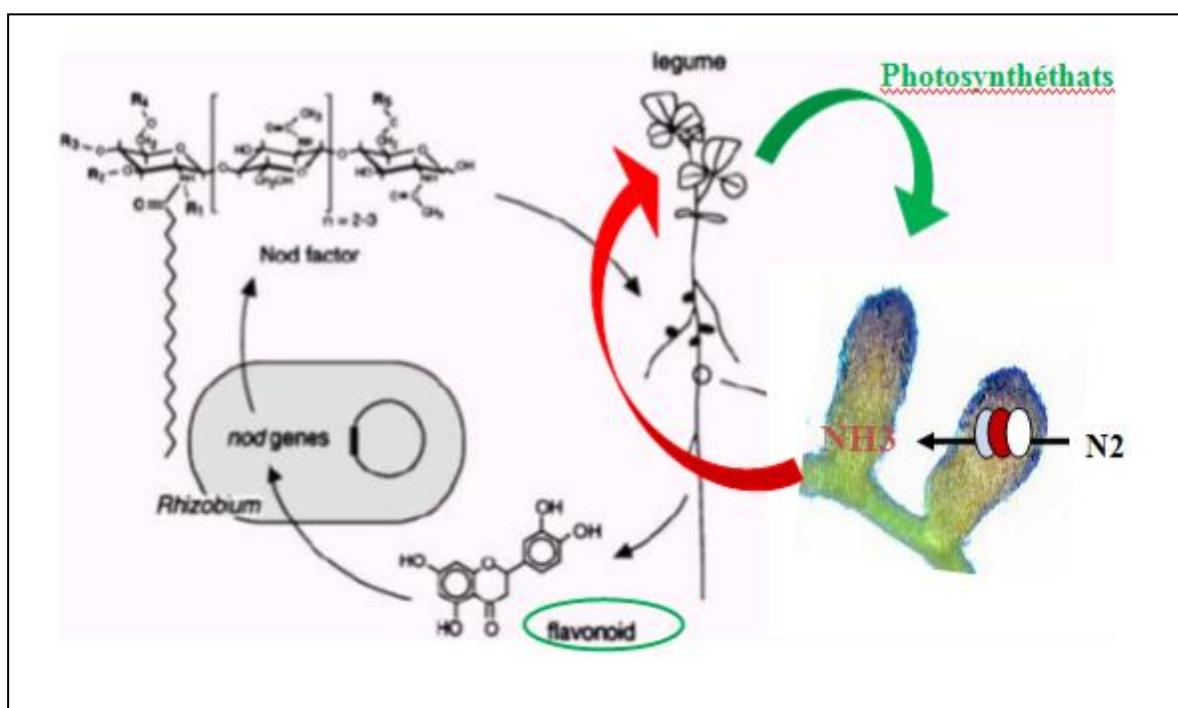
Présents à l'état libre dans la rhizosphère, les rhizobia répondent par un chimiotactisme positif aux exsudats racinaires produits par la plante comme les acides aminés, les sucres, les acides dicarboxyliques et des composés plus spécifiques : les flavonoïdes (Van Rhijn et Vanderleyden, 1995; Bais *et al.*, 2006; Shaw *et al.*, 2006 ; Sugiyama *et al.*, 2007 ; Hassan et Mathesius, 2012). Le catabolisme de ces substrats permet aux rhizobiums de proliférer autour des racines de la plante (Hynes et O'Connell, 1990 ; Boivin *et al.*, 1991; Goldman *et al.*, 1991). Il va alors s'établir entre la bactérie et la plante-hôte un dialogue moléculaire (Figure 4). En fait, la formation de nodosités survient quand les rhizobiums pénètrent leurs hôtes d'une manière strictement coordonnée et contrôlée. Les exigences génétiques de la reconnaissance spécifique sont partagées entre le rhizobium et la plante hôte. Chacun des deux partenaires possède des gènes qui ne sont exprimés que lors de la présence de l'autre (Djordjevic *et al.*, 1987).

#### **4.1. Le dialogue moléculaire établi entre les rhizobia et la plante hôte au cours de la nodulation**

Parmi les 4000 flavonoïdes secrétés par les plantes vasculaires, seules quelques classes particulières de flavonoïdes sont impliquées dans la spécificité d'hôte chez les légumineuses (Aoki *et al.*, 2000) tel que la sous-classe des isoflavonoïdes. Cette dernière est restreinte à la sous-famille des Papilioïdeae (Dixon *et al.*, 2002). Les flavonoïdes agissent comme des chimio-attractants mais surtout comme des inducteurs des gènes de nodulation de *Rhizobium* (Oldroyd, 2013). En effet, ils sont reconnus spécifiquement par des protéines bactériennes régulatrices (*nodD*). La protéine *nodD* fixée sur l'ADN bactérien a plus d'affinité pour le flavonoïde, alors l'association de la protéine *nodD* avec les flavonoïdes libère cet ADN et permet la transcription des gènes de la nodulation (gènes *nod*, *noe* et *nol* collectivement appelés gènes *nod*) par l'intermédiaire de boîtes régulatrices (*nodbox*) situées en amont des gènes *nod*. Ces gènes sont impliqués dans le contrôle des différentes étapes de l'établissement de la symbiose (Relić *et al.*, 1994; Schultze and Kondorosi, 1998). Ainsi, la reconnaissance des flavonoïdes est le premier niveau de spécificité. Les produits des gènes *nod*, *noe* et *nol* sont impliqués dans la biosynthèse de lipochitooligosaccharides appelés facteurs Nod (Figure 4). Les gènes *nod* peuvent être classés en deux familles : les gènes *nod* communs, présents dans le génome de tous les rhizobia impliqués dans la synthèse du squelette de base des facteurs Nod, et les gènes *nod* spécifiques codant pour des enzymes impliquées dans l'ajout de diverses substitutions chimiques (fucose, carbamate, méthyle, arabinose) autour du squelette de base des facteurs Nod, dont la nature et la présence varient d'une souche à l'autre (Downie, 1998).

Cette grande variation structurale des facteurs Nod constitue le second niveau de spécificité, la réponse des plantes à ces facteurs étant variable selon leur structure (Denarie *et al.*, 1992; Bec-Ferte *et al.*, 1994; Lorquin *et al.*, 1997; Fernández-López *et al.*, 1998; Yang *et al.* 1999; Spaink, 2000). Cependant des études récentes sur des souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques formant des nodosités caulaires et racinaires sur *Aeschynomene* ont montré qu'il y aurait une autre voie de signalisation dans le processus de la nodulation que celle impliquant les gènes *nod* communs car certaines de ces bactéries n'en possèdent pas (Giraud *et al.*, 2007).

Il semblerait que d'autres facteurs influencent l'établissement de la symbiose, à la fois pendant l'infection mais surtout au cours de ses étapes plus tardives (Broughton et Perret, 1999; Spaink, 2000; Stougaard, 2000). Les polysaccharides de surface, qui s'accumulent pour former un complexe macromoléculaire autour de la bactérie jouent un rôle important dans l'interaction (bactérie-plante) et constitue un autre niveau de spécificité. On distingue les exopolysaccharides (EPS), les lipopolysaccharides (LPS), les polysaccharides capsulaires (CPS), et les  $\beta$  glucanes cycliques. L'utilisation de mutants a montré que plusieurs polyssaccharides de surface sont impliqués dans l'efficacité de l'invasion du nodule (Pellock *et al.*, 2000). De plus, les EPS interviennent dans l'initiation et l'elongation des cordons d'infection (Cheng et Walker, 1998) alors que les LPS jouent aussi un rôle dans la suppression des réactions de défenses de la plante au cours de l'infection (Tellstrom *et al.*, 2007).



**Figure4 :** Le dialogue moléculaire au cours de la nodulation d'après Rosenberg (1997).

#### **4.2. Les différents modes d'infection**

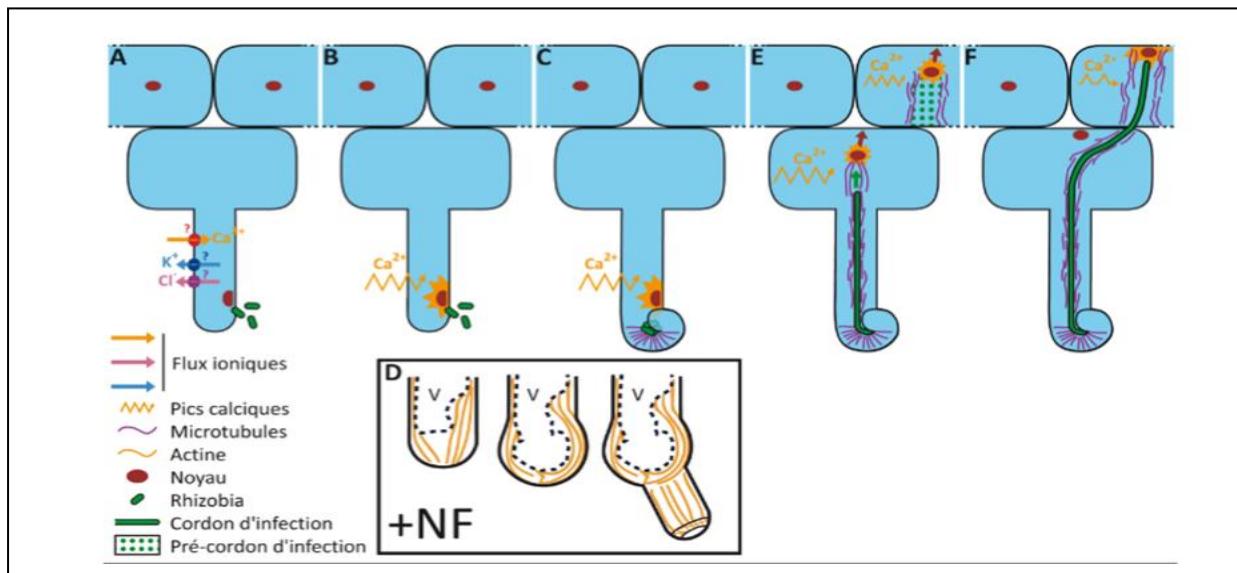
Les racines des légumineuses peuvent être infectées par les rhizobia via trois mécanismes distincts :

Le premier mode d'infection le plus courant et le plus étudié a lieu à travers des poils absorbants (Figure 5). Il est observé chez la luzerne/*Sinorhizobium meliloti*, le soja/*Bradyrhizobium japonicum*, ou le pois/*Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* (Gage, 2004). L'infection commence juste après que le rhizobium s'adsorbe par chimiotactisme au poil racinaire. Les rhizobia sécrètent des facteurs Nod qui fonctionnent comme des clés, permettant aux bactéries de pénétrer dans les racines à travers les poils absorbants. Ces facteurs se lient aux récepteurs présents sur les membranes des poils absorbants. Cette reconnaissance induit une augmentation rapide de la concentration du calcium dans les poils absorbants (après quelques minutes) ce qui provoque le gonflement des extrémités du poil absorbant et sa courbure autour des rhizobiums en formant une sorte de boucle tout autour de la bactérie. Les rhizobiums injectent ensuite les protéines d'infection dans les poils absorbants. En réponse, la paroi cellulaire des poils des racines se dégrade et la membrane plasmique forme un filament tubulaire que les rhizobiums empruntent ; connue sous le nom du cordon d'infection (Hirsch, 1992). Les rhizobiums se déplacent à travers ce cordon d'infection dans le cortex racinaire et la pointe du cordon d'infection fusionne avec la membrane plasmique des cellules du cortex. Pendant ce temps, les plantes produisent des protéines appelées nodulines qui favorisent le développement des nodules. Dans les 18 heures qui suivent l'infection initiale, les cellules du cortex racinaire subissent des divisions rapides pour la formation d'un primordium nodulaire (Vance *et al.*, 1998). Le cordon d'infection atteint le primordium nodulaire et y relâche les bactéries par le phénomène d'entocytose (Bassett *et al.*, 1977). Les bactéries se trouvent alors entourées par une membrane qui dérive de l'hôte ; la membrane péri-bactéroidale qui protège les bactéries des molécules de défenses de l'hôte. Dans ces unités fermées appelées symbiosomes (Roth et Stacey, 1989), les bactéries commencent à se différencier en bactéroïdes.

Le deuxième mode d'infection se fait par voie intercellulaire connu sous le nom 'crack entry' (Sprent et Raven, 1992 ; Sprent, 2002 ; Okubo *et al.*, 2012; Bianco, 2014) décrivant l'infection via des blessures ou des ruptures dans le tissus de la plante, à l'émergence des poils racinaires latéraux, ou parfois directement à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme (Pawlowski et Bisseling, 1996). Ce mode d'infection est rencontré chez de nombreuses légumineuses, d'origine essentiellement tropicale ou sub-tropicale comme l'espèce *Arachis*

*hypogaea* (Chandler, 1978), les espèces du genre *Stylosanthes* (Chandler *et al.*, 1982) et certaines espèce du genre *Aeschynomene* (Alazard et Duhoux, 1990), où aucun fil d'infection n'est observé et les rhizobiums intercellulaires envahissent les cellules corticales à travers des parois cellulaires structurellement modifiées. Toutefois chez les espèce appartenant aux genre *Sesbania* (Rana et Krishnan, 1995; Goormachtig *et al.*, 2004 ) et *Aeschynomene* (Giraud *et al.* 2000). *Neptunia* (Subba-Rao *et al.*, 1995), l'infection commence lorsque les bactéries pénètrent directement dans le cortex externe au niveau des émergences de racines et colonisent les espaces intercellulaires entre les cellules corticales et conduit à la formation d'une poche d'infection, à partir de laquelle des cordons d'infection intercellulaires et intracellulaires guident les bactéries vers les cellules du primordium nodulaires formés au niveau du cortex interne moyen où elles sont libérées (Goormachtig *et al.*, 2004a). Selon Sprent *et al.* (2013), La structure interne des nodules formés par cette voie est très différente de celles de ceux formés après une infection par les poils absorbants. Le modèle 'crack entry' est aussi couramment rencontré chez les bactéries endophytes (Hurek et Reinhold-Hurek, 2003; Complant *et al.*, 2005; Perrine-Walker *et al.*, 2007).

Le troisième mode d'infection est observé chez *Mimosa scabrella*, *Lupinus* spp et *Listia* spp, Les rhizobia pénètrent directement entre les cellules épidermiques non endommagées en dissolvant la lamelle moyenne des parois cellulaires radiales et envahissent les cellules hôtes à travers des structures semblables à des cordonss d'infection (de Faria *et al.*, 1988 ; Sprent, 1989 ; González-Sama *et al.*, 2004 ; Ardley *et al.*, 2013 ; Czernic *et al.*, 2015).



**Figure 5 :** Schéma récapitulatif décrivant les différents stades du processus d'infection des poils racinaires par les rhizobia.

**A :** Déclenchement de divers flux ioniques dans les poils racinaires en présence de rhizobia. Les acteurs moléculaires responsables de ces flux sont encore inconnus. **B :** Déclenchement d'oscillations calciques dans les poils racinaires. **C :** Phase de déformation du poil racinaire en crosse de berger. **D :** Un traitement aux NFs entraîne une déformation partielle et une reprise de croissance polarisée du poil racinaire. **V :** vacuole. **E :** Phase de progression du cordon d'infection dans le poil racinaire et de mise en place du pré-cordon d'infection dans une cellule corticale adjacente. **F :** Phase de progression du cordon d'infection dans le pré-cordon d'infection de la cellule corticale adjacente au poil racinaire infecté.

#### 4.3. Les formes de nodules formés sur les racines des légumineuses

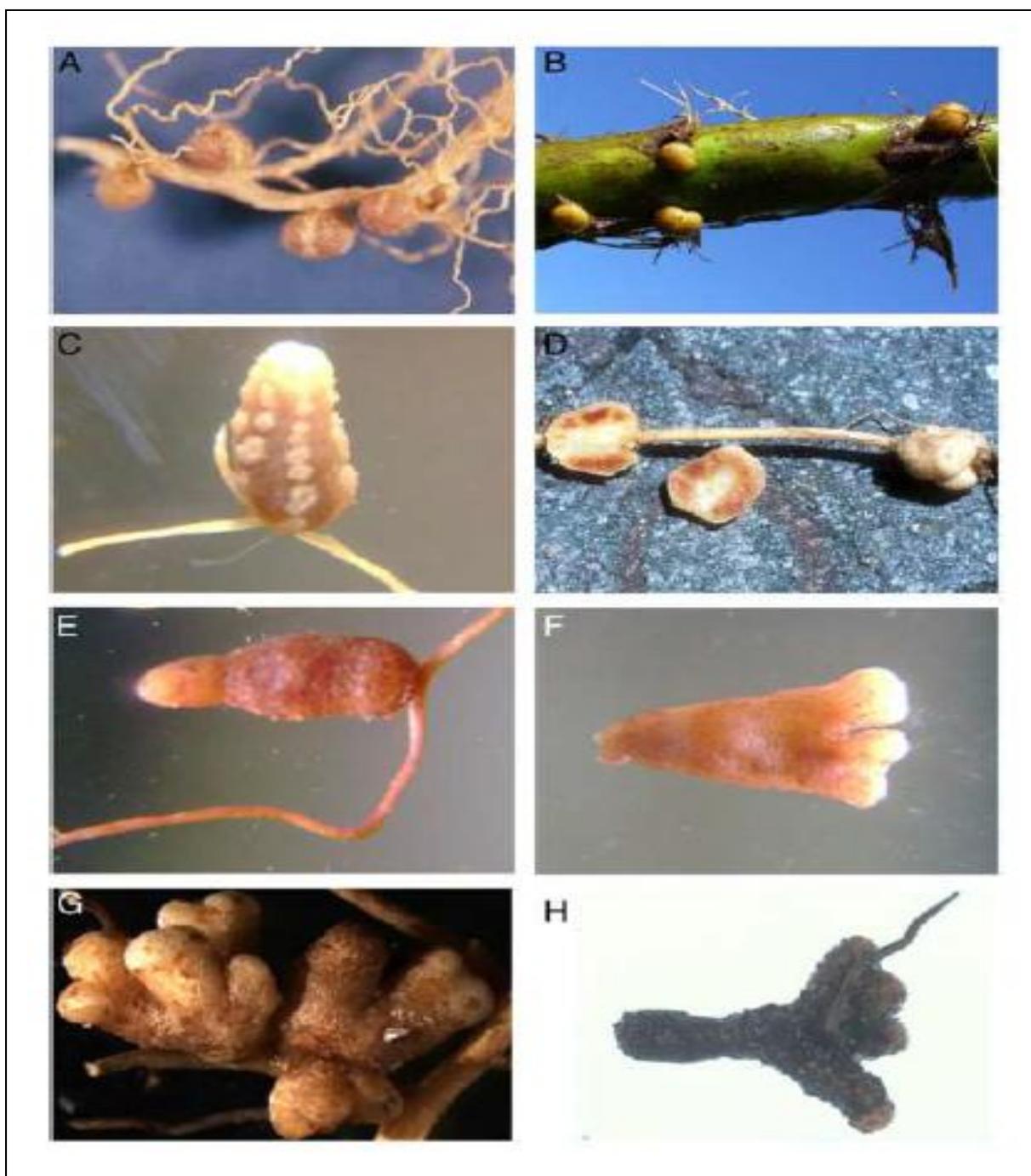
En fonction de la nature transitoire et persistante de la prolifération des cellules de l'hôte, les nodules des légumineuses peuvent avoir deux types de structure de nodules : déterminé ou indéterminé (Terpolilli *et al.*, 2012 ; Kondorosi *et al.*, 2013 ; Sprent *et al.*, 2013). Les nodules à croissance indéterminée maintiennent le tissu méristématique, tandis que les nodules déterminés ont un méristème transitoire, de ce fait, les nodules indéterminés prennent une forme allongée, au contraire des déterminés qui présentent une forme sphérique, où toutes les cellules centrales sont plus ou moins dans le même stade de développement. Le type de nodule dépend de la plante hôte, les espèces de légumineuses qui peuvent produire des nodules déterminés et indéterminés sont rares (Fernández-López *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 2014). Sprent *et al.* (2013) (Figure 6) ont rapporté que tous les genres examinés chez les Caesalpinoideae et Mimoisoideae présentent des nodules indéterminés. Cependant dans les Papilionoideae: les Desmodieae, Phaseoleae, Psoraleae et certains membres des Loteae montrent des nodules

déterminés appelés "desmodioïdes", de même les Dalbergieae montrent des nodules déterminés de type "aeschynoménoïde" (Sprent *et al.*, 2013). Les nodules desmodioïdes ont des lenticelles, et les tissus "infectés" de rhizobia à l'intérieur de ceux-ci contiennent également des cellules non infectées. Les nodules aeschynoménoïdes n'ont pas de lenticelles, ont un tissu infecté uniforme et sont toujours associés à des racines latérales.

Des études ont révélé que les espèces appartenant aux Desmodieae, Phaseoleae et Psoraleae ont des uréides comme principal composé contenant de l'azote provenant des nodules, alors que les espèces de Dalbergieae et Loteae transportent des amides / acides aminés (Sprent *et al.*, 2013).

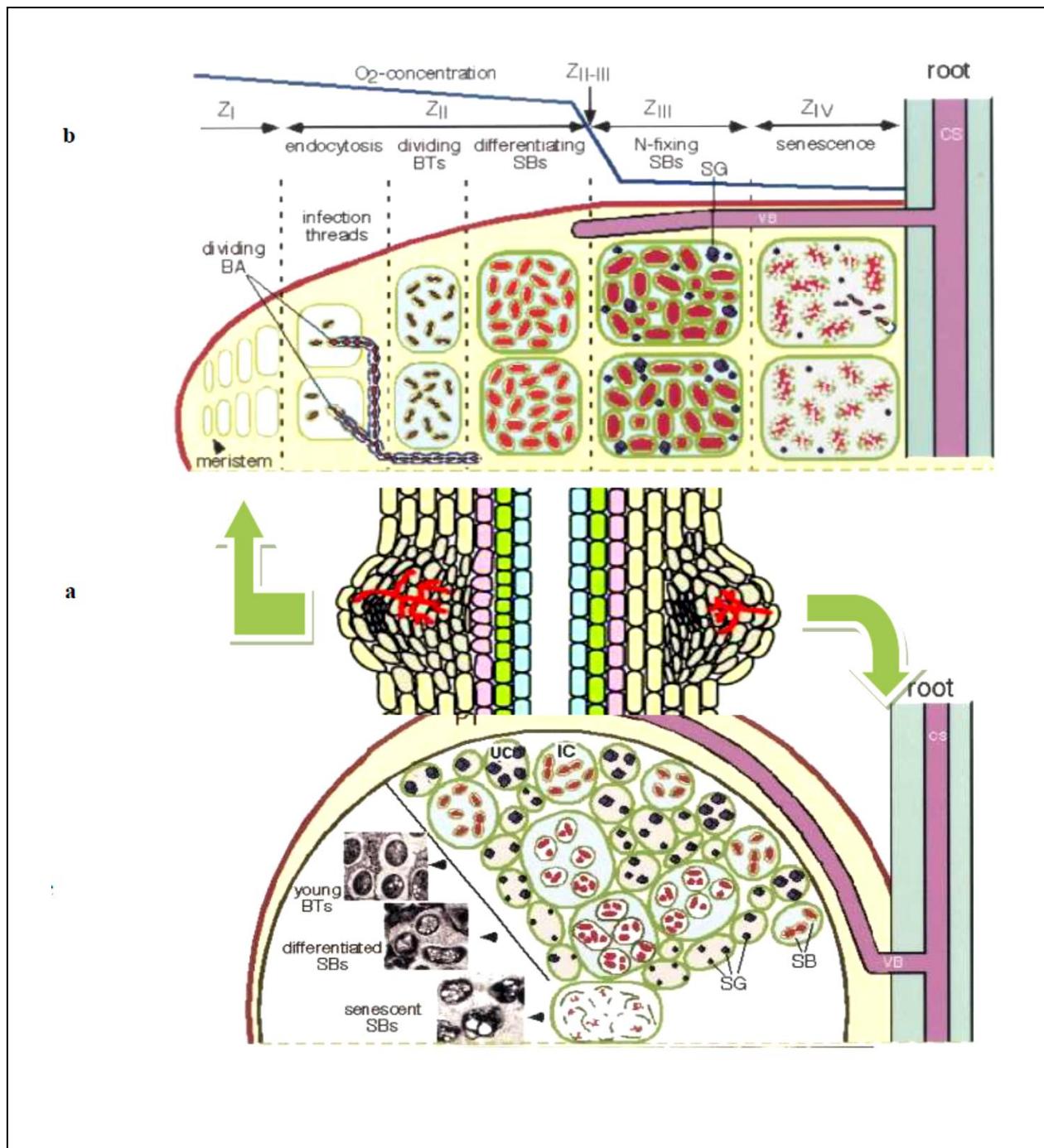
Les nodules indéterminés ont un méristème apical unique ou ramifié chez quelques genres, tels que *Lupinus* (*Genisteae*) et *Listia* (*Crotalaria*), qui ont des nodules "lupinoïdes" avec deux ou plusieurs méristèmes latéraux qui, dans certains cas, entourent complètement la racine sous-jacente (Yates *et al.*, 2007, Ardley *et al.*, 2013). En général, les nodules indéterminés ont un mélange de cellules infectées et non infectées dans le tissu du nodule central, mais les nodules lupinoïdes, comme pour les nodules aeschynoménoïdes (*Dalbergiae*) ont des cellules infectées uniformément (Figure 6).

Dans les nodules indéterminés, le tissu central peut être divisé en quatre zones (Vasse *et al.*, 1990) (figure 7) ; un méristème nodulaire est présent dans la région apicale (zone I) qui, par génération constante de nouvelles cellules, provoque une croissance continue et une forme de nodule allongée. Les cellules quittant le méristème ne se divisent plus et entrent dans une phase de différenciation. Le cordon d'infection libère les bactéries dans les cellules sub-méristématisques, qui se différencient progressivement le long des 12-15 couches cellulaires de la zone d'infection appelé également zone de préfixation (zone II) ; les rhizobia commencent alors leur différenciation en bactéroïdes, qui est la forme capable d'effectuer la fixation d'azote. Celle-ci débute dans l'interzone (II-III) et a réellement lieu dans la zone de fixation (zone III). Au niveau de la zone de sénescence (zone IV), les bactéries sont dégradées ou potentiellement relâchées dans la rhizosphère (Paau *et al.*, 1980 ; Mergaert *et al.*, 2006).



**Figure 6 :** Morphologie de nodules de légumineuses tropicales (Sprent *et al.*, 2013)

A : déterminé, desmodioide. nodules plus ou moins sphérique ; B : déterminé, aeschynomenoides ; C : nodule indéterminé de type desmodioide ; D : lupinoide ; E : nodule indéterminé ramifié ; F : nodule indéterminé avec un seule ou plusieurs lobes ; G : indéterminé avec plusieurs lobes ; H : boisé, la plupart des nodules possédant un cordon d'infection.



**Figure 7 :** Représentation schématique du développement de nodules de forme déterminée et indéterminée (Pawlowski et Bisseling 1996).

Une zone méristématique (I), une zone de préfixation (II), une zone de fixation (III) et une zone de sénescence (IV). (a) Nodule de type déterminé, (b) np, parenchyme nodulaire

## 5. Les endophytes

Les bactéries endophytes peuvent être définies comme les bactéries qui colonisent le tissu interne de la plante, ne montrant aucun signe externe d'infection ou d'effet négatif immédiat sur leur plante hôte (Holliday, 1989 ; Hallmann *et al.*, 1997 ; Schulz et Boyle, 2006 ; Reinhold-Hurek et Hurek, 2011). La plupart des endophytes semblent provenir de la rhizosphère ou de la phyllosphère ; cependant, certains peuvent être transmis par la semence (Transfert horizontal). Principalement, ces bactéries découlent de l'environnement du sol (Hallmann *et al.*, 1997 ; Berg *et al.*, 2005b) et colonisent activement divers tissus végétaux tels que les fleurs, les fruits, les feuilles, les tiges, les racines et les graines (Azevedo *et al.*, 2000 ; Kobayashi et Palumbo, 2000) tout en établissant des liens à long terme avec la plante (Hardoim *et al.*, 2008). Il a été rapporté par Muresu *et al.* (2008) que les tiges et les racines de la majorité des espèces végétales étudiées contiennent environ  $10^3$  à  $10^6$  de bactéries endophytes par gramme de tissu végétal, dont les plus fortes densités sont observées dans les racines et diminuent de la tige aux feuilles. Strobel *et al.* (2004) estiment que parmi les 300000 espèces de plantes qui existent sur terre, chaque plante est l'hôte d'un ou plusieurs endophytes appartenant à différents genres et espèces.

Il semble que les bactéries qui s'adaptent le mieux à vivre à l'intérieur des plantes sont naturellement, choisies et sélectionnées sur un grand nombre d'espèces vivant dans le sol ou la rhizosphère par la plante hôte. Cependant, le mécanisme par lequel les plantes sélectionnent leur population endophytes n'est pas encore compris (Ibáñez *et al.*, 2017). La densité de population des endophytes est très variable et dépend principalement des espèces bactériennes, le génotype de la plante hôte et de son stade de développement ainsi que les conditions environnementales (Pillay et Nwak, 1997 ; Tan *et al.*, 2006 ; Dudeja *et al.*, 2012 ; Dudeja et Nidhi, 2014).

Différents tissus végétaux peuvent abriter des communautés endophytes distinctes (Chi *et al.*, 2005 ; Johnston-Monje et Raizada, 2011). En effet, après la colonisation initiale, certains endophytes peuvent se déplacer vers d'autres zones de la plante en entrant dans les tissus vasculaires (Complant *et al.*, 2005; Zakria *et al.*, 2007; Johnston-Monje et Raizada, 2011). Selon Gaiero *et al.* (2013), la distribution des endophytes dans les plantes dépend d'une combinaison de la capacité des endophytes à coloniser les tissus végétaux et de l'allocation des ressources végétales.

### **5.1.L'infection de la plantes par les endophytes**

Généralement, les endophytes utilisent différents mécanismes pour entrer dans les plantes via différents points. Ces points d'entrée incluent des blessures de tissu (Agarwhal et Shende, 1987 ; Sørensen et Sessitsch, 2006), des stomates (Roos et Hattingh, 1983), des lenticelles (Scott *et al.*, 1996), des radicules de germination (Gagne *et al.*, 1987) mais également les poils absorbants (Huang, 1986). Cependant, certains endophytes peuvent entrer par des fissures formées à l'émergence de racines latérales ou à la zone d'elongation et de différenciation de la racine (Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006), mais leur déplacement localisé dans les cellules végétales nécessite une libération contrôlée de pectinase et / ou de cellulase (Bekri *et al.*, 1999). En effet, à titre d'exemple, la production d'enzymes dégradant la paroi cellulaire, la cellulase (CelC2), facilite le processus d'infection primaire par *Rhizobium* (Robledo *et al.*, 2008) alors que Kovtunovych *et al.* (1999) ont démontré que la sécrétion de la pectate lyase favorise l'entrée de souches de *Klebsiella* dans les tissus végétaux.

L'entrée par les fissures des racines (Crack entry) est considérée comme le principal portail d'entrée pour la colonisation bactérienne (Ibáñez *et al.*, 2017).

Sur la base de l'analyse génomique, Ali *et al.* (2014b) ont pu prédire certaines des caractéristiques clés qui distinguent les bactéries endophytes des bactéries rhizosphériques. Ils estiment que ces bactéries possèdent des gènes spécifiques considérés comme potentiellement impliqués dans le comportement endophytique, communs à tous les endophytes.

### **5.2.Le nodule, peut-il héberger des bactéries autres que les rhizobia?**

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

logées dans les nodules sont appelés le microbiome nodulaire (Martinez-Hidalgo et Hirsch, 2017).

Les premières études sur ces bactéries ont été réalisées par Sturz *et al.* (1997), qui ont pu récupérer  $4,3 \times 10^9$  CFU de rhizobia et  $3 \times 10^5$  CFU d'endophytes non rhizobiens appartenant à 12 genres bactériens par gramme de poids frais de tissu nodulaire. Ils les nommèrent «les bactéries nodulaires» appellation qui les confondait avec le rhizobium fixant l'azote. Pour les distinguer des rhizobia, ces bactéries sont maintenant connus sous différents noms : «des bactéries associées aux nodules» (Rajendran *et al.*, 2012); «des endophytes nodulaires» (Velázquez *et al.*, 2013) et aussi «les endophytes non-rhizobiens» (Non Rhizobia Endophytes, NRE) (De Meyer *et al.*, 2015). Ces bactéries non-symbiotiques n'ont pas été en mesure d'induire des nodules ou de fixer l'azote de manière symbiotique et sont considérées comme des bactéries endophytes. La reconnaissance de ces endophytes non rhizobiens comme potentiellement impliqués dans la symbiose est restée méconnue pendant longtemps. Martínez-Hidalgo *et al.* (2014b) rapportent que ces bactéries augmentent la nodulation lors de la co-inoculation avec des souches de rhizobia compatibles avec leurs plantes hôte. Liu *et al.* (2010) montre que la nodulation de *Wisteria sinensis* par *Sinorhizobium meliloti* est améliorée quand elle est co-inoculée avec *Agrobacterium* sp. II CCBAU 21244. Il en est de même pour le soja quand il est inoculé avec le mélange *Bradyrhizobium japonicum/Bacillus* sp. (Bai *et al.*, 2002 ; Bai *et al.*, 2003).

Les chercheurs ont longtemps posé la question d'une part comment ces bactéries non symbiotiques peuvent briser la barrière de spécificité entre les rhizobia et leurs plantes hôtes et d'autre part comment peuvent-elles résister aux conditions microoxiques qui prévalent dans le nodule? Pandya *et al.* (2013) ont démontré par microscopie confocale que les endophytes peuvent entrer à l'intérieur des nodules de *Vigna* avec le rhizobia via le cordon d'infection lorsqu'elles sont co-inoculées ensemble. Toutefois Zgadzaj *et al.* (2015) ont rapporté que *Lotus japonicus* régule sélectivement l'accès et l'accommodation des rhizobia et des endophytes à l'intérieur des nodules.

### **5.3.Diversité des endophytes nodulaires**

Au cours des années, un grand nombre de bactéries autres que les BNL ont été trouvées dans les nodules de différentes espèces de légumineuses. Ils appartiennent à de nombreux genres différents, notamment *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bosea*,

*Enterobacter*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* et *Stenotrophomonas* (Zakhia *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2008 ; Deng *et al.*, 2011 ; Velázquez *et al.*, 2013 ; De Mayer *et al.*, 2015). Martinez-Hidalgo et Hirsch (2017) ont regroupé tous les genres d'endophytes bactériens hébergés dans les nodules des légumineuses retrouvés à ce jour et une large diversité est révélée. En effet ils sont classés dans des genres lointains voire des classes différentes: *Alpha-proteobacteria*, *Beta-proteobacteria*, *Gamma-proteobacteria*, et phylum différents : *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* et *Firmicutes* (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Les bactéries endophytes isolées à partir des nodules des légumineuses (Martínez-Hidalgo et Hirsch, 2017)

<b>Phylum/Class</b>	<b>Genre</b>	<b>Plante hôte</b>	<b>Références</b>
<i>Alpha Proteobacteria</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Trifolium</i> , <i>Phaseolus</i> , <i>Vicia</i> , <i>Medicago</i>	Plazinski et Rolfe (1985), Yadegari <i>et al.</i> (2008), Cassán et Diaz-Zorita (2016)
	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Glycine</i>	Reis and Teixeira (2015)
	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Cicer</i> , <i>Glycyrrhiza</i> , <i>Pisum</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Vigna</i>	Li <i>et al.</i> (2016), Dary <i>et al.</i> (2010), Tariq <i>et al.</i> (2014), Faisal et Hasnain (2006)
	<i>Methylobacterium</i>	<i>Arachis</i>	Madhaiyan <i>et al.</i> (2006)
	<i>Rhizobium</i> (formerly <i>Agrobacterium</i> )	<i>Acacia</i> , <i>Amorpha</i> , <i>Amphicarpa</i> , <i>Arachis</i> , <i>Argyrolobium</i> , <i>Astragalus</i> , <i>Campylotropis</i> , <i>Caragada</i> , <i>Cassia</i> , <i>Colytea</i> , <i>Crotalaria</i> , <i>Erythrina</i> , <i>Glycyrrhiza</i> , <i>Gueldenstaedtia</i> , <i>Lespedeza</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Mimosa</i> , <i>Onobrychis</i> , <i>Ononis</i> , <i>Phaseolus</i> , <i>Sesbania</i> , <i>Sophora</i> , <i>Thermopsis</i> , <i>Trifolium</i> , <i>Vicia</i> , <i>Vigna</i> , <i>Wisteria</i>	Boukhatem <i>et al.</i> (2016); Chen <i>et al.</i> (2000); Cummings <i>et al.</i> (2009); Diouf <i>et al.</i> (2007); Djedidi <i>et al.</i> (2011); Han <i>et al.</i> (2005); Hoque <i>et al.</i> (2011); Hossain et Lundquist, (2016); Hou <i>et al.</i> (2009); Kan <i>et al.</i> (2007); Lei <i>et al.</i> (2008); Li <i>et al.</i> (2008); Li <i>et al.</i> (2012); Liu <i>et al.</i> (2005); Liu <i>et al.</i> (2007); Mhamdi <i>et al.</i> (2005); Mhahdi <i>et al.</i> (2008); Mohammad and Hoque (2011); Palaniappan <i>et al.</i> (2010); Pandya <i>et al.</i> (2013); Sturtz <i>et al.</i> (1997); Tan <i>et al.</i> (1999); Wang <i>et al.</i> (2006); Wolde-Meskel <i>et al.</i> (2005); Yu <i>et al.</i> (2009);

		Zaheer <i>et al.</i> (2016); Zhao <i>et al.</i> (2010)
<i>Ancyllobacter</i>	<i>Acacia, Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015), Hoque <i>et al.</i> (2011)
<i>Aurantimonas</i>	<i>Glycine</i>	Ikeda <i>et al.</i> (2010)
<i>Blastobacter</i>	<i>Vigna</i>	Pandya <i>et al.</i> (2013)
<i>Bosea</i>	<i>Astragalus, Ononis, Retama, Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015), Zakhia <i>et al.</i> (2006)
<i>Caulobacter</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
<i>Endobacter</i>	<i>Medicago</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> (2013)
<i>Ensifer</i>	<i>Vicia</i>	Lei <i>et al.</i> (2008)
<i>Inquilinus</i>	<i>Arachis, Astragalus, Calycotome, Sphaerophysa, Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015), Deng <i>et al.</i> (2011), Hossain et Lundquist. (2016), Zakhia <i>et al.</i> (2006).
<i>Kaitsia</i>	<i>Acacia</i>	Hoque <i>et al.</i> (2011)
<i>Labrys</i>	<i>Neptunia, Sesbania</i>	Chou <i>et al.</i> 2007), Hossain et Lundquist (2016)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Trifolium</i>	Sturtz <i>et al.</i> (1997)
<i>Novosphingobium</i>	<i>Indigofera</i>	Aserse <i>et al.</i> (2013), Krishnan <i>et al.</i> (in press).
<i>Paracoccus</i>	<i>Sphaerophysa, Retama, Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015) , Deng <i>et al.</i> (2011a, b), Xu <i>et al.</i> (2014), Zakhia <i>et al.</i> (2006)
<i>Paracraurococcus</i>	<i>Retama</i>	Zakhia <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhizobium</i>	<i>Trifolium, Vicia</i>	Lei <i>et al.</i> (2008), Sturtz <i>et al.</i> (1997)
<i>Rhodobacter</i>	<i>Glycyrrhiza</i>	Li <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>Ononis natrix</i>	Zakhia <i>et al.</i> (2006)
<i>Shinella</i>	<i>Vicia</i>	Lei <i>et al.</i> (2008)
<i>Sphingomona</i>	<i>Sphaerophysa</i>	Zakhia <i>et al.</i> (2006), Deng <i>et al.</i> (2011)
<i>Starkeya</i>	<i>Macroptilium</i>	Zakhia <i>et al.</i> (2006)
<b><i>Beta proteobacteria</i></b>	<i>Burkholderia</i>	Raupach and Kloepffer (1998), Pandey <i>et al.</i> (2005), Li <i>et al.</i> (2008), Palaniappan <i>et al.</i> (2010), Chen <i>et al.</i> (2014)
	<i>Variovorax</i>	Aserse <i>et al.</i> (2013), Hoque <i>et al.</i> (2011)
	<i>Achromobacter</i>	Ezzakkoui <i>et al.</i> (2015).
	<i>Advenella</i>	Boukhatem <i>et al.</i> (2016), Zaheer, <i>et al.</i> (2016).
	<i>Bordetella</i>	Sturtz <i>et al.</i> (1997)

	<i>Comamonas</i>	<i>Acacia</i>	Hoque <i>et al.</i> (2011)
	<i>Diaphorobacter</i>	<i>Glycine</i>	Wei <i>et al.</i> (2015).
	<i>Herbaspirillum</i>	<i>Arachis, Phaseolus</i>	Chen <i>et al.</i> (2014), Valverde <i>et al.</i> (2003)
	<i>Massilia</i>	<i>Hedysarum, Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015), Ezzakkioui <i>et al.</i> (2015)
	<i>Roseateles</i>	<i>Acacia, Crotalaria, Faboideae</i>	Aserse <i>et al.</i> (2013), De Meyer <i>et al.</i> (2015), Hoque <i>et al.</i> (2011)
<b>Gamma Proteobacteria</b>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Hedysarum, Glycine, Acacia</i>	Ezzakkioui <i>et al.</i> (2015), De Meyer <i>et al.</i> (2015), Hoque <i>et al.</i> (2011), Li <i>et al.</i> (2008)
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Hedysarum, Medicago, Sphaerophysa, Arachis, Phaseolus, Acacia, Vigna.</i>	Aserse <i>et al.</i> (2013), Benhizia <i>et al.</i> (2004), Deng <i>et al.</i> (2011), Ezzakkioui <i>et al.</i> (2015), Hoque <i>et al.</i> (2011), Ibáñez <i>et al.</i> (2009), Zakhia <i>et al.</i> (2006), Pandya <i>et al.</i> (2013)
	<i>Klebsiella</i>	<i>Vigna, Arachis</i>	Ibáñez <i>et al.</i> (2009), Pandya <i>et al.</i> (2013)
	<i>Pantoea</i>	<i>Mimosa, Lathyrus, Lotus, Medicago, Melilotus, Robinia, Trifolium, Vicia, Phaseolus</i>	Lammel <i>et al.</i> (2013), De Meyer <i>et al.</i> (2015), Aserse <i>et al.</i> (2013), Wekesa <i>et al.</i> (2016)
	<i>Buttiauxella</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Cronobacter</i>	<i>Crotalaria</i>	Aserse <i>et al.</i> (2013)
	<i>Dyadobacter</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Dyella</i>	<i>Lespedeza</i>	Palianappan <i>et al.</i> (2010)
	<i>Enhydrobacter</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Enterobacter</i>	<i>Crotalaria, Erythrina, Phaseolus, Hedysarum, Arachis, Acacia, Glycyrrhiza, Faboideae</i>	Aserse <i>et al.</i> (2013), Benhizia <i>et al.</i> (2004), De Meyer <i>et al.</i> (2015), Hoque <i>et al.</i> (2011), Hossain and Lundquist (2016), Ibáñez <i>et al.</i> (2009), Li <i>et al.</i> (2011)
	<i>Erwinia</i>	<i>Glycyrrhiza, Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015), Li <i>et al.</i> (2011)
	<i>Escherichia</i>	<i>Hedysarum</i>	Benhizia <i>et al.</i> (2004)
	<i>Leclercia</i>	<i>Hedysarum, Vicia, Oxitropis</i>	Benhizia <i>et al.</i> (2004), Kan <i>et al.</i> (2007)
	<i>Rahnella</i>	<i>Erythrina, Faboideae</i>	Aserse <i>et al.</i> (2013), De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Serratia</i>	<i>Sphaerophysa, Glycine, Hedysarum, Phaseolus,</i>	Aserse <i>et al.</i> (2013), Deng <i>et al.</i> (2011),

		<i>Cicer</i>	Ezzakkoui <i>et al.</i> (2015), Li <i>et al.</i> (2008), Mirza <i>et al.</i> (2016a)
	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Acacia, Vicia, Hedysarum, Sesbania, Faboideae</i>	Boukhatem <i>et al.</i> (2016), De Meyer <i>et al.</i> (2015), Ezzakkoui <i>et al.</i> (2015), Hossain and Lundquist. (2016), Hoque <i>et al.</i> (2011), Kan <i>et al.</i> (2007), Zaheer <i>et al.</i> (2016)
	<i>Xanthomonas</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
<b><i>Actinobacteria</i></b>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Lespedeza, Pisum, Trifolium</i>	Palaniappan <i>et al.</i> (2010), Barnawal <i>et al.</i> (2014), Youseif and Hirsch (unpublished results)
	<i>Brevibacterium</i>	<i>Cicer, Cajanus</i>	Xu <i>et al.</i> (2014), Gopalakrishnan <i>et al.</i> (2016)
	<i>Micromonospora</i>	<i>Lupinus, Pisum, Medicago, Casuarina</i>	Trujillo <i>et al.</i> (2006), Carro <i>et al.</i> (2012), Martínez-Hidalgo <i>et al.</i> (2014a), Niner <i>et al.</i> (1996)
	<i>Streptomyces</i>	<i>Pisum, Cicer</i>	Tokala <i>et al.</i> (2002), Sreevidya <i>et al.</i> (2016)
	<i>Actinoplanes</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Aeromicrobium</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Agromyces</i>	<i>Argyrolobium</i>	Zakhia <i>et al.</i> (2006)
	<i>Corynebacterium</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Curtobacterium</i>	<i>Trifolium, Ornithopus, Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015), Muresu <i>et al.</i> (2008), Sturz <i>et al.</i> (1997)
	<i>Kocuria</i>	<i>Hedysarum, Cicer, Cytisus, Lupinus, Vicia</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015), Mahdhi <i>et al.</i> (2012), Singh <i>et al.</i> (2014)
	<i>Kribbella</i>	<i>Lupinus</i>	Trujillo <i>et al.</i> (2006)
	<i>Leifsonia</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Microbacterium</i>	<i>Retama, Ononis, Lespedeza, Acacia, Glycyrrhiza, Ornithopus, Medicago, Faboideae</i>	Boukhatem et el. (2016), De Meyer <i>et al.</i> (2015), Hoque et al. (2011), Li <i>et al.</i> (2011), Muresu <i>et al.</i> (2008), Palianappan <i>et al.</i> (2010), Stajkovic <i>et al.</i> (2009), Zaheer <i>et al.</i> (2016), Zakhia <i>et al.</i> (2006)
	<i>Microbispora</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)

	<i>Moraxella</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Mycobacterium</i>	<i>Astragalus, Sphaerophysa, Acacia</i>	Deng <i>et al.</i> (2011a), Hoque <i>et al.</i> (2011), Zakhia <i>et al.</i> (2006)
	<i>Nocardia</i>	<i>Sphaerophysa</i>	Deng <i>et al.</i> (2011a)
		<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Ornithicoccus</i>	<i>Medicago</i>	Zakhia <i>et al.</i> (2006)
	<i>Plantibacter</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Promicromonospora</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Rhodococcus</i>	<i>Glycine, Faboideae</i>	Aserse <i>et al.</i> (2013), De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Sphaerisporangium</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
<b>Bacteroidetes</b>	<i>Chitinophaga</i>	<i>Vigna, Acacia</i>	Pandya <i>et al.</i> (2013), Hoque <i>et al.</i> (2011)
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Dyadobacter</i>	<i>Vigna</i>	Pandya <i>et al.</i> (2013)
<b>Firmicutes</b>	<i>Bacillus</i>	<i>Oxytropis, Cicer, Glycine, Calycotome, Sophora, Pisum</i>	Wei <i>et al.</i> (2015), Saini <i>et al.</i> (2015), Zakhia <i>et al.</i> (2006), Zhao <i>et al.</i> (2011), Subramanian <i>et al.</i> (2015), Schwartz <i>et al.</i> (2013)
	<i>Paenibacillus</i>	<i>Medicago, Cicer, Lupinus, Prosopis</i>	Lai <i>et al.</i> (2015), Carro <i>et al.</i> (2013), Carro et al. (2014), Valverde <i>et al.</i> (2010)
	<i>Brevibacillus</i>	<i>Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015)
	<i>Cohnella</i>	<i>Phaseolus, Lupinus, Caragana, Oxytropis</i>	Flores-Félix <i>et al.</i> (2014), García-Fraile <i>et al.</i> (2008), Xu <i>et al.</i> (2014)
	<i>Exiguobacterium</i>	<i>Trigonella, Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015), Rajendran <i>et al.</i> (2012)
	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Sphaerophysa, Trigonella, Faboideae</i>	De Meyer <i>et al.</i> (2015), Deng <i>et al.</i> (2011a)
	<i>Planomicrobium</i>	<i>Indigofera</i>	Aserse <i>et al.</i> (2013)
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Sphaerophysa, Lespedeza</i>	Deng <i>et al.</i> (2011a), Palianappan <i>et al.</i> (2010), Sura-de Jong <i>et al.</i> (2015)

## 6. Le Rôle du microbiome nodulaire dans l'amélioration de la croissance des légumineuses.

Afin d'assurer sa survie et de s'adapter à certaines conditions extrêmes, les plantes établissent des symbioses avec les microorganismes de son environnement. Plusieurs études ont montré que les bactéries logées dans les tissus de la plante présentent différents mécanismes de

promotion de la croissance des plantes *in vitro* qui les rendent de bons candidats à utiliser comme bio-fertilisants dans les cultures agricoles.

Les endophytes bactériens peuvent offrir plusieurs avantages à la plante hôte (Ali *et al.*, 2012 ; Coutinho *et al.*, 2015), en particulier l'amélioration de la croissance et la protection contre les agents pathogènes. Ces mêmes auteurs ont démontré que sous diverses conditions environnementales, les endophytes bactériens sont capables de communiquer et d'interagir avec la plante plus efficacement que les bactéries rhizosphériques. En effet, Le PGPB (Promoting Growth Plant Bacteria) endophage utilise des mécanismes similaires à ceux utilisés par PGPB rhizosphérique, elles peuvent favoriser la croissance des plantes grâce à différents mécanismes directs et indirects (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

L'amélioration directe de la croissance des plantes se produit lorsqu'une bactérie facilite l'acquisition de nutriments essentiels ou des modulations de taux d'hormones et au sein d'une plante par la production de phytohormones. L'acquisition de nutriments facilitée par PGPB comprend généralement la production de phytohormones comme l'acide indole acétique (AIA), la production de 1-Amino Cyclopropane- 1- Carboxylate ACC désaminase et les siderophores, la fixation de l'azote et la solubilisation du phosphate (García-Fraile *et al.*, 2012 ; Gaiero *et al.*, 2013; Velázquez *et al.*, 2013). L'acide indoleacétique (AIA) est une phytohormone impliquée dans la croissance des plantes, produite également par divers organismes qui modulent la croissance et le développement des plantes (Duca *et al.*, 2014). L'ACC désaminase clive le 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), le précurseur de l'éthylène en ammoniac et  $\alpha$ -cétobutyrate ce qui provoque la réduction des niveaux d'éthylène et une augmentation de la résistance des plantes aux contraintes environnementales (Glick, 2005 ; Onofre-Lemus *et al.*, 2009 ). Ainsi, les bactéries endophytes contribuent positivement à prévenir les stress et favoriser la croissance des plantes (Glick, 2014 ; Santoyo *et al.*, 2016), en particulier dans le cas des légumineuses (Nascimento *et al.*, 2016).

La mobilisation des éléments nutritifs implique, entre autres mécanismes, la fixation de l'azote atmosphérique, réalisée par des bactéries symbiotiques grâce à une famille d'enzymes appelées nitrogénases (Hoffman *et al.*, 2014). Cette fixation d'azote est assurée principalement par les bactéries symbiotiques vivant à l'intérieur des nodules et par des fixateurs libres vivant dans les différents tissus de la plante.

La solubilisation des phosphates est l'un des mécanismes les plus étudiés, et la capacité des rhizobia à solubiliser le phosphate est bien connue depuis le siècle dernier (Rodríguez et Fraga 1999), ce phénomène est observé également dans le cas des endophytes nodulaires (Palaniappan *et al.*, 2010; Rajendran *et al.*, 2012 ; Aserse *et al.*, 2013 ; Saïdi *et al.*, 2013 ; Pandya *et al.* 2015 ; Saini *et al.* 2015).

La production de siderophores par des bactéries est un mécanisme impliqué dans l'amélioration de la croissance végétale présent chez plusieurs bactéries qui améliore l'absorption du fer par les plantes et facilite le contrôle biologique contre les phytopathogènes. En effet, les siderophores ont une grande affinité pour le Fe<sup>3+</sup>, en s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent ainsi non disponibles pour les pathogènes, ce qui provoque une diminution de leur croissance (Saha *et al.*, 2013).

L'amélioration indirecte de la croissance des plantes par les endophytes se produit lorsqu'ils la protègent des infections dûes à des microorganismes phytopathogènes, y compris certains champignons et bactéries du sol. Cela se produit généralement par l'inhibition de l'agent pathogène par PGPB, la réduction de la gravité de la maladie et l'amélioration de la tolérance aux stress environnementaux (sécheresse, sel, chaleur, contaminant). Différents mécanismes sont employés dans le processus de biocontrôle (production de métabolites antifongiques, production de composés volatiles...) (Bashan 1986; when *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Coutinho *et al.*, 2015; Doty *et al.*, 2009; Frommel *et al.*, 1991 Gardner *et al.*, 1982, Glick, 2012 ; Glick, 2015 ; Kempe et Sequeria, 1983 ; Khan et Doty, 2009 ; Lalande *et al.*, 1989 ; Luo *et al.*, 2012 : Misaghi et Donndelinger, 1990 ; Mitter *et al.*, 2013a ; Musson, 1994; Narula *et al.*, 2013; Pandya *et al.*, 2015; Rashid *et al.*, 2012; Saini *et al.*, 2015 ; Shishido *et al.*, 1996 ; Sturz *et al.*, 1997 ; Sziderics *et al.*, 2007).

# *Matériel et méthodes*

## 1. Matériel biologique

### 1.1. Prospection de *Scorpiurus muricatus* dans l'ouest algérien

Plusieurs études ont été effectuées sur les microorganismes associés aux légumineuses fourragères et spontanées en Algérie, mais aucune ne s'est intéressée à ceux associés à *Scorpiurus muricatus*.

Vu que la répartition spatiale de *Scorpiurus muricatus* n'est pas bien précise dans la littérature, plusieurs campagnes de prospection dans l'ouest algérien sont effectuées durant la période de mars à avril de 2012 et 2013. Ce n'est que durant cette période que la distinction entre les différentes espèces du genre *Scorpiurus* est possible grâce à la forme des gousses.

Plusieurs régions des wilayas de l'ouest Algérien sont prospectées mais cette plante est principalement localisée dans six régions : Kristel et Misserghin à Oran, Mactaa à Mostaghanem, El-Maleh à Ain Témochent, ainsi que Nedroma et Sidi Boudjnene à Tlemcen. Les données GPS de chaque région d'échantillonnage sont enregistrées (Tableau 3).

**Tableau 3 :** les données GPS des régions où *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* est localisée

Region	Données GPS
El-Mactaa	35°47'16.3 N 0°06'45.8 W
El-Maleh	35°22'55.6 N 1°05'30.9 W
Kristel	35°46'37.0 N 0°30'48.4 W
Misserghin	35°36'16.9 N 0°47'03.1 W
Nedroma	35°02'37.8 N 1°29'39.5 W
Sidi Boudjnene	34°57'25.9 N 1°58'59.2 W

### 1.2. Echantillonage du sol, des graines et des nodules de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus*

Dans les régions où *Scorpiurus muricatus* est repérée, les nodules présents sur les racines sont collectés selon la méthode décrite par Vincent (1970) ; Beck *et al.* (1993) et Somasegaran et Hoben (1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm de profondeur pour extraire la plante et son système racinaire. Les plantes entières récoltées et conservées dans leur propre sol, sont transportées au laboratoire.

Au cours de cette étape des homogénats de sols sont préparés pour chaque site à partir d'échantillons récupérés à 30 cm de profondeur à 5 points sélectionnés au hasard. Les composites préparés feront l'objet d'une analyse physicochimique.

Les gousses contenant les graines de *Scorpiurus muricatus* sont collectées à partir de la région de Kristel (Oran), durant la période allant de juillet à août. A cette période, les graines peuvent être considérées comme étant physiologiquement mûres et aptes à être utilisée pour les différents tests.

Au laboratoire, les graines sont triées puis conservées à 4 °C dans un sac en papier sur lequel est mentionné le nom de l'espèce, la date et le lieu de la récolte. Il en est de même pour les homogénats de sol qui sont conservés dans des sacs en plastique étiquetés, datés et mis au réfrigérateur à 4 °C

Quant aux nodules, les racines sont soigneusement lavées avec l'eau du robinet afin de les récupérer puis conservés selon deux méthodes:

### ***La dessiccation***

Cette étape est effectuée en suivant le protocole décrit par Vincent (1970) ; Beck *et al.* (1993); Somasegaran et Hoben (1994). Des tubes à hémolyse sont remplis de CaCl<sub>2</sub> qui permet une absorption de l'humidité, suivi par une couche de coton sur laquelle sont déposés les nodules. Les tubes bien fermés sont conservés à 4 °C après avoir mentionné le nom de la plante, date et lieu de collecte et la date de mise en conservation.

### ***La conservation au glycérol***

Dans cette méthode, les nodules sont conservés dans une solution de glycérol stérile à 30% à -20 °C.

## **2. Méthodes**

### **2.1. Analyse physicochimique du sol**

#### **2.1.1. Analyse physique**

##### ***Analyse granulométrique***

L'analyse granulométrique à la pipette de Robinson permet de connaître sous forme pondérale, la répartition des particules minérales de moins de 2 mm de diamètre selon des classes de grosseur. C'est une opération qui nécessite la dissociation complète des particules de l'échantillon du sol. Elle est fondée sur la relation existante entre la taille des particules et les propriétés physiques de la suspension du sol. En effet, selon la loi de Stocke, plus une particule est grosse plus vite elle tombe dans l'eau. Pour les particules de diamètre inférieur à

50 µm, des prélèvements à différents intervalles de temps permettent de récupérer les particules restantes en solution (Pansu et Gautheyrou, 2003). Les fractions des particules de diamètre supérieur à 50 µm sont déterminées par tamisage, après lavage des fractions fines déterminées par sédimentation (Pansu et Gautheyrou, 2003). La texture du sol est définie à l'aide du triangle des textures (Annexe 1).

#### ***Mesure du pH***

La mesure du pH est réalisée selon la méthode de Callot-Dupuis (1980). Vingt gramme de terre fine (séchés à l'air) sont ajoutés à 50 ml d'eau distillée, le contenu est agité pendant quelques minutes à l'aide d'un agitateur magnétique, puis laisser reposer pendant 24 h. Avant de procéder à la mesure du pH, le pH mètre est étalonné puis la terre est remise en suspension à l'aide d'un agitateur. Le classement de sol par rapport à son pH a été fait selon les normes internationales (Annexe 1).

#### **2.1.2. Analyse chimique**

##### ***La mesure de la conductivité électrique***

La conductivité électrique d'un sol renseigne sur sa salinité, elle est mesurée selon la méthode d'Aubert (1978). Le principe de cette méthode consiste à déterminer la conductivité électrique (CE) de l'eau pour déterminer la salinité de l'extrait du sol. Elle est effectuée en mélangeant 1/5 du sol avec 4/5 d'eau distillée. Après une agitation de quelques minutes, la solution est chauffée à une température **T** (25 °C). Une première lecture est réalisée à cette température, puis chauffée à une température **T'** (35 °C). Une deuxième lecture est réalisée avec le conductivimètre (CT'). Le coefficient de température **B** est calculé par l'équation suivante:

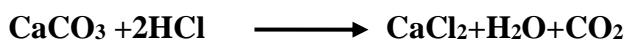
$$B = (CT' - CT) \times 100 / (T' - T) \times CT$$

Le conductivimètre (EC 215) est réglé à la valeur **B** et la mesure de la C.E est effectuée ; cette dernière s'exprime en milli Siemens (mS). Le degré de la salinité du sol est évalué en se référant aux normes internationales (annexe 1).

##### ***Le dosage du calcaire total***

Le calcaire n'est pas un constituant toujours présent dans le sol, par contre pratiquement tous les sols contiennent du calcium si peu soit-il. Cet élément se trouve en particulier fixé sur l'argile sous forme d'ion calcique ou en solution sous forme de sels solubles de calcium. Le calcaire ou carbonate de calcium, CaCO<sub>3</sub>, est un sel insoluble. Mais l'eau chargée de gaz

carbonique peut le dissoudre lentement le transformant en un sel soluble, le bicarbonate de calcium. C'est ainsi que peu à peu le calcaire disparaît d'un sol donné. Mais la solution du sol, et l'argile gardent très longtemps du calcium provenant de la dissolution du calcaire. Le principe de la méthode de détermination du calcaire total de Callot-Dupuis (1980) (Annexe 1) repose sur la capacité de l'acide chlorhydrique à détruire le calcaire en générant du CO<sub>2</sub> selon la réaction suivante:



Le volume du CO<sub>2</sub> mesuré sous conditions contrôlées de température et de pression est proportionnel à la quantité de calcaire total renfermée dans l'échantillon du sol.

### ***Le dosage du calcaire actif***

Dans le sol, une partie plus ou moins importante de calcaire total se trouve à l'état de fines particules actives pour les végétaux, cette fraction est facilement solubilisée par les eaux riches en gaz carbonique. On utilise la propriété du calcium se combinant aux oxalates d'ammonium pour donner de l'oxalate de calcium insoluble, pour le dosage du calcaire actif. L'excès de solution d'oxalate d'ammonium est ensuite dosé par une solution de permanganate de potassium en milieu sulfurique (**Drouineau, 1942**).



La teneur en calcaire actif exprimée en % est obtenue à partir de la formule suivante:

$$\text{Calcaire actif \%} = (\text{N}-\text{n}) \times 1.25$$

N-n: correspond à la quantité d'oxalate de calcium précipitée, donc à la quantité d'oxalate d'ammonium qui a réagi avec le calcaire actif.

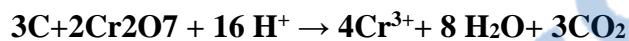
N: nombre de ml KMnO<sub>4</sub> utilisés pour titrer la solution d'oxalate d'ammonium.

n: nombre de ml KMnO<sub>4</sub> utilisés pour titrer l'extrait du sol

### ***Le dosage du carbone et détermination du taux de la matière organique***

Le carbone est déterminé par la méthode d'Anne (1945). Cette méthode nécessite deux étapes principales : l'oxydation et la titration.

Lors de la première étape, le carbone organique est oxydé en présence d'un excès de bichromate et la réaction est réalisée dans un milieu fortement acidifié par l'utilisation de l'acide sulfurique.



On considère que la quantité de bichromate réduite est proportionnelle à la quantité de carbone contenue dans l'échantillon de sol.

L'excès de bichromate non réduit est titré par un agent réducteur, le sel de Mohr. La titration est réalisée en présence d'agent fixant, le fluoride de sodium, et d'un indicateur coloré du pH. La teneur en matière organique totale du sol, s'obtient généralement en dosant la teneur en carbone. On estime que le rapport matière organique / carbone est à peu près constant et égal à MO/C = 1,72.

#### *Le dosage de l'azote*

La détermination de l'azote total des échantillons de sol prélevés a été effectuée par la méthode de Kjedahl (1883), cette méthode se déroule en deux étapes, la minéralisation et la titration.

La minéralisation consiste en la transformation de l'azote organique en une forme minérale (des sulfates d'ammonium). La réaction est réalisée dans un milieu à forte concentration en acide sulfurique et en présence d'un catalyseur, le K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, qui permet l'augmentation et la stabilisation de la température de la réaction.

Pour la titration, le milieu réactionnel est alcalinisé par l'addition de l'hydroxyde de sodium, la solution obtenue est distillée et l'ammonium entraîné par la vapeur est condensé puis collecté dans une solution d'acide borique additionnée de quelques gouttes d'un indicateur coloré. La solution résultante est enfin titrée par une solution d'acide sulfurique.

#### *Le dosage du phosphore*

La détermination du phosphore est réalisée par la méthode de Duchaufour (1970). Dans le sol, le phosphore assimilable se trouve essentiellement sous forme de phosphate de calcium. Les phosphates de calcium sont extraits par une solution d'acide à faible concentration. En milieu acide, les phosphates donnent de l'acide phosphorique. Ce dernier en présence de molybdate d'ammonium et en milieu acide forme des complexes phosphomolybdique. Ces complexes ont la particularité d'être réduits par une solution de chlorure stanneux ; ils sont alors transformés

en bleu de molybdène. En mesurant l'intensité de la coloration et en se référant à une courbe étalon, on détermine la concentration en acide phosphorique.

## **2.2. Germination des graines de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus***

Les graines de *Scorpiurus muricatus* sont caractérisées par la dureté de leur tégument (Patane, 1998 ; Cristaldo *et al.*, 2007 ; Gresta *et al.*, 2007a). De ce fait, une scarification est nécessaire pour la levée de la dormance. Une série d'essais d'optimisation de la meilleure méthode de scarification des graines de *Scorpiurus muricatus* est effectuée.

Une scarification chimique par immersion des graines dans l'acide sulfurique 96 %, suivie par un rinçage abondant (6 à 10 fois) avec l'eau distillée stérile. Différents temps d'immersion dans l'acide sulfurique sont testés, allant de 5 à 45 minutes.

Une scarification mécanique est effectuée à l'aide du papier verre ; qui permet de fragiliser le tégument. Les graines sont ensuite désinfectées avec une solution d'hypochlorite de calcium (3 %) pendant trois minutes, puis abondamment rincées (6 à 10 fois) avec l'eau distillée stérile. La solution désinfectante est filtrée avec du papier filtre avant utilisation.

L'ensemble des graines scarifiées est laissé à imbiber dans la dernière eau de rinçage durant 15 minutes à 2 heures, avant d'être transféré aseptiquement dans des boites de Petri contenant de l'eau gélosée à 0,8 % (Tillard et Drevon, 1988) (Annexe 2).

Une partie des graines de chaque traitement est incubée toute une nuit à 4 °C puis à 25 °C, tandis que la seconde partie est incubée directement à 25 °C. L'ensemble des boites sont placées inversées et incubés à l'obscurité. Le taux de germination est reporté quotidiennement pour chaque traitement.

## **2.3. Piégeage des rhizobia associés à *Scorpiurus muricatus***

### **2.3.1. Obtention des plantes**

Les plantes de la région d'El Mactaa présentent des nodules racinaires sénescents d'où la nécessité de procéder au piégeage. Ce dernier est effectué selon la méthode décrite par Bala *et al.* (2001) et Diouf *et al.* (2007). Les graines de *Scorpiurus muricatus* sont scarifiées avec de l'acide sulfurique (96%) comme décrit précédemment. Après germination, les graines présentant des radicelles d'environ 2 cm de longueur sont transférées de manière aseptique dans des tubes en verre type Gibson (Gibson, 1980) sur une solution nutritive stérile et dépourvue d'azote (Bertrand, 1997). Afin de maintenir les racines dans l'obscurité, les tubes

sont couverts d'un papier aluminium puis placés dans une chambre de culture à température de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  et une photopériode de 16h.

### **2.3.2. Inoculation *in vitro* des plantes**

Une suspension de sol est préparée en diluant 10 g de l'échantillon de sol dans 90 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 0,9 %); puis agitée pendant une heure, afin de libérer les bactéries des particules de sol. Une série de dilutions jusqu'à  $10^{-3}$  est réalisée à partir de cette solution mère.

Après trois jours de mise en culture, les jeunes plants sont inoculés à l'aide d'une seringue stérile avec 1ml de chaque dilution de sol. Quatre répétitions sont effectuées pour chaque dilution. Des plantes non inoculées ont servi de contrôle. Après six semaines de culture, Les nodules néoformés sont récoltés et utilisés pour l'isolement des souches.

## **2.4. Isolement et sélection des isolats bactériens associés à *Scorpiurus muricatus***

### **2.4.1. Les bactéries nodulaires**

Les nodules conservés par la méthode de dessiccation sont transférés dans des tubes à essai stériles contenant de l'eau distillée stérile pendant 1 h afin de permettre leur réhydratation. Les nodules conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  sont abondamment rincés avec l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute trace de glycérol. Par la suite, l'ensemble de nodules récupérés *in natura* et par piégeage sont désinfectés en surface par immersion dans une solution d'hypochlorite de calcium CaClO à 3 % (m/v) pendant 3 minutes, puis abondamment rincés (10 fois) à l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute trace de désinfectant. L'eau de la dernière eau de rinçage est ensemencée sur milieu YMA, pour s'assurer de l'innocuité du protocole de désinfection.

L'isolement est effectué selon la méthode de Vincent (1970) chaque nodule est écrasé aseptiquement dans un eppendorf contenant deux gouttes d'eau distillée stérile à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile. Une goutte du broyat nodulaire est ensemencée sur boite de Petri contenant du YMA (Yeast Mannitol Agar) (Annexe2). Les boites sont incubées à  $28^{\circ}\text{C}$  et le temps de croissance des cultures est noté. Les colonies bien isolées sont repiquées sur milieu YMA et incubées à  $28^{\circ}\text{C}$  pendant 4 à 7 jours. Cette opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

La sélection des isolats associés à *S. muricatus* est effectuée dans un premier temps par une observation macroscopique sous la loupe binoculaire, où la couleur, la taille, la forme, le contour, la viscosité et le diamètre des colonies sont déterminés.

Tous les isolats sont repiqués sur milieu YMA additionné de rouge Congo (0,0025%) (Vincent, 1970). Ce test est important car il permet de différencier entre les rhizobia et les autres espèces présentant les mêmes caractéristiques morphologiques ; les rhizobia absorbent généralement très peu de rouge Congo (Kneen et Larue, 1983). Par la suite, les isolats sont examinés sous le microscope optique après coloration de Gram (Gram, 1884) (Annexe 3); les isolats ayant un seul aspect présentant des caractéristiques proches des rhizobia sont sélectionnés (macroscopiques : couleur blanchâtre ou beige, circulaire, convexe, semi translucide, élevée, mucilagineuse ; microscopiques : Gram négatif en forme de coccobacilles ou de bâtonnet).

Après criblage, les isolats nodulaires sélectionnés sont conservés à 4 °C sur milieu YMA en gélose inclinée dans des tubes à vis, renouvelés chaque 3 mois.

Pour une conservation de longue durée à -20 °C les isolats sont conservés dans des cryotubes contenant 0,75 ml de la préculture fraîche de chaque isolat mélangée à volume égal avec une solution de glycérrol à 60 %.

#### **2.4.2. Les bactéries racinaires**

Deux régions ont fait l'objet d'échantillonnage racinaire, il s'agit de la région d'El-Maleh et celle de Sidi Boudjnene. Des plantes entières de *Scorpiurus* sont récoltées et transportées avec le sol natif associé.

Au laboratoire, les racines sont soigneusement lavées avec l'eau de robinet puis avec de l'eau distillée stérile et laissées sécher à température ambiante sur du papier absorbant.

#### **Désinfection des racines de *Scorpiurus muricatus***

La désinfection est effectuée selon le protocole décrit par Chaintreuil *et al.* (2000) modifié au sein du Laboratoire de Biotechnologie des Rhizobium et Amélioration des Plantes (LBRAP) à l'université d'Oran1 Ahmed Ben Bella. Avec un scalpel, les racines sont découpées en fragments de 3 à 5 cm de longueur. Cinq grammes de racine de chaque plante sont transférées dans des erlenmayer préalablement stérilisés, remplis de 50 ml d'eau distillée stérile, puis sont agités pendant 15 min. Les racines sont ensuite rincées deux fois avec de l'eau distillée stérile puis transférées dans de nouveaux erlenmayer stériles. Dans ces derniers, les racines sont

immergées dans l'éthanol 96 % pendant 1 min, rincées avec de l'eau distillée stérile puis avec une solution d'hypochlorite de calcium 0,5 % pendant trois minutes et cinq fois avec de l'eau distillée stérile. Deux cents microlitres de la dernière eau de rinçage est ensemencée sur la gélose nutritive (Annexe 2), puis incubée à 30 °C. Cette étape est essentielle dans le travail d'isolement des endophytes racinaires pour vérifier l'innocuité de la désinfection. Les boites qui présentent des cultures microbiennes avant 48 h ne sont pas pris en considération (Chaintreuil *et al.*, 2007)

### **Isolement et purification des endophytes**

Les fragments de racines désinfectés sont écrasés séparément sous conditions d'asepsie rigoureuse, dans des mortiers stérilisés. Une goutte de chaque suc du broyat racinaire est ensemencée sur des boites de Petri sur gélose nutritive (Annexe 2). Les boites sont incubées à 30 °C jusqu'à apparition de colonies bactériennes.

Après incubation de plusieurs jours, les colonies bactériennes sont séparées, en fonction de leur aspect macroscopique (taille, couleur, opacité, forme...) et leur temps de croissance, puis purifiées par une série de repiquages successifs jusqu'à l'obtention de colonies isolées.

La pureté des isolats est vérifiée sous microscope optique après coloration de Gram. Cette étape est importante car elle permet de classer les isolats en fonction de leur type de parois (Gram -/+ ) ainsi que leur mode d'arrangement.

### **Conservation des endophytes racinaires**

Les isolats purs sont ensemencés dans un bouillon nutritif et incubés à 30 °C. Les cultures jeunes sont conservées dans du glycérol 60% (V/V) à -20 °C. Une conservation à 4 °C sur gélose nutritive inclinée dans des tubes à vis est également effectuée.

### **2.5. Authentification des isolats nodulaires (Test de nodulation)**

Un des caractères important pour identifier les isolats nodulaires comme étant des rhizobia est de prouver leur capacité à réinfecter et former des nodosités sur leur plante hôte en conditions bactériologiques contrôlées (Graham *et al.*, 1991). De ce fait, les isolats nodulaires sont soumis à un test de nodulation. Les graines de *Scorpiurus muricatus* sont scarifiées comme décrit précédemment et mises à germer à 25 °C. Les graines germées dont la taille de la radicelle ne dépassant pas 1 cm sont transférées à raison de deux graines par pot (250ml) sur du sable stérile et humidifié (autoclavé à 120 °C pendant 1 h à 24 h d'intervalle). L'inoculation

est effectuée 3 jours après la mise en pots avec 1ml de culture bactérienne en phase exponentielle ( $1,5 \times 10^8$  cellules/ml) cette concentration est obtenue en comparant la turbidité du milieu ensemencé avec celle de Mac Farland 0,5 (Annexe 4). Tous les tests de nodulation sont réalisés en triplicata. Des plantes non inoculées sont incluses en tant que témoin négatif.

Les plantes sont cultivées dans une serre au sein de l'université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, sous une température de  $23^{\circ}\text{C} \pm 1$  et une photopériode de 16 heures et sont arrosées avec une solution nutritive dépourvue azote (Bertrand, 1997). Après 2 mois de culture, l'efficacité de l'inoculation est estimée par la présence des nodules sur les racines des plantes inoculées.

Dans les mêmes conditions de culture, un test de nodulation est réalisé en hydroponie, dans des tubes Gibson (Gibson, 1980) par l'utilisation de la solution nutritive (Bertrand, 1997) dépourvue d'azote. Les tubes sont scellés avec du papier aluminium et stérilisés préalablement.

Les radicelles des graines germées de 2 cm de longueur, sont introduites dans les tubes troués avec une aiguille rougie à la flamme sous condition d'asepsie. Après 3 jours de la mise en tube, les plantules sont inoculés à l'aide d'une seringue stérile avec 1 ml de culture bactérienne en phase exponentielle  $1,5 \times 10^6$  UFC/ml. Trois répétitions sont effectuées pour chaque isolat.

## **2.6. Caractérisation moléculaire des isolats associés à *Scorpiurus muricatus***

### **2.6.1. Extraction de l'ADN génomique par choc thermique**

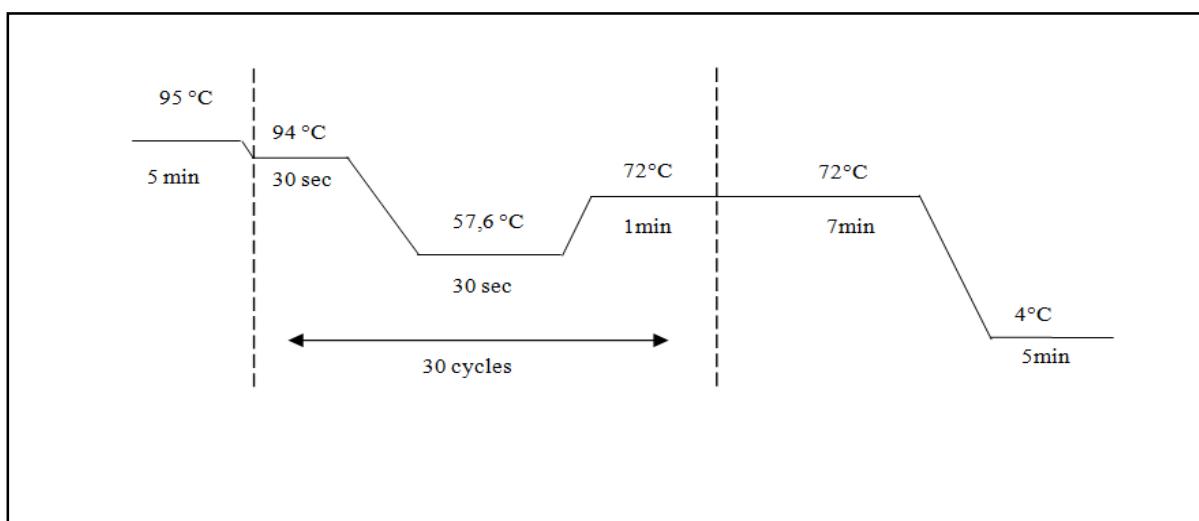
L'extraction de l'ADN génomique à partir des bactéries à paroi Gram négatif, s'est faite par choc thermique (Guerrouj *et al.*, 2013). Les colonies isolées, fraîchement cultivées en boîtes sont repiquées sur milieu TY (Tryptophane Yeast) (Beringer, 1974) en gélose inclinée ; pour réduire la production des polysaccharides synthétisés par les bactéries par rapport au milieu YMA. Après 2 jours d'incubation à  $28^{\circ}\text{C}$ , les colonies sont récupérées dans 2 ml d'eau milliQ stérile pour constituer une suspension bactérienne ne contenant pas de milieu de culture. Deux lavages sont effectués dans 2 ml d'eau milliQ stérile par centrifugation à 3400 g pendant 15 min et le culot est re-suspendu dans 500  $\mu\text{l}$  d'eau milliQ stérile. Par la suite, la suspension est incubée toute une nuit à  $-20^{\circ}\text{C}$  puis directement à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes. Les échantillons sont laissés sur la paillasse pendant 5 minutes avant d'être stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les extraits obtenus sont utilisés comme suspension d'ADN pour les autres expérimentations.

L'ADN génomique des endophytes racinaires est extrait selon la même technique

### 2.6.2. La recherche du gène symbiotique (*nodC*) parmi les souches nodulaires associées à *Scorpiurus muricatus*

Le développement de la symbiose entre les légumineuses et les rhizobia est le résultat d'un dialogue moléculaire entre les deux partenaires (Parniske et Downie, 2003). Pour la majorité des rhizobia les génomes *nodABC* sont identifiés comme étant les génomes responsables de cette symbiose (Giraud, 2007). Dans cette étude le gène recherché est le *nodC*. Le couple d'amorces choisi pour l'amplification est *nodCf* – 5'-GCTGCCTATGCAGACGATG-3' (position 32–50) – et *nodCr* – 5'-GGTTACTGGCTTCATTGGC-3' (*nodCr*, position 231-251) décrit par Laguerre *et al.* (2001).

L'amplification est effectuée dans un mélange réactionnel d'un volume de 25 µl comprenant 7,675 µl d'eau milliQ stérile, 5 µl tampon de réaction, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,2 µl dNTPs (25 mM), 2,5 µl de chaque amorce (10 µM) en plus de 5 µl d'ADN génomique. Le programme d'amplification est optimisé au niveau du laboratoire de biologie moléculaire du centre de recherche forestière (CRF) (Figure 8).



**Figure 8:** Schéma représentant les différentes étapes d'amplification du gène *nodC*

Les amplifiats sont vérifiés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1% dans le tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 1x (pH 8,3) (Annexe 5). Après une heure de migration à 70 volts, le gel est coloré par une solution de bromure d'éthidium (0,4%) (BET) pendant 10 min puis décoloré avec de l'eau distillée pendant 20 min. Les bandes sont visualisées sous lumière UV et photographiées à l'aide d'un Système Photo Print (Fisher Bioblock Scientific).

Le marqueur de poids moléculaire 100 pb ladder (Annexe 5) est utilisé comme référence pour

déterminer la taille des bandes obtenues.

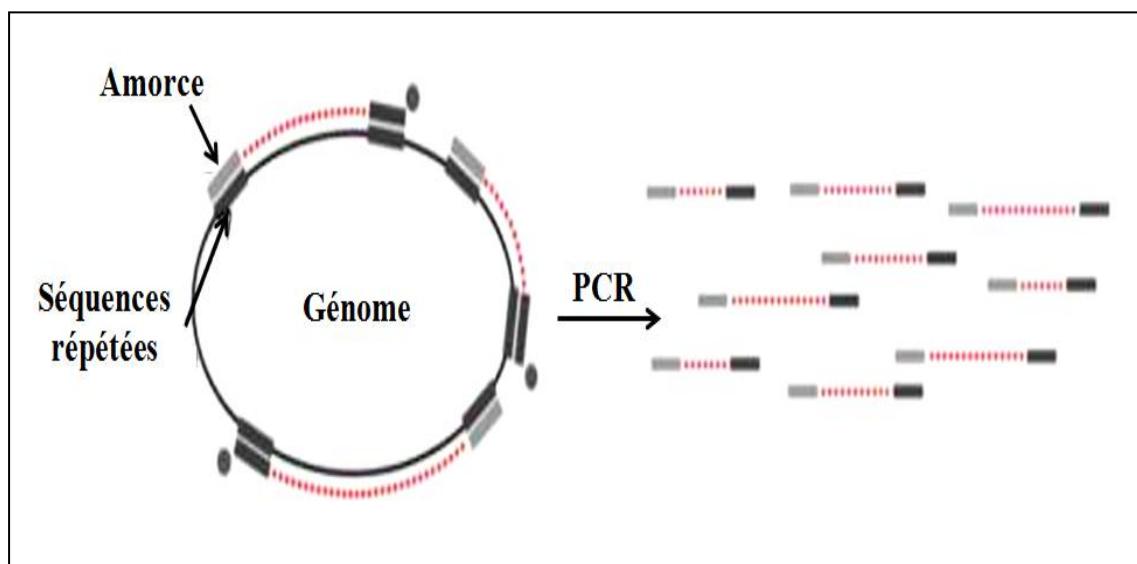
La souche ORS 639 (*Rhizobium leguminosarum*) fournie par l'IRD Dakar (Sénégal) est utilisée comme souche de référence possédant le gène de nodulation *nodC*, dans le but de vérifier la performance du programme d'amplification.

Toutes les expérimentations sont conduites au niveau du laboratoire de biologie moléculaire du Centre de Recherche Forestière (CRF) de Rabat au Maroc.

### 2.6.3. Evaluation de la diversité génétique des isolats de la collection par Rep-PCR

L'objectif de cette étude consiste à caractériser les souches et à évaluer la diversité qui existe entre les isolats de la collection. Cette technique est choisie car elle est considérée comme étant très discriminante puisqu'elle se base sur l'amplification par PCR de plusieurs séquences répétitives et non codantes du génome. De plus, elle est largement utilisée pour étudier la variabilité intraspécifique des rhizobia et le typage d'isolats de grandes collections (Judd *et al.*, 1993 ; Leung *et al.*, 1994 ; Versalovic *et al.*, 1994 ; Louws *et al.*, 1996 ; Vinuesa *et al.*, 1998).

Le principe de cette méthode est l'utilisation d'amorces consensuelles complémentaires à des séquences d'ADN très conservées et répétées qui sont présentes en plusieurs copies dans le génome de la plupart des bactéries Gram- et dans certaines bactéries Gram+ (Figure 9). L'amplification génère ainsi différents fragments d'ADN de tailles variables. Par séparation électrophorétique, ces fragments permettent la révélation d'une empreinte génétique spécifique.



**Figure 9 :** Schéma représentant le principe de fonctionnement de la rep-PCR

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00916347/document>

## **Amplification**

### ***Les isolats nodulaires***

Les réactions de la rep-PCR sont effectuées en employant les amorces ERIC1-R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') et ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGTGAGCG-3') (De Bruijn, 1992). La réaction d'amplification se fait dans un volume réactionnel de 25µl comprenant 7,675 µl d'eau ultra-pure stérile, 5 µl de tampon de l'enzyme, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,2µl de dNTPs (25 mM), 2,5 µl Primer1 (10 µM), 2,5 µl Primer2 (10 µM), 0,125 µl Go taq Flexi 5U/µl, 5 µl ADN. En 35 cycles (94 °C pendant 30 s, 52 °C pour 1 min et 72 °C durant 1 min), avec une dénaturation initiale à 95 °C de 5 min et une élongation finale de 7 min à 72 °C. Le mélange réactionnel sans ADN est préparé pour n+2 échantillons. Les extraits d'ADN sont ajoutés indépendamment dans des tubes-PCR après la répartition du mix réactionnel. Dans le contrôle négatif le volume d'ADN est remplacé par l'eau milliQ stérile. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur de type Applied Biosysteme système 2720.

### ***Les isolats racinaires***

Pour les isolats racinaires, la réaction de la rep-PCR est effectuée en employant les amorces ERIC1-R/ ERIC-2 telle décrite précédemment, ainsi qu'un essai avec l'amorce BOXA1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (Versalovic *et al.*, 1994). Pour la BOX-PCR, la réaction est initiée par une dénaturation de 2 min à 95 °C, suivie de 30 cycles (95 °C pour 30 s, 50 °C pour 30 s et 65 °C pour 1 min), et une élongation finale de 7 min à 72 °C. Elle est effectuée dans un volume réactionnel de 25 µl comprenant: 10,175 µl d'eau ultra-pure stérile, 5 µl de Tampon de l'enzyme, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,2 µl dNTPs (25 mM), 2,5 µl Primer (10 µM), 0,125 µl Go taq Flexi 5U/µl et 5 µl ADN.

## **La migration des amplifiats et coloration des gels**

À la fin de l'amplification, un volume de 15 µl de chaque amplifiat est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % dans le tampon TBE 1x (Tris-Borate-EDTA) à pH 8,3 à 55 V pendant 4 h. Les marqueurs de taille utilisés sont 1Kb et 100Pb Ladder (Bioline) (Annexe 5). Les gels sont colorés pendant 10min dans une solution de bromure d'ethidium BET à 0,4% (P/V) puis décolorés pendant 20 min dans de l'eau distillée. Les bandes sont visualisées sous lumière UV et photographiées à l'aide d'un Système Photo Print (Fisher Bioblock Scientific).

### **Analyse des données de la rep-PCR**

Les isolats étudiés sont groupés en se basant sur les données des électrophorégrammes des rep-PCR obtenues. Les bandes obtenues sont évaluées par comparaison à celles des marqueurs moléculaires. En effet, les distances de migration des bandes de chaque marqueur de poids moléculaire dont les tailles sont connues, ont été mesurées pour tracer une courbe logarithmique spécifique à chaque gel. Allant du même principe, la taille des différents fragments obtenus, à partir de l'amplification d'ADN de chaque souche a été déterminée.

Un tableau est généré en codant les données sous forme binaire (1 pour présence de bandes et 0 pour leur absence). Ensuite, les dendrogrammes sont construits à partir de la matrice calculée sur la base du pourcentage de divergence (percent disagreement) en utilisant l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) à l'aide du programme STATISTICA 13.

Les isolats présentant un pourcentage de similarité supérieur ou égal à 60% sont regroupés dans le même cluster.

#### **2.6.4. Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S**

L'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S est réalisée en utilisant les amores rD1/fD1 dont les séquences sont (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3') / (5'GGAGAGTTAGATCTGGCTC3') (Weisburg *et al.*, 1991). Cette étape concerne les représentants des différents groupes générés par l'analyse des données de la rep PCR. Ainsi que certain isolats sélectionnés de manière aléatoire pour vérifier le pouvoir discriminant de la rep-PCR.

La réaction d'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S est effectuée dans un volume réactionnel de 25 µl préparé de la même manière que précédemment. Le programme d'amplification est optimisé après plusieurs essais au niveau du laboratoire ; une dénaturation initiale de 5 min à 95 °C suivie de 30 cycles (30 s de dénaturation à 94 °C, 30 s d'hybridation à 57,3 °C et 1 min 30 s d'elongation à 72 °C) et enfin une elongation finale à 72 °C pendant 7 min.

Afin de vérifier la performance de la réaction d'amplification, 8µl de chaque produit PCR est séparé par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1% dans le tampon TBE (Annexe 5) pendant 1 h à 70V. Le 1KB ladder est utilisé comme marqueur de poids moléculaire pour chaque gel. Les gels sont colorés dans une solution de bromure d'ethidium BET à 0,4 % (P/V)

avec un temps de coloration de 10 min et 20 min de décoloration. Les bandes sont visualisées sous lumière UV et photographiées à l'aide d'un Système Photo Print (Fisher Bioblock Scientific).

#### **2.6.5. Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S**

l'ADNr16S est le premier gène ciblé pour l'étude de la diversité bactérienne et des relations phylogénétiques pour sa présence chez toutes les bactéries, sa fonction constante et la présence de zones très conservées ainsi que de parties à séquence variable (Woese, 1987 ; Schleifer et Ludwig, 1989 ; Stackebrandt et Goebel, 1994).

Le séquençage partiel de l'ADNr 16S est effectué à partir des produits d'amplification, qui ont été purifiés en utilisant le Kit de purification de produit PCR de Qiagen, puis sont soumis à un séquençage de cycle en utilisant les mêmes amores que pour l'amplification par PCR. Les produits sont analysés avec un séquenceur automatique 3130xl dans les installations de séquençage du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) à Rabat (Maroc). Les séquences obtenues codantes dans le sens 5'-3' sont analysées et corrigées par le centre (CNRST).

#### **2.6.6. Analyse phylogénétique**

Les séquences finales sont analysées et comparées avec celles de la base de données GenBank en utilisant le programme BLASTn disponible sur le site BLASTN EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) et NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), puis déposées et identifiées dans la banque de données Genbank via un numéro d'accession (ATCC number), après avoir créé un compte à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub>.

Les alignements des séquences obtenues à partir des isolats étudiés ainsi que les espèces bactériennes qui leur sont proches phylogénétiquement sont effectués en utilisant le logiciel CLUSTAL W, inclus dans la version MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Ce dernier a permis également de faire les analyses évolutives phylogénétiques et moléculaires (construction d'arbre phylogénétique). Les distances sont calculées selon Kimura's two-parameter model (Kimura, 1980). Les arbres phylogénétiques sont élaborés selon la méthode de Neighbor joining (Saitou et Nei, 1987). Afin de permettre une phylogénie représentative de la réalité, un "Bootstrap" de 1000 réplications est utilisé pour estimer la probabilité de l'existence des différents nœuds, les plus souvent rencontrés parmi tous les arbres générés.

## 2.7. Recherche des caractéristiques PGP (Promoting growth plant) des isolats associés à *Scorpiurus muricatus*

Les endophytes et les rhizobia sont connus pour leur capacité à solubiliser le phosphore, la production des phytohormones tel l'acide indole acétique (AIA), des sidérophores etc (Malinowski et Belesky, 1999 ; Tan et Zou, 2001 ; Lee *et al.*, 2004 ; Ryan *et al.*, 2008 ; Suman *et al.*, 2017 ; Yadav, *et al.*, 2017). La recherche de caractères PGP (Promoting Growth Plant) des isolats racinaires et nodulaire est effectuée.

### 2.7.1. Solubilisation du phosphate

Un volume de 10 µl de chaque culture bactérienne ( $10^8$  UFC / ml) est déposé sur la surface du milieu de gélose Picovskaya (Picovskaya, 1948) (annexe 2) additionné de 0,1% de bleu de bromophénol (Gupta *et al.*, 1994), c'est un milieu de base préconisé pour l'isolement des microorganismes solubilisant les phosphates insolubles et contient du  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  comme seule source de phosphate. Après 7 jours d'incubation à 30 °C, un halo apparaît autour des colonies ayant la capacité de solubiliser les phosphates. Les résultats sont examinés et évalués en mesurant le diamètre des halos autour des colonies. Les bactéries qui possèdent les plus hauts potentiels de solubilisation de phosphore inorganique sont sélectionnées après avoir calculé l'index de solubilisation selon la méthode décrite par Afzal et Bano (2008).

$$\text{Index de solubilisation (IS)} = (\text{le diamètre de la colonie} + \text{le diamètre du halo}) / \text{le diamètre de la colonie}$$

### 2.7.2. Production d'AIA

La production d'AIA est testée sur un milieu Winogradsky liquide (Holt *et al.*, 1994) additionné de tryptophane (5 g / l) (Annexe2). Le milieu est inoculé avec 100 µl de cultures bactériennes à une concentration de  $10^8$  UFC/ml. Les tubes sont incubés à 30 °C pendant 96 h. Le dosage colorimétrique est réalisé selon la méthode de Loper et Scroth (1986). Les cultures ont été centrifugées à 5000 rpm pendant 20 min. Un ml de surnageant et mélangé avec 2 ml de réactif Salkowski (50 ml d'acide perchlorique à 35% et 1 ml de  $\text{FeCl}_3$  à 0,5 M) et 200µl d'acide orthophosphorique. L'absorbance a été mesurée à 530 nm après 30 min d'incubation. Les concentrations d'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue dans un intervalle de 0 à  $10^{-3}$  M AIA (Fluka).

## 2.8.Inoculation de *Scorpiurus muricatus* par les isolats nodulaires et racinaires

### *Les isolats nodulaires.*

Une des caractéristiques des bactéries vivant dans les nodules est l'amélioration de la croissance de leur plante hôte. Afin de vérifier la capacité des isolats nodulaires à améliorer la croissance de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus*, un test d'efficience est réalisé sur sable stérile dans les mêmes conditions décrites précédemment pour le test de nodulation. Des jeunes plantules de *S. muricatus* (âgés de 3 jours) sont inoculés avec 1ml de culture bactérienne en phase exponentielle ( $1,5 \times 10^8$  cellules/ml) et les plantes sont arrosées avec solution nutritive pour plante dépourvue d'azote (Bertrand, 1997). Trois répétitions sont effectuées pour chaque souche.

En plus des témoins négatifs non inoculés, un lot composé de trois plants arrosés par une solution nutritive additionnée de  $\text{KNO}_3$  (0,5 g/l) a servi de témoin positif.

Après deux mois de culture, les plantes sont déterrées puis séchées à 60°C pendant 3 jours.

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

$$\boxed{\mathbf{E} (\%) = (\mathbf{I}-\mathbf{C} / \mathbf{N}-\mathbf{C}) \times 100}$$

Dont **I** est le poids sec des plantes inoculées par les isolats, **C** est le poids sec des plantes témoins non inoculées et **N** est le poids sec des plantes fertilisées à l'azote.

Les termes non efficace (NE ;  $E < 25\%$ ), moyennement efficace (ME ;  $25\% \leq E \leq 74\%$ ) et hautement efficace (HE ;  $E \geq 75\%$ ) sont adoptées.

### *Les isolats racinaires*

Le test de l'effet de l'inoculation de *Scorpiurus muricatus* par les endophytes racinaires est réalisé en hydroponie dans les mêmes conditions décrites précédemment, dans des tubes Gibson (Gibson, 1980) remplies de solution nutritive pour plantes (Bertrand, 1997) dépourvue d'azote, les plantules sont inoculés avec 1 ml de culture bactérienne en phase exponentielle  $1,5 \times 10^6$  UFC/ml. Trois répétitions sont effectuées pour chaque souche.

Après 2 mois de culture le poids sec des plantes est comparé avec celui du témoin non inoculé.



## **2.9.Analyse statistique**

Les résultats de l'effet de l'inoculation sont soumis à une analyse de variance à un seul facteur (effet souche), ce qui permet de distinguer la répartition de la variation totale observée. Quand l'effet du facteur souche a un effet significatif sur l'amélioration de la croissance des plantes (effet PGP), les valeurs représentant les moyennes des mesures et les intervalles de confiance sont calculées au seuil d'erreur de 5% ( $P < 0,05$ ). Le test multiple de classement des moyennes de Fischer permet de classer les isolats en groupes homogènes.

L'analyse de l'ANOVA est effectuée en utilisant le logiciel (STATISTICA13).

## *Résultats et discussion*

## **1. Prospection et échantillonnage**

Les légumineuses spontanées des régions méditerranéenne ont été peu étudiées, du point de vue de leur aptitude à la nodulation et de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, contrairement aux légumineuses cultivées (Nour *et al.*, 1994 ; Nour *et al.*, 1995 ; Rome *et al.*, 1996 ; Squartini *et al.*, 2002). D'où l'intérêt de ce travail, qui s'intéresse à la nodulation de *Scorpiurus muricatus* dans l'ouest algérien.

*Scorpiurus muricatus* ssp *sulcatus* est localisée principalement dans six régions de l'ouest algérien Kristel, et Misserghin à Oran, El Mactaâ à Mostaghanem, El-Maleh à Ain Témouchent, et Nedroma et Sidi Boudjnene à Tlemcen (Figure 10). La prospection sur terrain a montré que cette plante est principalement repérée dans les zones montagneuses et sur les bordures de route, avec une préférence pour les sols caillouteux (Figure 11), comme cela a déjà été décrit au Maroc par Nègre (1961) et en Algérie par Bensalem *et al.* (1990) et M'hammedi Bouzina (2005). Dans la région d'El- Maleh, cette espèce est localisée sur des sols agricoles.

Cette plante herbacée est généralement localisée seule (isolée de toute végétation) ou associée avec d'autres légumineuses: *Medicago polymorpha*, *Vigna radiata* et des non légumineuses *Lavandula angustifolia*, ou bien rarement au pied de quelque arbres.

Les régions où *Scorpiurus muricatus* est répertoriée sont caractérisées par deux types de climat:

Climat méditerranéen sec durant toute l'année avec de faibles précipitations et une température moyenne qui varie entre 16 et 18 °C par an, classé selon Koppen Geiger de type BSK (B S K) (Annexe 6) pour la région de Sidi Boudjnene, et de type BSH (B S H) (Annexe 6) pour les régions de Kristel et El Mactaâ.

Climat chaud et tempéré avec des précipitations plus importantes en hiver avec une température moyenne qui varie entre 16,9 et 18°C par an, classé selon Koppen Geiger de type CSA (C S A) (Annexe) pour les régions de Misserghin, Nedroma et El-Maleh (Annexe 6).

Plusieurs études ont rapporté la présence de *Scorpiurus muricatus* dans les régions à climat aride et semi aride, ainsi que son indifférence écologique (Bensalem *et al.*, 1990; Abdelguerfi et Laouar 1999; Zoghlami et Hassen, 2004)

Les observations sur le terrain montrent que *Scorpiurus muricatus* est muni d'un système racinaire de type pivotant et de racines secondaires aussi importantes (Figure 12) également

décrit par Yahiaoui-Younsi *et al.* (2000). Cette prospection a permis aussi de connaître le statut de nodulation de *Scorpiurus muricatus* dans les régions prospectées. En effet, les observations du système racinaire montrent que *Scorpiurus muricatus* est fortement nodulée dans la plupart des régions à l'exception de la région d'El-Mactââ, où la majorité des nodules observés sont sénescents. Ils apparaissent le plus souvent sur les racines latérales, parfois sur la racine principale et rarement à la base des racines. Ils sont de grande taille, pouvant dépasser un centimètre, de type indéterminé, avec plusieurs aspect; nodules indéterminés non ramifiés (fusiforme), nodules indéterminés avec un seul ou deux lobes; nodules indéterminés avec plusieurs lobes (Figure 12).



**Figure 10:** Les différentes régions prospectées de l'ouest algérien abritant *Scorpiurus muricatus*

a: Oran (Ravin de la vierge) ; b: Mostaganem (El-Mactaa) ; c:Oran (Kristel) ; d:Tlemcen (Nedroma) ; e: Ain Temouchent (El-Maleh) ; f:Tlemcen (Sidi Boudjnene)



**Figure 11 :** Aspect de *Scorpiurus muricatus in natura*



**Figure 12 :** Aspect des différents nodules trouvés sur les racines de *Scorpiurus muricatus* localisée dans six régions de l'ouest algérien sous la loupe binoculaire

## **2. Analyses physico-chimiques des sols**

L'analyse physico-chimique des sols étudiés (Tableau 4), montre que la majorité des sols sont alcalins, considérés comme non salins à légèrement salins. Ils sont modérément riches en calcaire avec une faible teneur en matière organique, en phosphore disponible et une teneur moyenne en azote et riche pour le sol d'El Maleh (Annexe 1). Bensalem *et al.* (1990) et M'Hammedi Bouzina *et al.* (2005) ont indiqué la présence de *S. muricatus* sur des sols présentant des caractéristiques chimiques proches.

Selon le Triangle de la texture (Annexe 1), les résultats des analyses granulométriques des sols des six régions montrent que les sols de Kristel et de Sidi Boudjnane sont limoneux, celui de Messerghin limoneux fin, de Nedrouma et d'El Maleh limono-sableux alors que le sol d'El Mactaâ est limono-argilo-sableux (Tableau 4). Tous les sols ont une texture équilibrée.

Bensalem *et al.* (1988 ; 1990) ont signalé que la répartition des espèces du genre *Scorpiurus* ne dépend pas de la texture et le pH du sol comme principal facteur, mais plutôt de la pluviométrie et de l'altitude. M'Hammedi Bouzina *et al.* (2010) ont affirmé que cette espèce pousse dans les régions moyennement à fortement arrosées, à sols alcalins, riches en limons et en calcaire. *Scorpiurus muricatus* a une préférence pour les sols pauvres en sodium (Abdelguerfi et Laouar 2001 ; Visnevschi-Necrasov *et al.*, 2011).

**Tableau 4:** Les caractéristiques physicochimiques des sols étudiés

Site	MO (%)	N (‰)	C (%)	C/N	Calcaire	Calcaire actif	pH	CE (Ms)	P (ppm)	Granulométrie (%)			
										Sable	Limon	Argile	Type de sol
<b>El-Maleh</b>	1,9	1,79	1,10	0,61	17,27	19,38	7,95	0,1	28	51,7	24,3	25	Limono-sableux
<b>Nedrouma</b>	1,8	1,37	1,04	0,75	13,2	11,21	8,1	0,3	35	56	29	15	Limono-sableux
<b>Sidi Boudjnane</b>	1,6	1,23	0,93	0,75	14,19	13,97	8,2	0,2	38	43,6	36,4	20	Limoneux
<b>Kristel</b>	1,8	1,29	1,04	0,8	17,8	20,63	7,49	0,3	23	49	36	15	Limoneux
<b>Messerghin</b>	1,5	1,08	0,87	0,8	8,6	12,64	7,60	0,3	49	25,7	54,3	20	Limoneux fin
<b>El mactaâ</b>	2	1,58	1,16	0,73	16,98	20,5	7,70	0,5	36	73,2	11,8	15	Limono-argilo-sableux

**N:** Azote Total ; **C:** Carbone ; **P:** Phosphore Assimilable ; **MO :** Matière Organique ; **CE :** Conductivité Electrique

### 3. Optimisation des conditions de la germination des graines

La dormance tégumentaire est une caractéristique commune de nombreuses espèces spontanées de la famille des Fabacées (Patane et Gresta, 2006 ; Gresta *et al.*, 2007b). Une des contraintes majeures de l'utilisation de *Scorpiurus muricatus*, par les agriculteurs et les éleveurs, est la dureté de son tégument d'où l'intérêt d'optimiser sa germination par la levée de la dormance tégumentaire afin de faciliter son utilisation.

Les résultats des différents traitements sont présentés dans le Tableau 5. L'incubation des graines intactes (sans scarification) dans des conditions optimales (humidité et température) n'a pas permis leur germination (Tableau 5) sous l'effet inhibiteur du tégument de la graine sur la germination.

Le prétraitement des graines de *Scorpiurus muricatus* avec l'acide sulfurique concentré a levé l'inhibition tégumentaire (Tableau 5). Le temps de trempage dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96% influe sur la germination avec un optimum de germination (100 %) obtenu lorsque les graines sont trempées pendant 40 minutes dans l'acide sulfurique. Par ailleurs, la durée d'imbibition des graines dans la dernière eau de rinçage influe fortement sur la vitesse de germination. Une durée de 2 heures permet la germination de 100 % des graines après seulement 36 heures et 4 jours lorsque les graines prétraitées sont imbibées pendant 15 minutes. Quant à la scarification mécanique (Tableau 5) avec le papier verre, elle permet d'obtenir un taux de germination de 100 % après 7 jours d'incubation.

Selon Abbate (2010) cette dormance constitue un mécanisme de survie pour l'espèce et représente un élément essentiel pour leur persistance dans les pâturages en jachère. Le pouvoir germinatif de la graine varie selon les génotypes ainsi que le stade de maturation des gousses (M'hamedi-Bouzina et Abdelguerfi, 1990 ; Gresta *et al.*, 2007a).

D'après M'hamedi Bouzina (1989), la capacité des graines à germer est en relation étroite avec les conditions environnementales dans lesquelles les plantes mères ont été cultivées ; les graines les plus dures proviennent des régions humides et des stations les mieux arrosées.

Plusieurs travaux ont rapporté l'efficacité du traitement mécanique avec le papier verre comme méthode de scarification des graines de *Scorpiurus* (Patane, 1998 ; Cristaldo *et al.*, 2007; Gresta *et al.*, 2007a). Néanmoins les résultats de cette étude montrent que la scarification chimique par l'acide sulfurique qui provoque le ramollissement du tégument a permis une germination plus rapide (36 h) (Figure 13). L'efficacité de l'acide sulfurique pour lever l'inhibition tégumentaire chez les semences des légumineuses a été démontrée par

plusieurs auteurs (Behaeghe et Blouard, 1962 ; Kramer et Kozlowski, 1979 ; Bekki, 1983 ; Claworthy, 1984 ; Bekki, 1986 ; Bekki *et al.*, 1987; Grouzis, 1987 ; Vora, 1989; Grouzis, 1992 ; Sy, 1995 ; Diallo *et al.*, 1996).

Pour les graines de *Scorpiurus muricatus* le traitement de scarification optimum est chimique avec une immersion dans l'acide sulfurique pendant 40 minutes et une imbibition de 2h dans la dernière eau de rinçage.

**Tableau 5:** Les différents traitements de scarification des graines de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus*

Traitement	Chimique (Acide Sulfurique) H <sub>2</sub> S0 <sub>4</sub> 95%									Mécanique Papier verre
	5min	10min	15min	20min	25min	30min	35min	40min	45min	
<b>Immersion dans H<sub>2</sub>O pendant 15 min à 25 °C</b>	0%	0%	0%	0%	5% après 40 J	5% après 35 J	50% après 20 J	100% après 4 J	100% après 7 J	100% après 8 J
<b>Immersion dans H<sub>2</sub>O pendant 2 h à 25 °C</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100% après 36h	0%	100% après 4 J
<b>24heures à 4 °C</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%



**Figure13:** Aspect des graines germées de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* après 36 h sur eau gélosée (0,8%)

#### 4. Constitution d'une collection de souches bactériennes

##### 4.1. Piégeage des rhizobia

Cette étape a concerné la région d'El Mactaâ où les racines de *Scorpiurus muricatus* présentaient des nodules sénescents. Elle a été effectuée sur milieu hydroponique inoculé avec différentes dilutions de sol, afin de pouvoir piéger aussi les souches les moins compétitives. A partir de cinq semaines de culture les nodules sont apparus sur les racines des plantes (Figure 14). Ce résultat montre que le sol d'El Mactaâ contient des souches infectives et compatible avec *Scorpiurus muricatus*.



**Figure 14 :** Aspect de *Scorpiurus muricatus* ssp *sulcatus* après 2 mois de croissance sur milieu hydroponique inoculée avec les dilutions de sol.

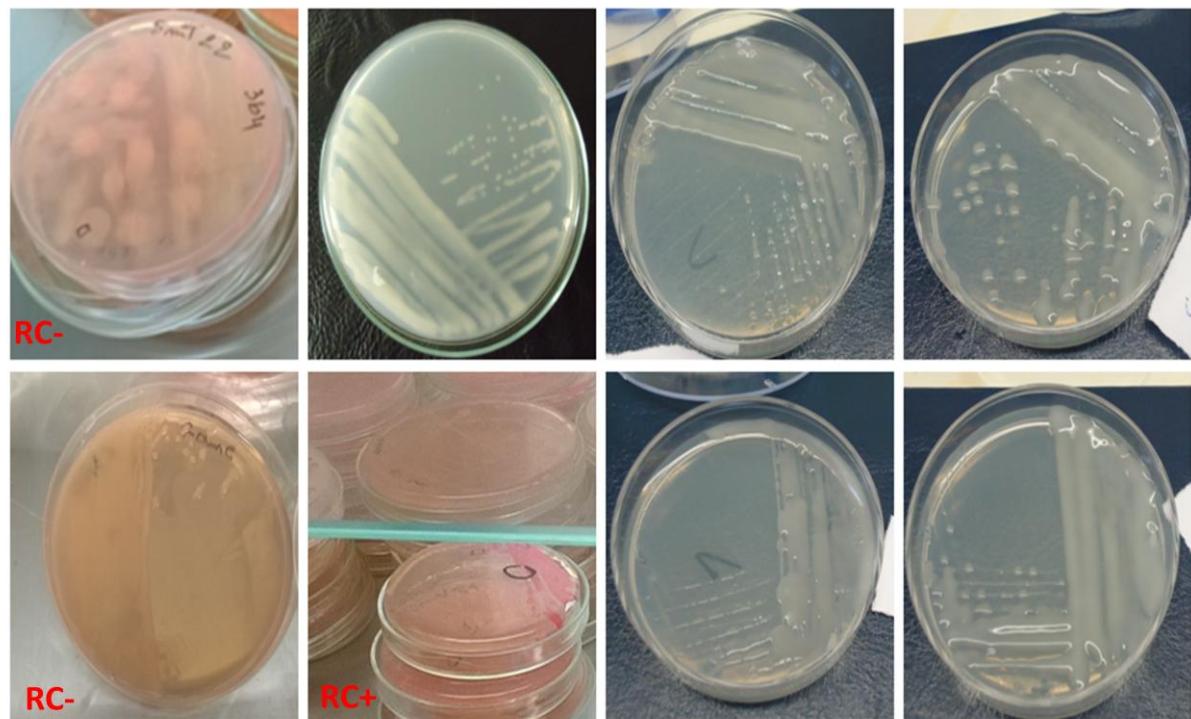
#### 4.2. Isolement, purification et sélection des souches associées à *Scorpiurus muricatus*

##### A partir des nodules

L'isolement à partir des nodules a permis d'obtenir cent isolats provenant des différentes régions prospectées. L'étude macroscopique et microscopique des isolats a permis la sélection de 51 isolats (Tableau 6). Les isolats Gram +, qui absorbent le rouge Congo et dont l'aspect ne correspond pas à l'aspect usuel des rhizobia sont éliminés.

Tous les isolats sélectionnés présentent les caractéristiques morphologiques proches des rhizobia (Dommergues et Mangenot, 1970), elles forment sur milieu YMA des colonies blanchâtres à crèmes, opaques ou d'aspect marbré dont la mucosité varie selon les isolats (Figure 15).

L'observation microscopique des isolats a montré qu'ils sont de forme coccobacille ou bâtonnet et possèdent des parois à Gram-. Ces caractéristiques sont en accord avec celles décrites par Mangenot, (1970).



**Figure 15 :** Aspect macroscopique des différents isolats sur milieu YMA après 5jours d'incubation à 28 °C

**Tableau 6:** Origine et caractéristiques des isolats nodulaires de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus*

Souche	Origine	Caractéristiques macroscopiques	Caractéristiques microscopiques
<b>SMC26</b>	El-Mactaa	Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Bacille, Gram
<b>SMC26p</b>		Colonie blanchâtre à centre transparent très muqueuse	Bacille, Gram
<b>SMC24*</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Coccobacille, Gram-
<b>SMC29</b>		Colonie transparente peu muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMC16*</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Coccobacille, Gram-
<b>SMC15*</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Coccobacille, Gram-
<b>SMH12</b>	El-Maleh	Colonies crème opaque, muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMH19</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMH21p</b>		Colonies crème opaque, muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMK31C</b>	Kristel	Colonies blanchâtre peu muqueuses	Coccobacille, Gram-
<b>SMK63</b>		Colonies crème opaque, muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMK52</b>		Colonie blanchâtre très muqueuse et peu élastique	Coccobacille, Gram-
<b>SMK42</b>		Colonies crème opaque, muqueuse	Coccobacille, Gram-
<b>SMK5a</b>		Colonie transparente peu muqueuse	Coccobacille, Gram-
<b>SMK25a</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMK3a</b>		Colonie blanchâtre très muqueuse et peu élastique	Coccobacille, Gram-
<b>SMK3C</b>		Colonies blanchâtre peu muqueuses	Coccobacille, Gram-
<b>SMK54</b>		Colonie blanchâtre à centre transparent très muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMK25b</b>		Colonie transparente peu muqueuse	Coccobacille, Gram-
<b>SMV20</b>	Messerghin	Colonies crème opaque, muqueuse	Coccobacille, Gram-
<b>SMV81</b>		Colonie blanchâtre très muqueuse et peu élastique	Coccobacille, Gram-
<b>SMV84</b>		Colonies blanchâtre peu muqueuses	Bacille, Gram-

<b>SMV13</b>		Colonie blanchâtre très muqueuse et peu élastique	Coccobacille, Gram-
<b>SMB6a</b>		Colonies blanchâtre peu muqueuses	Bacille, Gram-
<b>SMV26</b>		Colonies blanchâtre peu muqueuses	Coccobacille, Gram-
<b>SMV12a</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMT11</b>	Nedroma	Colonies blanchâtre peu muqueuses	Bacille, Gram-
<b>SMT8a</b>		Colonie blanchâtre à centre transparent très muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMT24</b>		Colonie blanchâtre très muqueuse et peu élastique	Coccobacille, Gram-
<b>SMT13</b>		Colonie blanchâtre à centre transparent très muqueuse	Coccobacille, Gram-
<b>SMT17a</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Coccobacille, Gram-
<b>SMT15</b>		Colonies crème opaque, muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMT7</b>		Colonie transparente peu muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMT16b</b>		Colonies blanchâtre peu muqueuses	Coccobacille, Gram-
<b>SMT23</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse peu élastique	Coccobacille, Gram-
<b>SMT36</b>		Colonie transparente peu muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMT22</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Coccobacille, Gram-
<b>SMB7</b>	Sidi Boudjnene	Colonies crème opaque, muqueusea	Bacille, Gram-
<b>SMB27</b>		Colonie transparente peu muqueuse	Coccobacille, Gram
<b>SMB8</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMB4</b>		Colonies blanchâtre peu muqueuses	Bacille, Gram-
<b>SMB19</b>		Colonie transparente peu muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMB13</b>		Colonies crème opaque, muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMB23</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Coccobacille, Gram-
<b>SMB30</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse peu élastique	Coccobacille, Gram-
<b>SMB2</b>		Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Bacille, Gram-

<b>SMB19p</b>	Colonie blanchâtre opaque très muqueuse peu élastique	Bacille, Gram-
<b>SMB8b</b>	Colonies blanchâtre peu muqueuses	Coccobacille, Gram-
<b>SMB8p</b>	Colonies crème opaque, muqueuse	Coccobacille, Gram-
<b>SMB18</b>	Colonie transparente peu muqueuse	Bacille, Gram-
<b>SMB15</b>	Colonie blanchâtre opaque très muqueuse	Bacille, Gram-

\*souches récupérées de nodules après piégeage

### À partir des racines

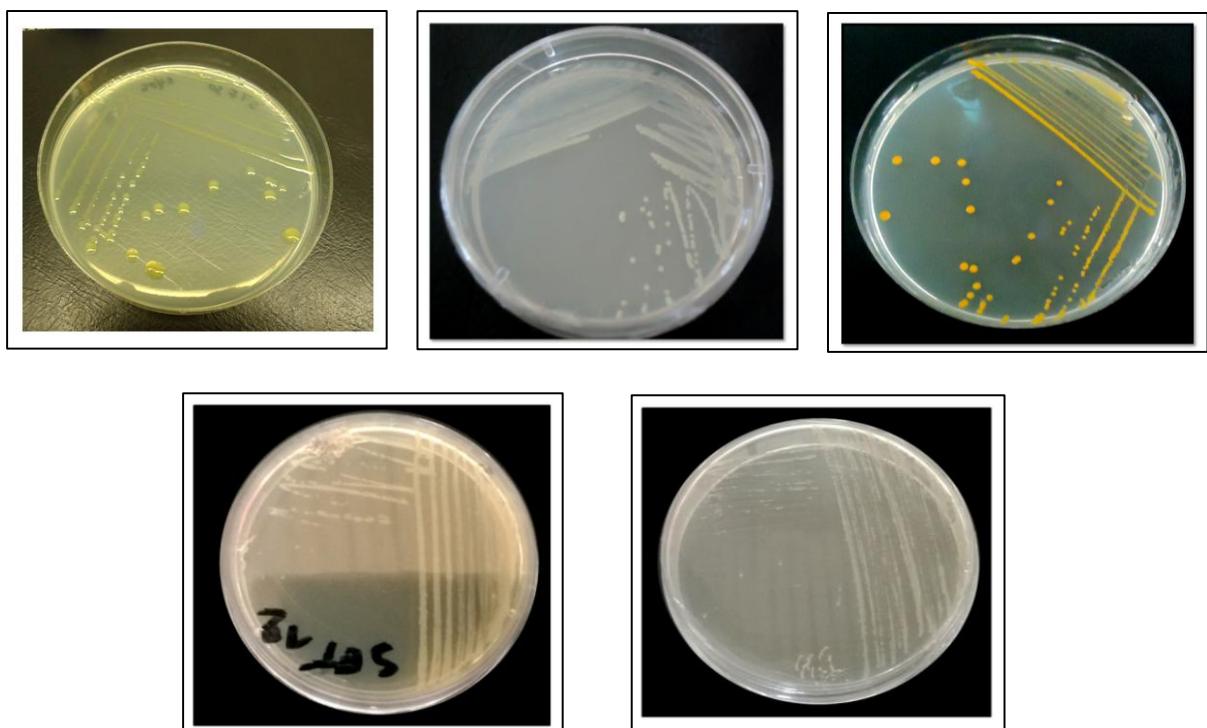
Il a été largement reporté que les endophytes pouvaient coloniser les différents tissus végétaux, cependant, Muresu *et al.* (2008) n'ont pas pu isoler de bactéries endophytes cultivables à partir des racines de *Scorpiurus muricatus*.

Afin de vérifier la diversité des bactéries abritées dans les racines de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* provenant des régions Sidi Boudjnene et El-Maleh, un isolement a été effectué. Après cinq jours d'incubation sur gélose nutritive à 28 °C, plusieurs colonies de bactéries, sont apparues sur boite. Elles présentent des caractères morphologiques différents (couleur, forme, diamètre, texture). La couleur des colonies est blanche, crème, jaune, orange ou rose (Figure 16). La plupart ont un aspect sec et non visqueux; opaques, de petites tailles pour la majorité et certaines ponctiformes (Tableau 7).

L'observation microscopique après coloration de Gram est une étape essentielle dans la classification des endophytes. En plus de la détermination du type de paroi la forme et le mode d'arrangement des isolats, la pureté des isolats sont vérifiés. (Tableau 7).

Plusieurs PGPR ne colonisent pas seulement la rhizosphère et le rhizoplan mais aussi pénètrent dans les plantes et colonisent les tissus internes (Compant *et al.*, 2005a ; Hallmann et Berg, 2006 ). Plusieurs études récentes ont confirmé que les plantes abritent un grand nombre de communautés d'endophytes qui découlent principalement de l'environnement du sol (Berg *et al.*, 2005b). Les bactéries endophytes colonisent activement divers tissus végétaux et établissent des liens à long terme (Hardoim *et al.*, 2008).

Cette hétérogénéité des caractéristiques morphologiques montre la grande diversité des espèces endophytes qui colonisent les racines de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus*.



**Figure 16 :** Aspect macroscopique des différents isolats racinaires cultivés sur gélose nutritive après 4 jours d’incubation à 30 °C

**Tableau 7:** Origine et caractéristiques des isolats racinaires de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus*

Souche	Origine	Caractéristiques macroscopiques	Caractéristiques microscopiques
<b>SEM 25</b>	El-Maleh	Colonies circulaires, jaune pâle et muqueuse	Bacille, Gram -
<b>SEM52</b>		Colonie crème, opaque, sèches	Bacille, Gram -
<b>SEM50</b>		Colonies jaune pâle, translucide, lisse, circulaire et convexe.	Bacille, Gram -
<b>SEM47</b>		Petite colonie crème ponctiforme et sèche	Bacille, Gram -
<b>SEM41</b>		Colonie orange lisse, à contour régulier	Bacille, Gram -
<b>SEM34</b>		Colonie orange lisse, à contour régulier	Bacille, Gram -

<b>SEM32</b>	Colonie crème, brillantes, avec des bords irréguliers, légèrement surélevés	Bacille, Gram +	
<b>SEM22</b>	Colonie crème peu muqueuse à contour régulier	Bacille, Gram -	
<b>SEM44</b>	Colonie transparente très visqueuses	Bacille, Gram -	
<b>SEM27</b>	Petite colonie blanchâtre à contour régulier Peu Muqueuse	Bacille, Gram -	
<b>SEM19</b>	Colonie transparente très visqueuses	Bacille, Gram -	
<b>SEM24</b>	Petites colonies jaunes, sèches	Bacille, Gram -	
<b>SEM4</b>	Petite colonie crème ponctiforme et sèche	Coccobacille, Gram-	
<b>SET5</b>	Sidi Boudjnene	Petite colonie blanchâtre à contour régulier Peu Muqueuse	Bacille, Gram -
<b>SET4</b>		Petites colonies jaunes, sèches	Bacille, Gram -
<b>SET19</b>		Colonie orange lisse, à contour régulier	
<b>SET33</b>		Petites colonies jaune, sèches	Bacille, Gram -
<b>SET26</b>		Colonie de couleur rose, de petite taille, à contour régulier	Bacille, Gram -
<b>SET8</b>		Colonie circulaire de couleur jaune pâle, opaque, légère faiblement convexe avec viscosité	Bacille, Gram +
<b>SET25</b>		Colonie blanchâtre opaque muqueuse	Coccobacilles, Gram -
<b>SET13</b>		Petite colonie crème à contour régulier peu muqueuse	Bacille, Gram -
<b>SET12</b>		Petite colonie crème à contour régulier peu muqueuse	Bacille, Gram -

## 5. Authentification des isolats nodulaires

La capacité des isolats à former des nodules sur les racines des légumineuses demeure le critère de base pour les caractériser comme étant des rhizobia (Graham *et al.*, 1991). Ainsi, le pouvoir infectieux de tous les isolats nodulaires a été examiné pour leur capacité à induire la formation de nodules sur les racines de la plante hôte *Scorpiurus muricatus* cultivée sur sable stérile et en milieu hydroponique sous conditions contrôlées. Après 12 semaines de culture, aucun nodule n'a été observé sur les racines des plantes de *Scorpiurus*. Des résultats comparables ont été obtenus par Muresu *et al.* (2008) dont le travail porté sur les bactéries isolées à partir des nodules de cinq légumineuses sauvages dont *Scorpiurus muricatus* qui

n'ont pas pu réinfecter leurs plantes hôtes sur plusieurs supports. Ces résultats sont aussi similaires avec ceux rapportés par Zakhia *et al.* (2006) sur les légumineuses sauvages en Tunisie et par Boughalem *et al.* (2017) sur les bactéries associées à deux espèces de *Sulla* à Oran et Mascara en Algérie et à Sidi Bouzid en Tunisie. Une seule étude conduite en Sardaigne par Safronova *et al.* (2004) a permis d'isoler 6 souches bactériennes capables de former des nodules sur les racines de *Scorpiurus muricatus*.

Cette incapacité des souches dites rhizobiennes à réinfecter leur plante hôte *in vitro* peut avoir plusieurs explications. Elle peut être due à une insuffisance dans leur compétence d'invasion et nécessitent la présence de microorganismes auxiliaires. En plus de la spécificité entre les deux partenaires (Bactérie-Plante), beaucoup de paramètres peuvent conditionner ce phénomène ; la concentration de l'inoculum (Dobbelaere *et al.*, 2002), le pH du milieu (Tang *et al.*, 1993 ; Tang Robson, 1998) et la présence de certains éléments minéraux comme le phosphore (Stajković *et al.*, 2011), le fer (Rai *et al.*, 1982), l'aluminium (Kim *et al.*, 1985), même si ces paramètres ont été contrôlés lors du piégeage. De plus, les résultats du piégeage, en utilisant les mêmes conditions éliminent cette hypothèse. D'autres auteurs ont signalé le rôle des phytohormones dans la régulation des stades précoce de la nodulation tel que l'éthylène (Ivanchenko *et al.*, 2008), l'acide abscissique (ABA) (Ding *et al.*, 2008), l'acide indole acetique (AIA) (VanNoorden *et al.*, 2007).

## 6. Détection du gène de nodulation *nodC*

Une des caractéristiques les plus remarquables de la famille des légumineuses est la fixation biologique de l'azote en symbiose avec les bactéries du sol nommés rhizobia ; cette relation symbiotique est caractérisée par une spécificité élevée entre les deux partenaires et commandé par un dialogue moléculaire (Wang *et al.*, 2012) dont le résultat est la formation d'un nouvel organe nommé nodule. L'amplification et la détection des gènes responsables de cette nodulation chez le partenaire microbien sont les techniques les plus utilisées dans la caractérisation des rhizobia (Bactéries Nodulant les Légumineuses, BNL).

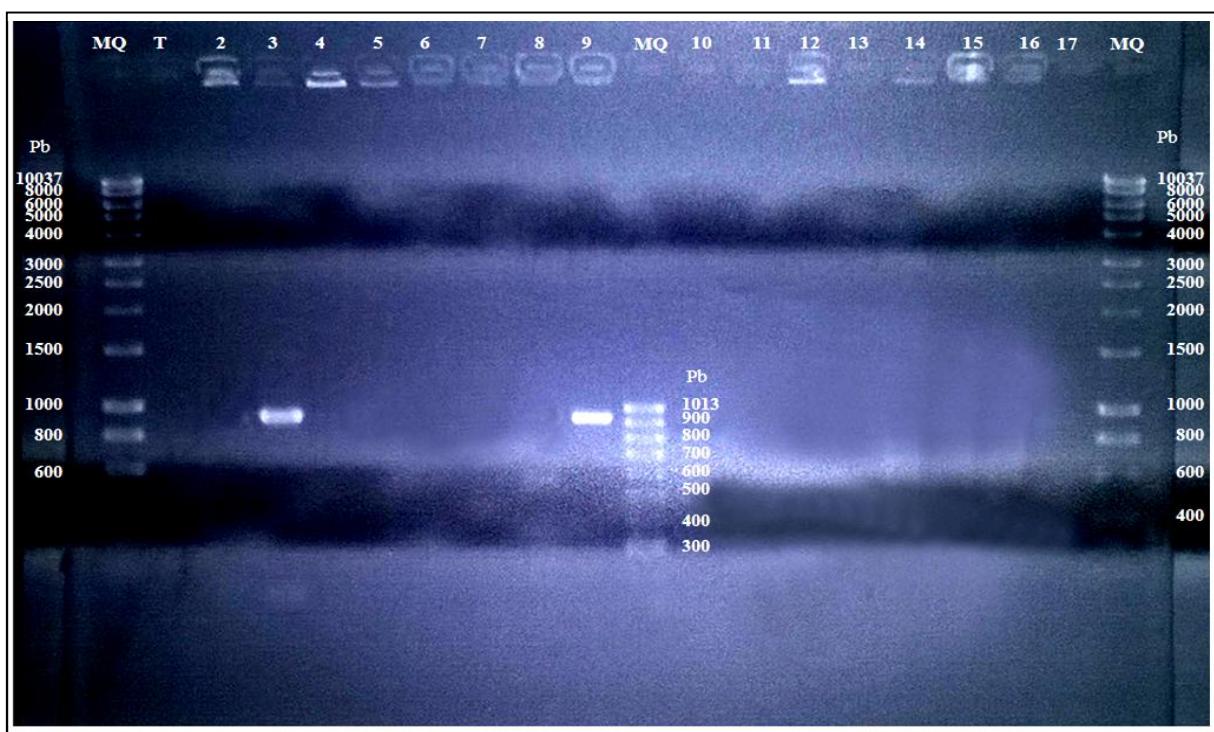
L'amplification du gene *nodC* avec le couple d'amorces utilisées nodCF-nodCI était infructueuse pour toutes les souches nodulaires à l'exception de la souche SMT8a et la souche de référence ORS639 (*Rhizobium leguminosarum*) où la présence d'une bande de 930pb est détectée (Figure 17).

L'absence de produit d'amplification est probablement due au fait que les bactéries symbiotiques ont des gènes *nod* dissemblables et l'inexistence de couples d'amorces universelles pour les gènes de nodulation (Laguerre *et al.*, 2001). De nombreuses études ont indiqué que les gènes *nodABC* sont présents chez la majorité des rhizobia étudiés (Cooper 2007), cependant, Liu *et al.* (2014) ont démontré que la souche *Rhizobium vignae* CCBAU 05176 possède un seul gène codant pour le facteur nod: *nodT*. Certaines études ont signalé l'isolement de souches ne possédant pas de gènes de nodulation à partir des nodules de légumineuses (Tokala *et al.*, 2002 ; Zakhia *et al.*, 2006 ; Kan *et al.*, 2007; Ibanez *et al.*, 2009 ; Muresu *et al.*, 2010 ; Saïdi *et al.*, 2013)

Le mécanisme par lequel ces souches intègrent les nodules est peu clair et plusieurs théories sont proposées: l'acquisition des gènes de nodulation par transfert latéral (Taghavi *et al.*, 2005), Giraud *et al.*, (2007) ont proposé que les endophytes nodulaires soient de nouvelles bactéries symbiotiques qui utilisent un dialogue moléculaire non conventionnelle pour induire la formation de nodule tel que décrit déjà pour l'association entre quelques espèces d'*Aeschynomene* et des souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques ne possédant pas de gènes *nodABC*. En effet, Okazaki *et al.* (2016) ont confirmé cette proposition en expliquant le mécanisme d'infection et en rapportant que plusieurs souches de *Bradyrhizobium* sont capables d'infecter différentes espèces d'*Aeschynomene*.

Mais l'incapacité des souches à réinfecter leur plante hôte (*Scorpiurus muricatus*) peut être en contradiction avec cette proposition dans cette étude. De plus, Muresu *et al.* (2008) ont rapporté que les nodules de *Scorpiurus muricatus* abritent plusieurs espèces en même temps.

Cette absence de gènes symbiotiques peut qualifier les isolats comme bactéries endophytes des nodules. En effet, Plusieurs travaux ont confirmé la colonisation des nodules par diverses bactéries incapables de former des nodules ou de fixer l'azote (Sprent, 2009 ; Martinez et Hirsh, 2017).



**Figure 17:** Profils obtenus de l'amplification du gène *nodC* chez les souches isolées à partir des nodules de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus*

MQ: marqueur de taille Bioline 1KB ; T : témoin négatif ; 2 : SMV26 ; 3 : SMT8a; SMT15 ; 5 : SMB18 ; 6 : SMC24 ; 7 : SMK 25a ; 8 : SMT22 ; 9 : ORS 693 ; MQ: marqueur de taille Bioline 100pb ; 10 : SMB6a ; 11 : SMV81 ; 12 : SMC15 ; 13 : SMB2 ; 14 : SMB7 ; 15 : SMV13 ; 16 : SMV20 ; 17 :SMC15

## 7. Evaluation de la diversité génétique des isolats de la collection par Rep-PCR et le séquençage de l'ADNr 16S

La diversité génétique des bactéries isolées à partir des racines et des nodules de *Scorpiurus muricatus* collectés de six régions de l'ouest algérien a été étudiée dans un premier temps par la rep-PCR qui a permis de grouper les isolats en fonction de leur polymorphisme génétique. L'ADNr 16S de 25 souches nodulaire et de 11 souches racinaires a été séquencé partiellement (930pb).

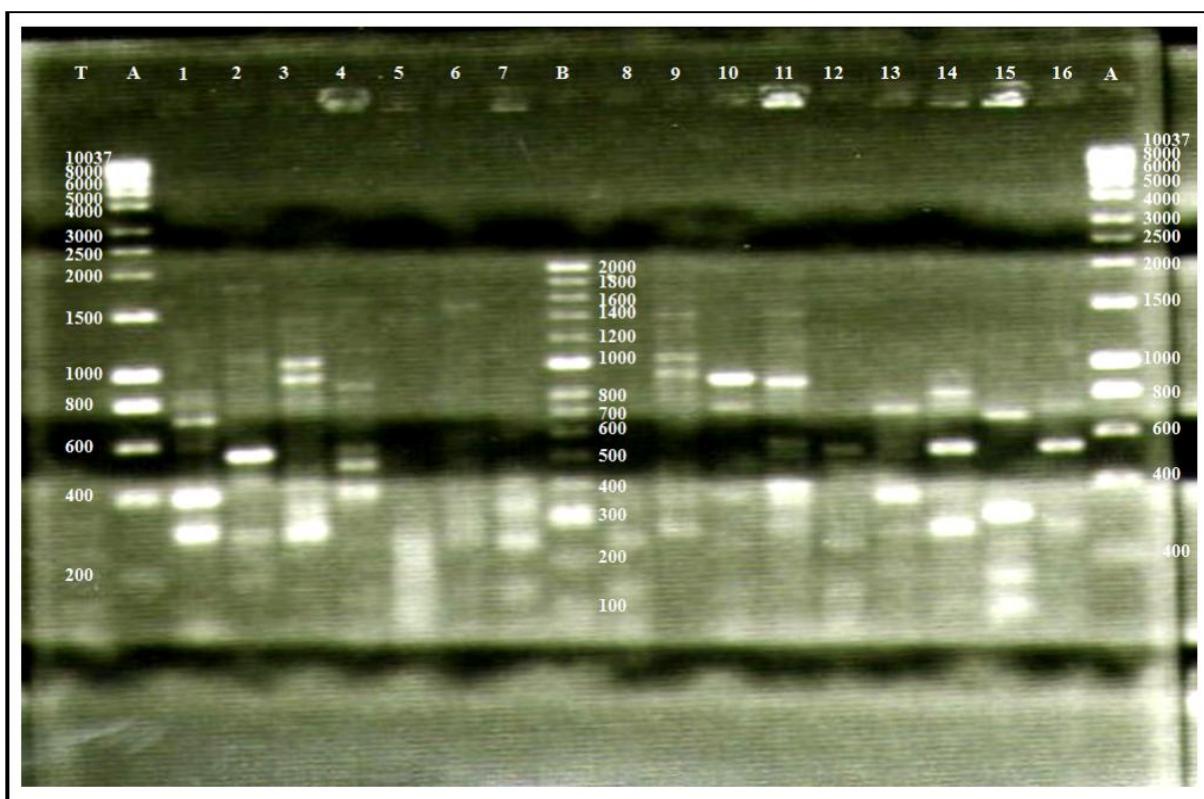
### ***Les isolats nodulaires***

La séparation électrophorétique des produits d'amplification par les amores ERIC-1R/ ERIC-2 a permis de fournir des profils exploitables pour l'ensemble des 51 isolats étudiés (Figure 18). Ces profils comportent beaucoup de fragments amplifiés de différentes tailles, allant de 100pb jusqu'à 1800pb. Toutefois la majorité des bandes montrent des poids moléculaires compris entre 100 pb et 1000 pb, dont plusieurs sont supérieurs à 400 pb. Le nombre de fragments varie de 2 à 7 par profil (Figure 18), très distincts et spécifiques à chaque isolat. Cette hétérogénéité reflète le polymorphisme moléculaire qui existe au sein de la collection d'isolats nodulaires.

Plusieurs auteurs ont utilisé cette technique pour examiner le contenu de nodosités, et pour montrer les relations phylogénétiques d'une large collection de rhizobium. Santamaria *et al.* (1999) ont utilisé cette technique pour étudier le polymorphisme au sein du genre *Bradyrhizobium* isolée des racines de *Lotus*, Konaté *et al.* (2007) l'ont appliquée pour étudier le contenu des nodules du Caroubier, Ourarhi *et al.* (2010) pour étudier les rhizobia associés à *Colutea arborescens* et Guerrouj *et al.* (2013a, b) pour analyser les rhizobia associés à *Astragalus glombiformis* et à *Medicago arborea*. La technique de rep-PCR a été aussi utilisée par Menna *et al.* (2009) pour analyser soixante huit souches appartenant aux genres *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Methylobacterium*, utilisées comme des inoculums commerciaux au Brésil.

De Bruijn *et al.* (1992) ont montré qu'il y a une corrélation entre les données de la rep- PCR et les données phylogénétiques obtenues avec la technique RFLP pour leur travail sur *Sinorhizobium meliloti*. Tandis que Selenska-Pobell *et al.* (1996) ont conclu que pour l'étude des souches de rhizobia ; la technique de la rep-PCR est plus informative et discriminante que la RFLP de l'ADNr 16S.

Le dendrogramme formé par analyse UPGMA (Figure 19) a pu fournir plus d'informations sur la variabilité spécifique des isolats. A l'exception de SMB13 avec SMB19, SMB18 avec SMB6a et SMV84 avec SMB8p qui représentent 100% de similarité, tous les autres isolats constituent des souches distinctes. Par conséquent, le nombre total de souches de la collection est équivalent à 48. Avec une similarité de 60%, les isolats sont regroupés en 9 groupes, contenant des souches provenant de sites identiques et de sites différents, certains groupes monophylétiques ne présentent qu'une seule souche ce qui souligne la grande diversité des espèces bactériennes colonisant les nodules de *S. muricatus*. En effet, le premier groupe contient 23 souches isolées de tous les sites à l'exception de la région d'El-Maleh réparties en trois sous-groupes. Le deuxième est composé de 10 souches réparties en deux sous-groupes. Le troisième groupe contient six souches divisées en deux sous-groupes, le quatrième groupe regroupe 5 souches, le cinquième comprend 2 souches, le sixième groupe est monophylétique. Le septième groupe comprend 2 souches provenant de la zone de Kristel. Les huitième et neuvième groupes sont monophylétiques.



**Figure 18:** Exemple des profils obtenus par ERIC-PCR de quelques isolats nodulaire de *S.muricatus* ssp. *sulcatus*.

T : témoin négatif ; A : marqueur de taille bioline 1KB ; B : marqueur de taille bioline p50 ; 1 : SMT7 ; 2 : SMV26 ; 3 :SMK52 ; 4 : SMT15 ; 5 : SMB18 ; 6 : SMC24 ; 7 :SMH19 ; 8 : SMT22 ; 9 : SMT8a ; 10 : SMK31C ; 11 : SMV81 ; 12 : SMC15 ; 13 : SMB19 ; 14 : SMK5a ; 15 : SMV13 ; 16 :

SMV16

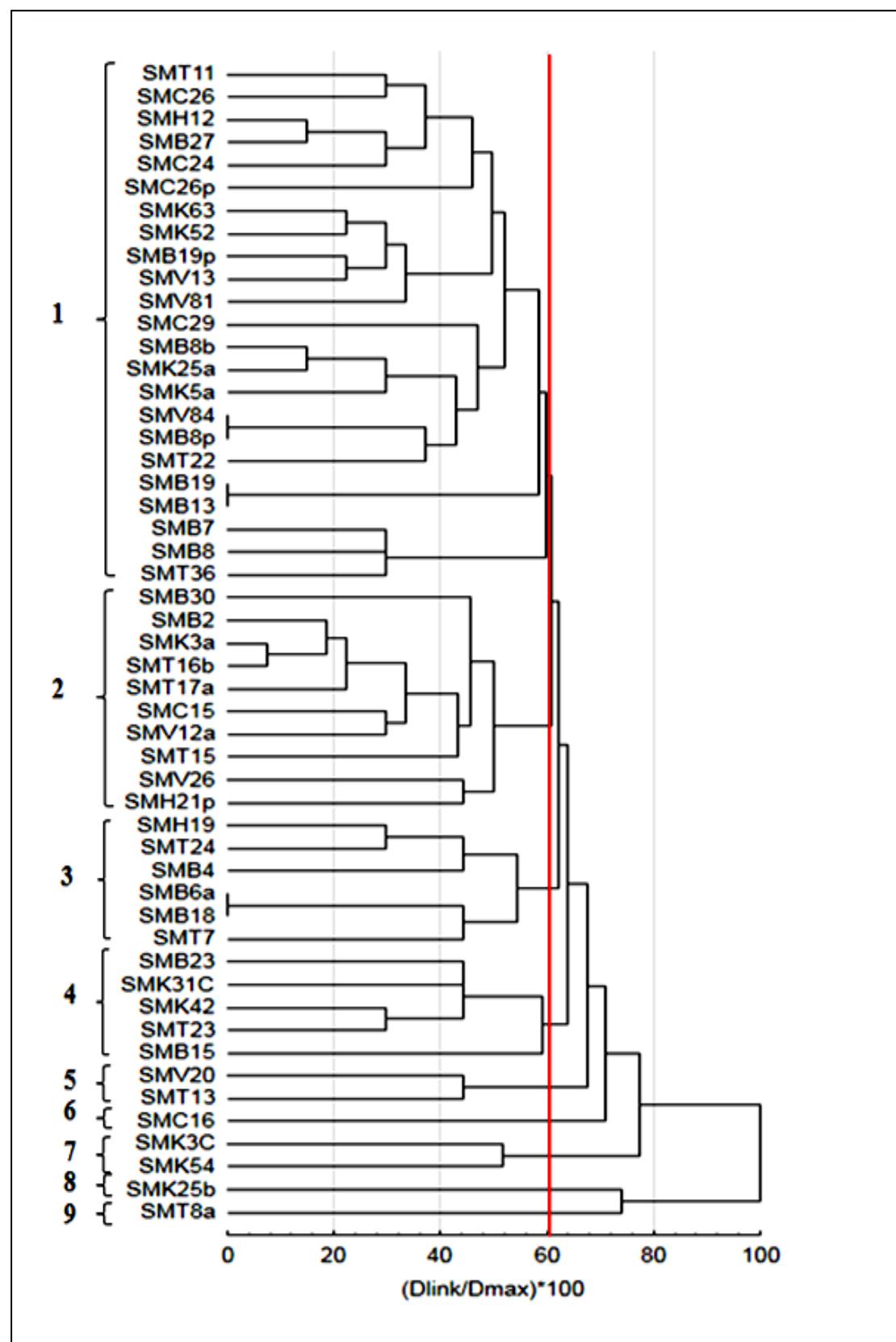


Figure 19 : Dendrogramme présentant les résultats de la rep-PCR des souches isolées à partir des nodules de *Scorpiurus muricatus*

L'ADNr 16S de 25 souches choisies au hasard et en se référant aux groupes formés par l'analyse ERIC-PCR sont amplifiés (Figure 20) et partiellement séquencés (930 pb) et analysés en utilisant le logiciel MEGA6. Les résultats d'analyse sont présentés dans un arbre phylogénétique (Figure 21). Sur la base de la comparaison des séquences obtenues par BLAST, les isolats sont affiliés à quatre genres (*Rhizobium*, *Starkeya*, *Phyllobacterium* et *Pseudomonas*). Cependant, la construction d'un arbre phylogénétique par la méthode neighbor joining, a permis le regroupement des isolats en sept groupes.

Le premier groupe proche de l'espèce *Rhizobium vignae* est constitué de 6 souches isolées à partir de différentes régions; El-Mactâa (SMC15, SMC16), Sidi Boudjnene (SMB 23, SMB 8), Nedroma (SMT22) et Kristel (SMK3a). L'espèce *R. vignae* a été décrite en tant que partenaire symbiotique de différentes légumineuses sauvages, telles que l'*Astragalus dahuricus*, *Astragalus oxyglottis* (Zhao *et al.*, 2008), *Vigna radiata* (Zhang *et al.*, 2006) et *Desmodium microphyllum* (Gu *et al.*, 2007).

Le deuxième cluster regroupe une souche (SMK31C) isolée à partir de Kristel et proche de *Rhizobium nepotum*. Cette espèce a été isolée à partir de tumeurs sur diverses espèces végétales en Hongrie (Puławska *et al.*, 2012).

Le troisième groupe inclut trois isolats SMT15, SMH12, SMH21p isolés respectivement de Tlemcen et d'El-Maleh, proches de *Rhizobium radiobacter*. *Agrobacterium* a été reclassé dans le genre *Rhizobium* (Young *et al.*, 2001), est considéré comme étant l'endophyte le plus répandu dans les nodules de légumineuses et le mieux étudié (Peix *et al.*, 2012 ; Velazquez *et al.*, 2013). Les nodules des légumineuses herbacées telles que *Melilotus dentatus*, *Crotalaria pudica*, *Trifolium fragiferum*, *Hedysarum spinosissimum* et *Glycine max* abrite des espèces appartenant au genre *Agrobacterium* (Wang *et al.*, 2006; Kan *et al.*, 2007; Muresu *et al.*, 2008).

Le quatrième groupe proche de l'espèce *Rhizobium leguminosarum* est composé de cinq souches, deux souches de Sidi Boudjnene (SMB30, SMB2), une souche d'El Mactaa (SMC24), une souche de Nedroma (SMT17a) et une souche de Messerghin (SMV12a). Plusieurs auteurs ont montré que *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* est isolée à partir des nodules de genres *Pisum*, *Vicia*, *Lens* et *Lathyrus* (Laguerre *et al.*, 2003; Depret et Laguerre, 2008).

Le cinquième groupe comprend trois souches provenant de Tlemcen et de Kristel (SMT8a, SMT13 et SMK54). La souche SMT8a est proche de *Pyllobacterium ifriqiyyense*; tandis que les souches SMK54 et SMT13 sont proches de *Phyllobacterium endophyticum*. Le genre *Phyllobacterium* comprend des souches induisant des nodules infectieux sur les racines de *Trifolium pratense* (Sturz *et al.*, 1997) et *Lupinus albus* (Valverde *et al.*, 2005) et *Dalbergia louvelli* (Rasolomampianina *et al.*, 2005). Les espèces du genre *Phyllobacterium* sont signalées par Zakhia *et al.* (2006) comme endophytes des nodules de *Agyrolobium*, *Astragalus*, *Calycotome* et *Lathyrus* en Tunisie et *Oxytropis* et *Glycyrrhiza* en Chine (Lei *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2012).

*Phyllobacterium ifriqiyyense* a été isolé pour la première fois dans le sud de la Tunisie à partir de nodules racinaires de *Lathyrus numidicus* et *Astragalus algerianus* (Mantelin *et al.*, 2006), et *Phyllobacterium endophyticum* à partir de nodules racinaires de *Phaseolus vulgaris* mais n'était pas en mesure d'induire la formation de nodules (Flores-Félix *et al.*, 2013).

Le sixième groupe composé de souches provenant de Misserghin (SMV81, SMV13), de Nedroma (SMT24) et de Kristel (SMK52), sont affiliées au genre *Starkeya* (96% de similitude) et sont loin des autres espèces connues de ce genre *Starkeya korensis* et *S. novella*. Cette dernière a été isolée à partir de nodules de *Retama retam* et *Macroptilium* dans la zone semi-aride de la Tunisie (Zakhia *et al.*, 2006).

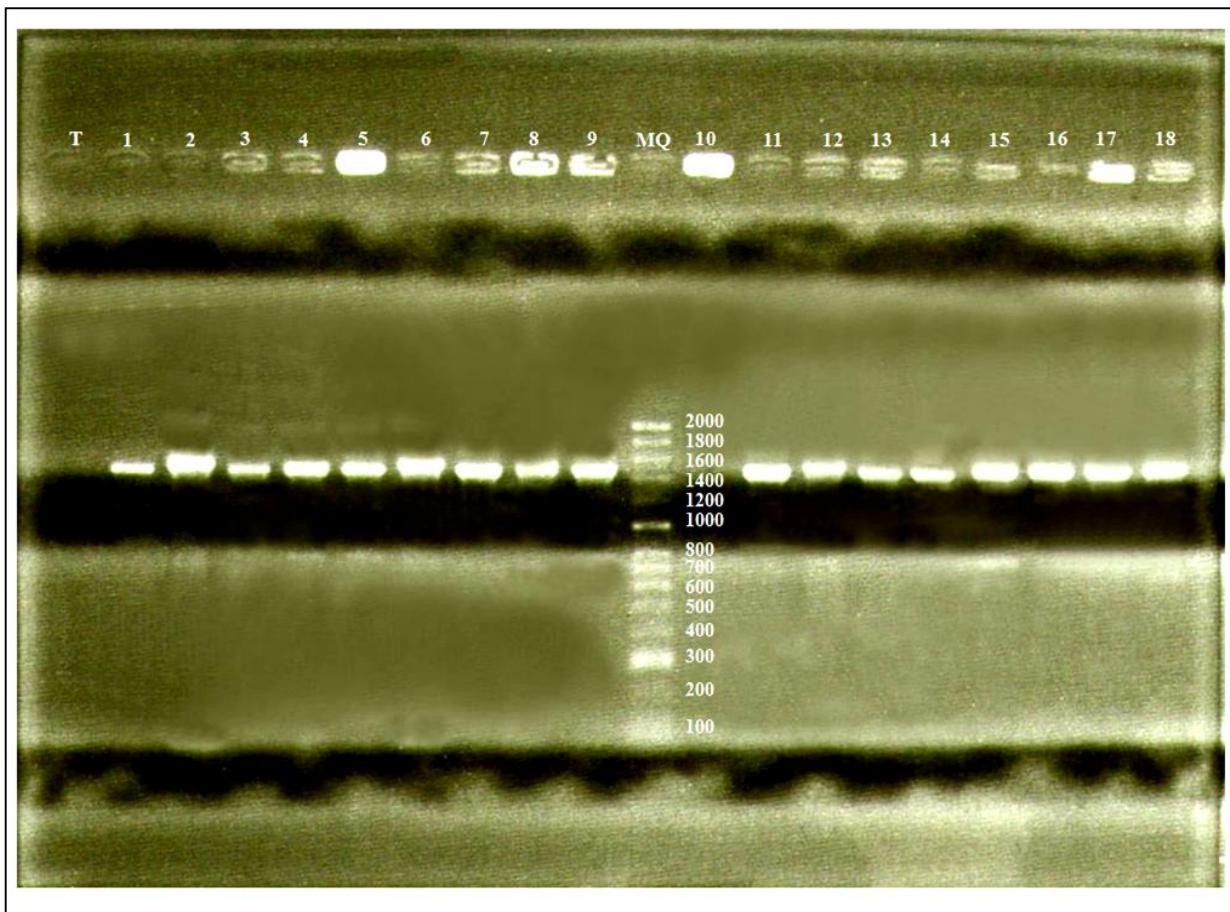
Le dernier groupe constitué par les souches SMB18, SMT36 et SMC 29 isolées respectivement des régions de Sidi Boudjnene, de Nedrouma et de Mactaa est regroupé avec le genre *Pseudomonas*. Les espèces de ce genre ont été décrites comme endophytes nodulaires chez plusieurs espèces de légumineuses *Hedysarum* (Benzhizia *et al.*, 2004) en Algérie, *Medicago truncatula* et *Hedysarum carnosum* en Tunisie (Zakhia *et al.*, 2006). En Chine, Deng *et al.* (2011a) ont isolés l'espèce *P. fluorescens* à partir des nodules de *Sphaerophysa salsula*. Toutefois il faut signaler que certaines espèces du genre *Pseudomonas* pourraient induire la formation des nodules sur les racines des légumineuses (Shiraishi *et al.*, 2010).

Peu d'études ont été réalisées sur des bactéries nodulaires de *Scorpiurus muricatus*. Muresu *et al.* (2008) ont rapporté après le séquençage direct du contenu des nodules, la présence de bactéries appartenant aux genres *Mesorhizobium*, *Bacillus* et *Thiobacillus*. Sur la base de l'analyse PCR-RFLP, les isolats rhizobiens isolés de *Scorpiurus muricatus* en Sardaigne étaient groupé avec *Mesorhizobium loti* (Safranova *et al.*, 2004), toutefois en se basant sur l'analyse des profils RFLP de l'ADNr 16S-23S IGS, ils ont montré que les niveaux de

similarité entre les isolats rhizobiens des nodules de *Scorpiurus muricatus* et les souches de références *Rhizobium leguminosarum*, *Mesorhizobium loti*, *M. ciceri*, *M. mediterraneum*, *Sinorhizobium meliloti* et *Bradyrhizobium japonicum* ne dépassaient pas 30% de similarité. Le résultat de cette étude permet de supposer que les souches isolées à partir de l'ouest de l'Algérie étaient plus diversifiée que ce qui a été rapporté par la littérature.

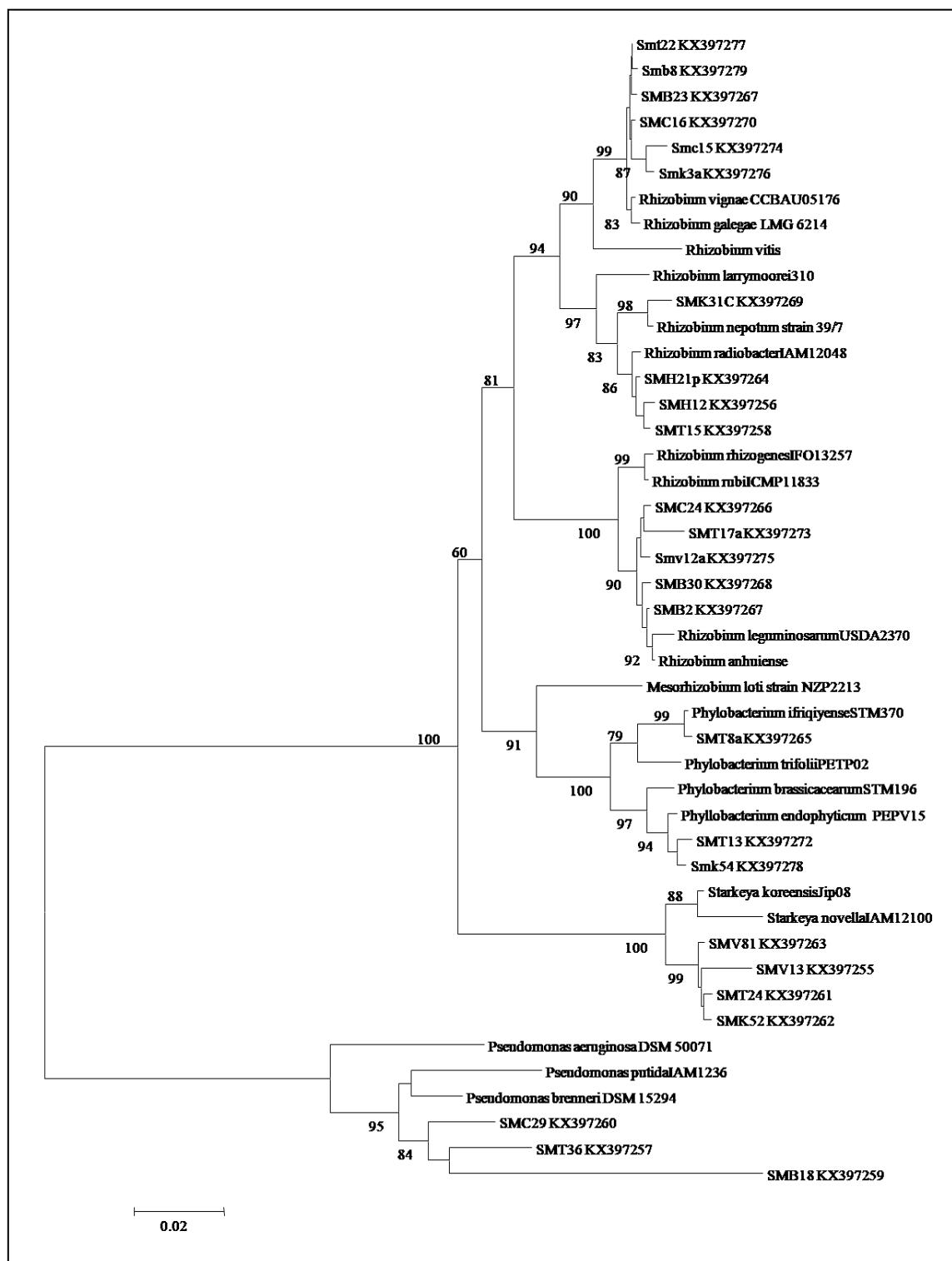
Malgré que les résultats du séquençage du gène codant pour l'ARNr16S ont montré que plusieurs souches colonisant les nodules de *S. muricatus* ssp. *sulcatus* appartiennent à des espèces connues pour leur caractère symbiotique comme *Rhizobium leguminosarum* « symbiovar *viciae* », *Rhizobium vignae* et *Phyllobacterium ifriqiyyense*, étaient incapables de former des nodules sur les racines de leur plante hôte. De plus, le gène *nodC* n'a été détecté que chez la souche SMT8a affiliée à *Phyllobacterium ifriqiyyense*.

Ces dernières années, différentes études rapportent la présence de bactéries appartenant à des genres autres que les rhizobia à l'intérieur des nodules des légumineuses, et constituent avec les bactéries symbiotiques le microbiome nodulaire (Martinez, et Harsh, 2017). Ces bactéries endophytes sont obtenus à partir des nodules d'un large éventail d'espèces de légumineuses, dont la plus part appartiennent aux genres *Pantoea*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Paracoccus*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*, *Starkeya* et en particulier les souches d'*Agrobacterium* (Sturz *et al.*, 1997 ; Palumbo *et al.*, 1998 ; de Lajudie *et al.*, 1999 ; Han *et al.*, 2005 ; Mhamdi *et al.*, 2005 ; Muresu *et al.*, 2008 ; Ben Romdhane *et al.*, 2009 ; Saidi *et al.*, 2011 ; Maheshwari *et al.*, 2017).



**Figure 20 :** Exemple des résultats d'amplification de l'ADNr16s des souches nodulaires de *Scorpis muricatus* ssp. *sulcatus*

MQ : marqueur de taille Bioline 50pb ; T : témoin négatif ; 1 : SMB18 ; 2 : SMK52 ; 3 : SMB30 ; 4 : SMV12a ; 5 : SMK25a ; 6 : SMT8a ; 7 : SMC24; 8 : SMB23 ; 9 : SMT22 ; 10 : SMH12 ; 11 :SMT15 ; 12 : SMC15 ; 13 : SMK54 ; 14 :SMK3a ; 15 SMC16 ; 16 : SMV81 ; 17 : SMH21p ; 18 : SMT36.



**Figure 21:** Arbre phylogénétique après analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr16S (>900 pb) des nouvelles souches isolées et des souches de références; construit par la méthode Neighbor-Joining intégrant la distance de Kimura 2. Les données sont des valeurs bootstrap issues de 1000 répétitions.

Dans cette étude, la comparaison entre le regroupement Eric-PCR et le séquençage partiel de l'ADNr16S ne reflète pas une diversité génétique intra-spécifique telle que rapporté par Laguerre *et al.* (1997). En effet, certaines souches appartenant à la même espèce sont groupées dans des clusters différents et même un seul cluster regroupe des espèces différentes voir genres différents (Tableau 8).

Différents travaux ont confirmé la puissance de la technique (rep-PCR) dans les empreintes génétiques et la détection de faibles différences entre les souches et dans l'étude de la diversité génétique parmi les souches de rhizobium (Judd *et al.*, 1993). De Bruijn *et al.* (1996) ont démontré la reproductibilité de la rep-PCR pour déduire les relations phylogénétiques entre souches tout en permettant une différenciation au niveau espèce, sous espèce et souche et d'étudier leur diversité dans des écosystèmes variés. Cependant plusieurs auteurs ont rapporté qu'il y a une pauvre concordance entre la rep-PCR et la taxonomie des espèces rhizobiennes (Laguerre *et al.*, 1997 ; Mostasso *et al.*, 2002 ; Fernandes *et al.*, 2003 ; Grange et Hungria, 2004 ; Hungria *et al.*, 2006). La difficulté d'utilisation des profils (rep-PCR) pour le groupement ou la définition des espèces et même de genres de rhizobia tropicaux utilisées comme inoculum commercial est également indiqué par Menna *et al.* (2009).

**Tableau 8 :** Les caractéristiques moléculaires des souches isolées à partir des nodules de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* (fait le 06/08/2016).

Souches	Groupe rep-PCR	% de similarité des séquences partielle de l'ADNr16S (930pb) par Blast	Numéro d'accession
SMC26	01		
SMC26p			
SMC24		<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370	KX397266
SMC29		<i>Pseudomonas brenneri</i> DSM 15294	KX397260
SMK5a			
SMK63			
SMH12		<i>Rhizobium radiobacter</i> IAM12048	KX397256
SMK52		<i>Starkeya novella</i> IAM12100	KX397262
SMK5a			
SMK25a			
SMV81		<i>Starkeya novella</i> IAM12100	KX397263
SMV84			
SMV13		<i>Starkeya novella</i> IAM12100	KX397255
SMT11			
SMT36		<i>Pseudomonas brenneri</i> DSM 15294	KX397257

SMT22		<i>Rhizobium vignae</i> CCBAU05176	KX397277
SMB19			
SMB7			
SMB8p			
SMB19p			
SMB8		<i>Rhizobium vignae</i> CCBAU05176	KX397279
SMB27			
SMB13			
SMB8b			
SMH21p	02	<i>Rhizobium radiobacter</i> IAM12048	KX397264
SMC15*		<i>Rhizobium vignae</i> CCBAU05176	KX397274
SMK3a		<i>Rhizobium vignae</i> CCBAU05176	KX397276
SMV26			
SMV12a		<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370	KX397275
SMT17a		<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370	KX397273
SMT15		<i>Rhizobium radiobacter</i> IAM12048	KX397258
SMB30		<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370	KX397268
SMB2		<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370	KX397271
SMT16b			
SMH19	03		
SMT24		<i>Starkeya novella</i> IAM12100	KX397261
SMB4			
SMB18		<i>Pseudomonas sp</i>	KX397259
SMB6a			
SMT7			
SMK31C	04	<i>Rhizobium nepotum</i> strain 39/7	KX397269
SMK42			
SMT23			
SMB23		<i>Rhizobium vignae</i> CCBAU05176	KX397267
SMB15			
SMV20	05		
SMT13		<i>Phyllobacterium endophyticum</i> PEPV15	KX397272
SMC16	06	<i>Rhizobium vignae</i> CCBAU05176	KX397270
SMK3C	07		
SMK54		<i>Phyllobacterium endophyticum</i> PEPV15	KX397278
SMK25b	08		
SMT8a	09	<i>Phyllobacterium ifriqiyyense</i> STM370	KX397265

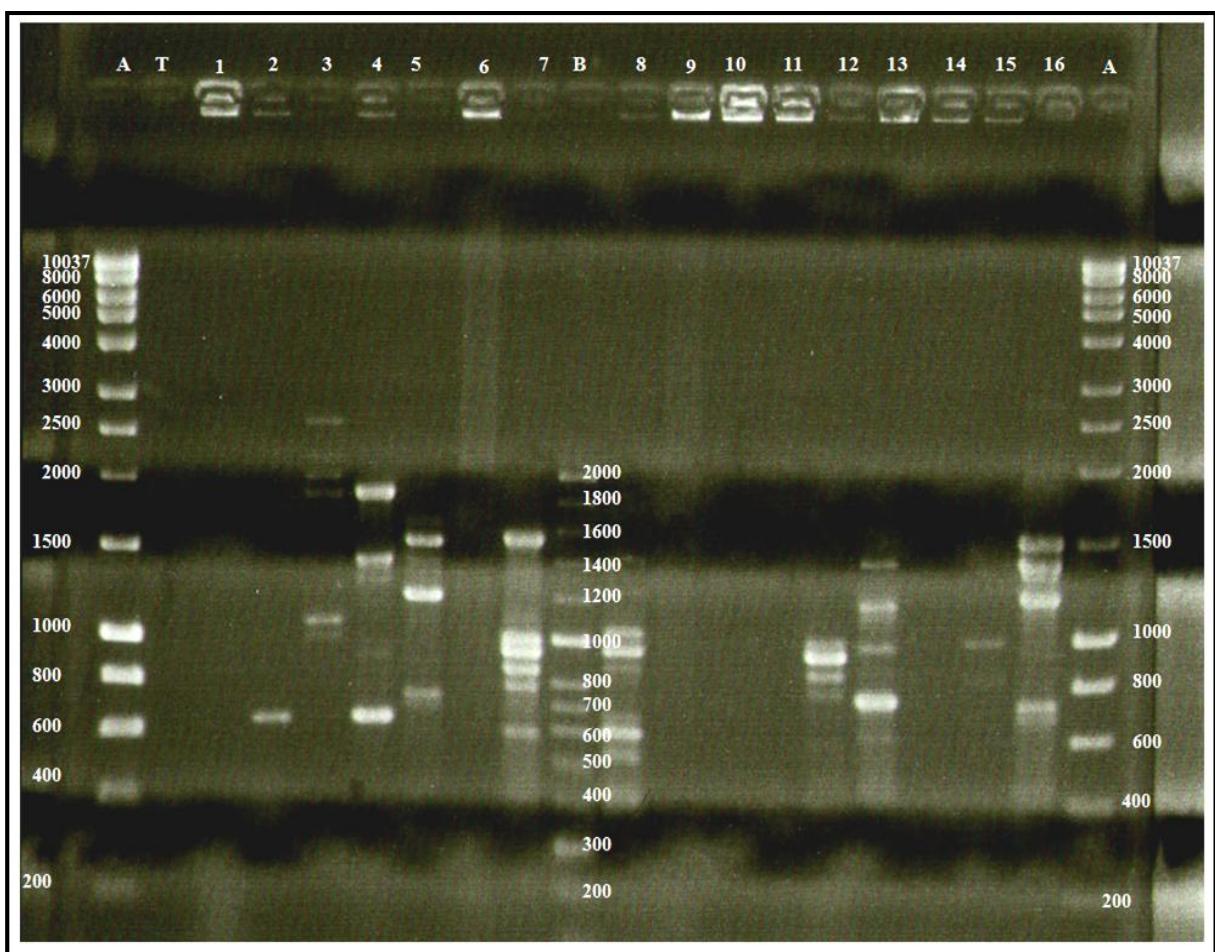
### **Les isolats racinaires**

Avec les amores ERIC1/ERIC2, Aucune amplification de l'ADN génomique n'a été observée. Alors qu'avec l'amorce BOX, l'ADN de 22 souches a été amplifié, dont treize isolats provenant de la région d'EL-Maleh et neuf de la région de Sidi Boudjnene (Figure 22).

La séparation électrophorétique des produits d'amplification par l'amorce BOX a permis de fournir des profils exploitables pour l'ensemble des 22 isolats. Ces profils comportent beaucoup de fragments amplifiés de différentes tailles, allant de 380 pb à 2600 pb. Cependant, la majorité des bandes montrent des poids moléculaires variant entre 520 pb et 1900 pb. Le nombre de fragments varie de 1 à 11 par profil (Figure 22) avec une grande partie des profils comportant 9 bandes. Les profils sont très distincts et spécifiques à chaque isolat. Cette hétérogénéité reflète le polymorphisme moléculaire qui existe au sein de la collection d'isolats racinaires. Cependant, en utilisant la même amorce BOX d'autre auteurs ont révélé des fragments d'ADN dont la taille varie de 250 à 5000 pb de souches associées aux plantes (De Bruij, 1992; Maâtallah, 2003; Spigalia et Mastratonior, 2003 ; Bennani, 2004).

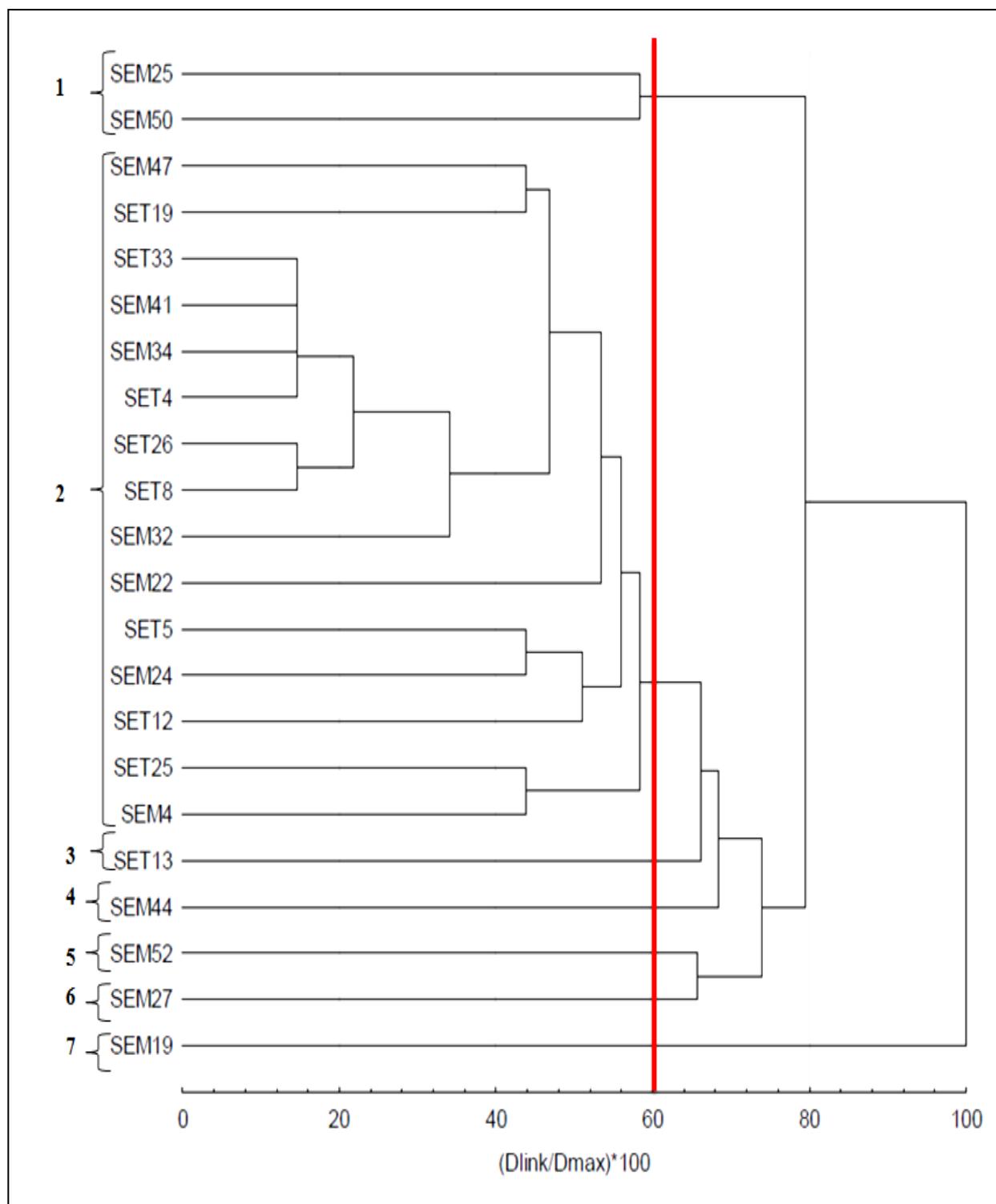
L'analyse des empreintes génomiques BOX/PCR par la méthode UPGUMA a donné lieu à la construction d'un dendrogramme (Figure 23). Ce dernier révèle une large diversité, consolidant ainsi le polymorphisme précédemment révélé par l'observation directe des profils électrophorétiques. En fonction d'un niveau de similarité de 60%, les 22 isolats sont regroupés en 7 clusters. Le premier cluster comporte 2 isolats groupés ensemble, alors que le deuxième groupe comporte 15 isolats répartis en 4 sous-groupes et les autres groupes sont monophylétiques et ne comportent qu'un seul isolat.

La technique Rep-PCR a été appliquée avec succès à la caractérisation des isolats de *Frankia* (Murry *et al.*, 1995), *Xanthomonas* sp. (Louws *et al.*, 1995), *Pseudomonas* sp. (Lisek *et al.*, 2011) et *Bacillus thuringinesis* (Reyes-Ramirez et Ibarra, 2005 ; da Silva et Valicente, 2013).



**Figure 22:** Exemple des profils obtenus par BOX-PCR de quelques isolats racinaires de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus*.

T : témoin négatif , A : marqueur de taille Bioline 1KB , B : marqueur de taille Bioline p50 , 1 : SEM47 , 2 : SET33 , 3 :SEM41 , 4 : SEM4 , 5 : SET12 , 6 :SET8, 7 :SEM25 , 8 : SEM50 , 9 : SEM32 , 10 : SET26 , 11 : SEM24 , 12 : SET4 , 13 : SEM34 , 14 : SEM19 , 15 : SET13 , 16 : SEM52



**Figure 23 :** Dendrogramme présentant les résultats de la BOX-PCR des souches isolées à partir des racines de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus*

L'identification des bactéries est principalement basée sur le séquençage et l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S (Woese *et al.*, 2000) et par conséquent, cette méthode est la plus couramment utilisée pour l'identification des bactéries endophytes (Hardoim *et al.*, 2015). De ce fait l'ADNr16S de 11 isolats de la collection des endophytes racinaires est amplifié (Figure 24) et partiellement séquencé (930pb). La comparaison du résultat du séquençage avec la base de donnée BLAST a permis d'affilier les isolats racinaires à 7 genres différents : *Pseudomonas*, *Phyllobacterium*, *Xanthomonas*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Microbacterium* et *Bacillus*. La construction d'un arbre phylogénétique par la méthode neighbor-joining a permis de grouper les souches en 7 groupes (Figure 25).

Le premier groupe comprend les souches SEM25, SEM50, SET12 et SET13 et proche des espèces du genre *Pseudomonas*. Les espèces de ce genre ont été signalées comme endophytes des racines de plusieurs plantes comme *Medicago sativa* (Gagné *et al.*, 1987), *Trifolium pratense* (Sturz *et al.*, 1997), *Populus spp.* (Taghavi *et al.*, 2009), *Olea europaea L.* (Cabanás *et al.*, 2014).

Le deuxième cluster inclut deux souches isolées des racines de *S. muricatus* provenant de la région de Sidi Boudjnene (SET33 et SET4) proches de l'espèce *Xanthomonas theicola*, les espèces appartenant à ce genre provoquent collectivement des maladies graves chez environ 400 plantes hôtes, y compris une grande variété de cultures économiquement importantes, telles que le riz, les agrumes, la banane et le chou (Ryan *et al.*, 2011)

Le troisième groupe est composé d'une seule souche SEM 22, proche des espèces du genre *Achromobacter*. Ce genre comprend des espèces isolées à partir des racines de *Helianthus annus* (Forchetti *et al.*, 2007), de *Phragmites australis*, de *Ipomoea aquatica* (Ho *et al.*, 2012) et d'*Ipomoea batatas* (L.) Lam. (Dawwam *et al.*, 2013)

Le quatrième groupe est formé d'une seule souche isolée de la région d'El-Maleh (SEM44), proche de l'espèce *Phyllobacterium ifriqiense*. les bactéries appartenant au genre *Phyllobacterium* ont été signalées comme endophytes associés au trèfle des près (*Trifolium pratense*), le maïs (*Zea mays*), le cotonnier (*Gossypium hirsutum*) (Hallmann *et al.*, 1997; Sturz *et al.*, 1997), ou encore *Thlaspi caerulescens* (Lodewyckx *et al.*, 2002).

Le cinquième cluster comporte une seule souche SET25 isolée de la région de Sidi Boudjnene est proche de l'espèce de *Agrobacterium nepotum*.

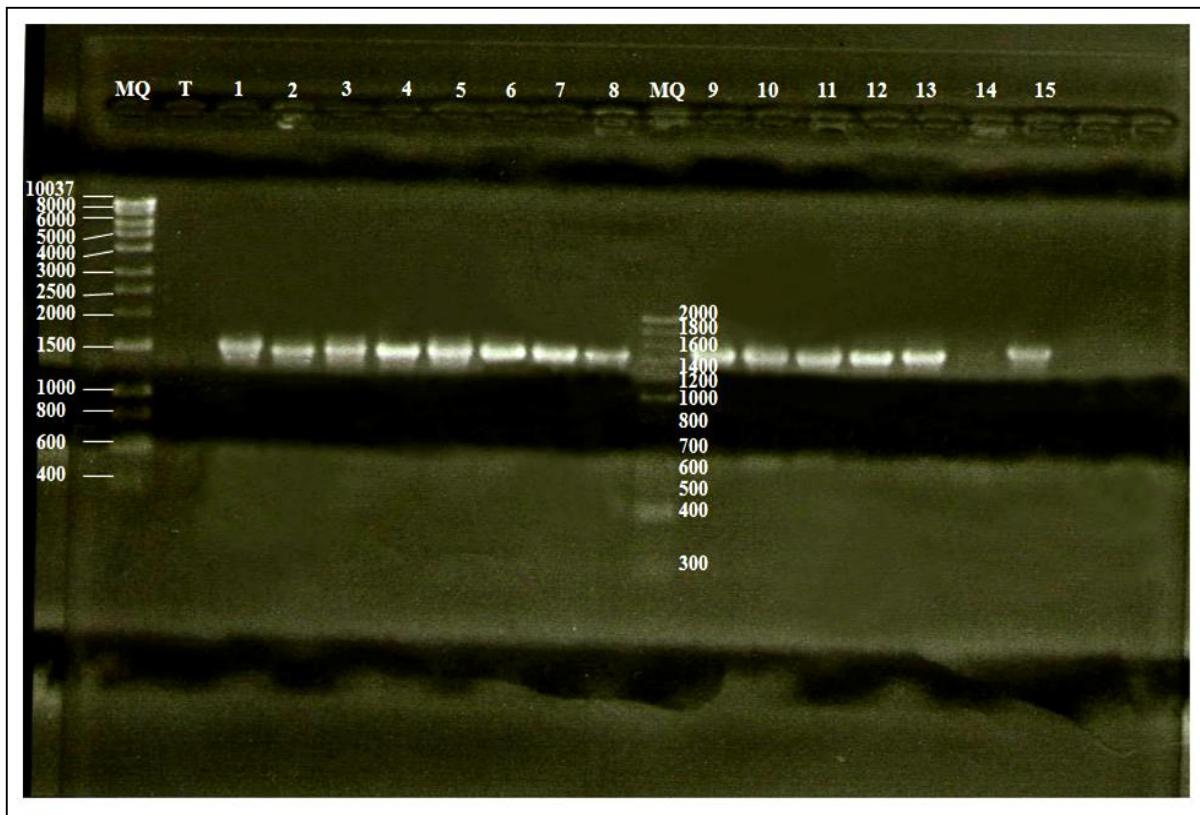
Le sixième groupe proche de l'espèce *Microbacterium maritypicum*, contient une seule souche SET8. Cette espèce est isolée pour la première fois par Takeuchi et Hatano (1998) à partir du sol rhizosphérique de la mangrove dans les régions tropicales. Certaines espèces de *Microbacterium* sont isolées à partir des racines de *Halimione portulacoides* (Alves *et al.*, 2015), *Zea mays* (Gao *et al.*, 2017).

Le dernier groupe formé par la souche SEM32 proche de l'espèce *Bacillus simplex*. Cette espèce a été isolée à partir des racines de différentes plantes : maïs, pastèque, poivre et tomate (Xia *et al.*, 2015). Plusieurs études ont rapportées que différentes espèces du genre *Bacillus* sont des endophytes des racines de plusieurs plantes : *Trifolium pratense* (Sturz *et al.*, 1997), *Glycine max* (Bai *et al.*, 2002), *Helian annus* (Forchetti *et al.*, 2007), *Amorphophallus konjac* (Deng *et al.*, 2011), *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (Dawwam *et al.*, 2013) *Polygonum cuspidatum* (Sun *et al.*, 2013)

Un grand nombre de différentes espèces bactériennes de la rhizosphère, appartenant à des genres différents ont été isolées à partir de tissus des légumineuses. En effet, Gagne *et al.* (1987) ont trouvé des bactéries dans le xylème des racines de luzerne, Sturz *et al.* (1997 ; 1998) ont rapporté que le trèfle rouge renferme 22 espèces réparties d'une manière systémiques dans toute la plante, Dong *et al.* (2003) ont démontré que les entérobactéries pouvaient avoir une invasion interne des tissus de *Medicago sativa* et de *M. truncatula*. Elvira-Recuenco et Van Vuurd (2000) ont constaté que *Pantoea agglomerans* et *Pseudomonas fluorescens* étaient les endophytes les plus présent dans divers cultivars de pois. Différentes espèces bactériennes appartenant à différents genres ont été également signalées: *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Chryseomonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavimonas*, *Pseudomonas* et *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrium* (Gagne *et al.*, 1987; Sturz *et al.*, 1997, Zeghloul *et al.*, 2016). Trabelsi *et al.* (2017) ont démontré que les racines de *Vicia faba* sont colonisés par les Actinobactéries et les Proteobactéries particulièrement les Beta-Proteobactéries. les *Sphingomonadaceae*, *Methylobacteriaceae* ont été signalé comme endophytes de différentes plantes (Idris *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2010 ; López- López *et al.*, 2010)

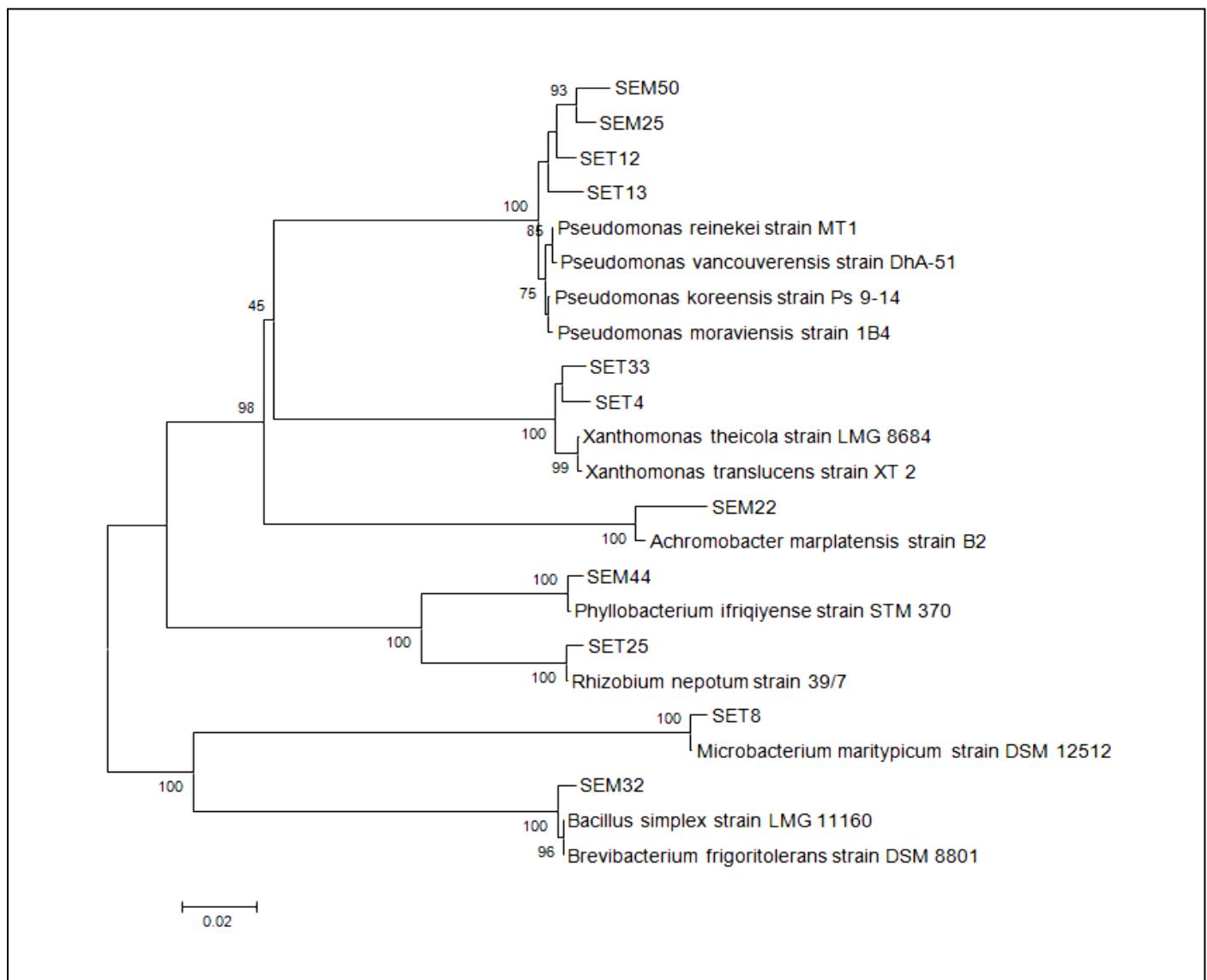
Auparavant, l'établissement d'une association endophytique avec les plantes légumineuses ou non légumineuses, notamment les graminées, a été assigné à certaines bactéries du sol, telles que *Beijerinckia* (Döbereiner et Castro, 1955), *Bacillus* (Gordon *et al.*, 1973), *Azospirillum* (Tarrand *et al.*, 1978), *Azoarcus* (Reinhold-Harek *et al.*, 1993), *Gluconacetobacter* (Yamada *et*

al., 1997) et *Herbaspirillum* (Baldani *et al.*, 1986a). Cependant les études récentes ont montré la grande diversité des bactéries endophytes et le rôle qu'elles peuvent jouer dans l'adaptation des plantes sauvages dans différents écosystèmes en particulier les écosystèmes dégradés (Smith, 2015). Selon Massenissini *et al.* (2014) les plantes spontanées présentent une plus grande dépendance à l'égard des endophytes que les plantes cultivées, ce qui facilite leur installation dans des écosystèmes extrêmes.



**Figure 24 :** Exemple des résultats d'amplification de l'ADNr16s des souches racinaires de *Scorpisurus muricatus* ssp. *sulcatus*

MQ1 : marqueur de taille Bioline 1kb ; MQ2 : marqueur de taille Bioline 50pb ; T : témoin négatif ; 1 : SET25 ; 2 : SEM50 ; 3 : SEM32 ; 4 : SEM25 ; 5 : SET8 ; 6 : SET12 ; 7 : SEM22 ; 8 : SET13 ; 9 : SMT22 ; 10 : SEM44 ; 11 :SET33 ; 12 : SET4 ; 13 : SMB2 ; 14 :SMK3a ; 15 SMC15.



**Figure 25:** Arbre phylogénétique après analyse des séquences codant pour l'ARNr16S (>900 pb) des nouvelles souches isolées des racines de *S. muricatus* et des souches de références; construit par la méthode Neighbor-Joining intégrant la distance de Kimura 2. Les données sont des valeurs bootstrap issues de 1000 répétitions.

**Tableau 9 :** les caractéristiques moléculaires des souches isolées à partir des racines de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* (fait le 06/08/2016)..

Souche	Groupe rep-PCR	% de similarité des séquences partielle de l'ADNr16S (930pb) par Blast
SEM25	1	<i>Pseudomonas reinekei</i> MT1
SEM50		<i>Pseudomonas vancouverensis</i> Dha-51
SEM47	2	/
SET4		<i>Xanthomonas theicola</i> LMG 8684
SET33		<i>Xanthomonas theicola</i> LMG 8684
SEM22		<i>Achromobacter marplatensis</i>
SEM32		<i>Bacillus simplex</i> LMG 11160
SET25		<i>Rhizobium nepotum</i> 39/7
SET12		<i>Pseudomonas koreensis</i> PS9-14
SET5		/
SEM4		/
SET19		/
SET26		/
SEM41		/
SEM34		/
SET8		<i>Microbacterium maritypicum</i> DSM 12512
SEM24		/
SET13	3	<i>Pseudomonas koreensis</i> PS9-14
SEM44	4	<i>Phyllobacterium ifriqiyyense</i> SMT370
SEM52	5	/
SEM27	6	/
SEM19	7	/

## 8. Evaluation des caractéristiques PGP des souches isolées de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus*

Les interactions entre les plantes et les bactéries se traduisent par des processus symbiotiques, endophytes ou pathogènes avec des sources microbiennes distinctes se trouvant à proximité autour des racines et à partir du sol environnant. Ces microorganismes procurent à la plante beaucoup d'avantages et contribuent à l'amélioration de sa croissance à travers plusieurs mécanismes tels que la synthèse des phytohormones comme l'Acide Indole-3-Acétique, l'amélioration de la nutrition minérale par la solubilisation du phosphate et la sécrétion des sidérophores (Bastian *et al.*, 1998 ; Rosenblueth et Martínez-Romero, 2006 ; Gaiero *et al.* .., 2013 ; Lebeis, 2014).

Dans ce travail la capacité des souches à solubiliser le phosphate inorganique et à produire l'Acide Indole-3-Acétique est vérifiée

### 8.1.La solubilisation du phosphate

L'utilisation d'inoculum bactérien favorisant la croissance des plantes comme bio-fertilisants microbiens vivants, constitue une alternative prometteuse aux engrains chimiques et aux pesticides. La solubilisation du phosphate inorganique est l'un des principaux mécanismes de promotion de la croissance des plantes par les bactéries associées (Oteino *et al.*, 2015). En effet, les micro-organismes du sol sont impliqués dans une série de processus qui affectent la transformation de P et influencent la disponibilité subséquente de phosphate aux racines des plantes (Richardson, 2001).

La capacité des souches nodulaires et racinaires à solubiliser le phosphate est déterminée par un halo de couleur claire autour de la colonie après 7 jours d'incubation à 30 °C sur milieu Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) solide additionné de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. cet halo est considéré comme une réponse à la diminution du pH par la libération d'acides organiques (Gupta *et al.*, 1994). L'index de solubilisation de chaque souche est calculé.

#### ***Les souches nodulaires***

Les résultats ont montré qu'à l'exception de deux isolats nodulaires SMB27 et SMV81 tous les isolats ne pouvaient pas solubiliser le phosphate sur milieu solide (Tableau 10), Cependant, Gupta *et al.* (1994) ont montré que certaines souches ont la capacité de solubiliser le phosphate en milieu liquide, bien qu'elles ne produisent pas de halo visible sur boîte. D'où la nécessité de confirmer ces résultats sur milieu liquide.

Dudeja (2016) a rapporté que les espèces appartenant aux genres *Rhizobium* et *Pseudomonas* sont considérées comme les espèces solubilisatrices les plus efficaces, Mais dans cette étude, aucune des souches appartenant à ces genres sont en accord avec cette observation. En fait, ce n'est pas toutes les souches de *Pseudomonas* qui ont une bonne capacité de solubilisation des phosphates, et beaucoup d'autres bactéries du sol sont considérées comme plus efficaces dans la solubilisation des phosphates, comme *Bacillus* et *Enterobacter* (Jain et Kichi, 2014).

La capacité des rhizobia à solubiliser le phosphate est bien connue depuis longtemps (Chabot *et al.*, 1996a ; Rodríguez et Fraga, 1999 ; Peix *et al.*, 2001). Différentes études l'ont rapporté pour certaines souches de *R. leguminosarum* (Chabot *et al.*, 1996 ; Flores-Félix *et al.*, 2013). Néanmoins, les espèces du genre *Mesorhizobium* sont les solubilisants phosphatés les plus actifs au sein des rhizobia (Peix *et al.*, 2001, Rivas *et al.*, 2006)

La capacité à solubiliser le phosphate a été largement observée dans les endophytes de nodules de légumineuses (Palaniappan *et al.*, 2010 ; Rajendran *et al.*, 2012b ; Aserse *et al.*, 2013 ; Saïdi *et al.*, 2013 ; Pandya *et al.*, 2015 et Saini *et al.*, 2015).

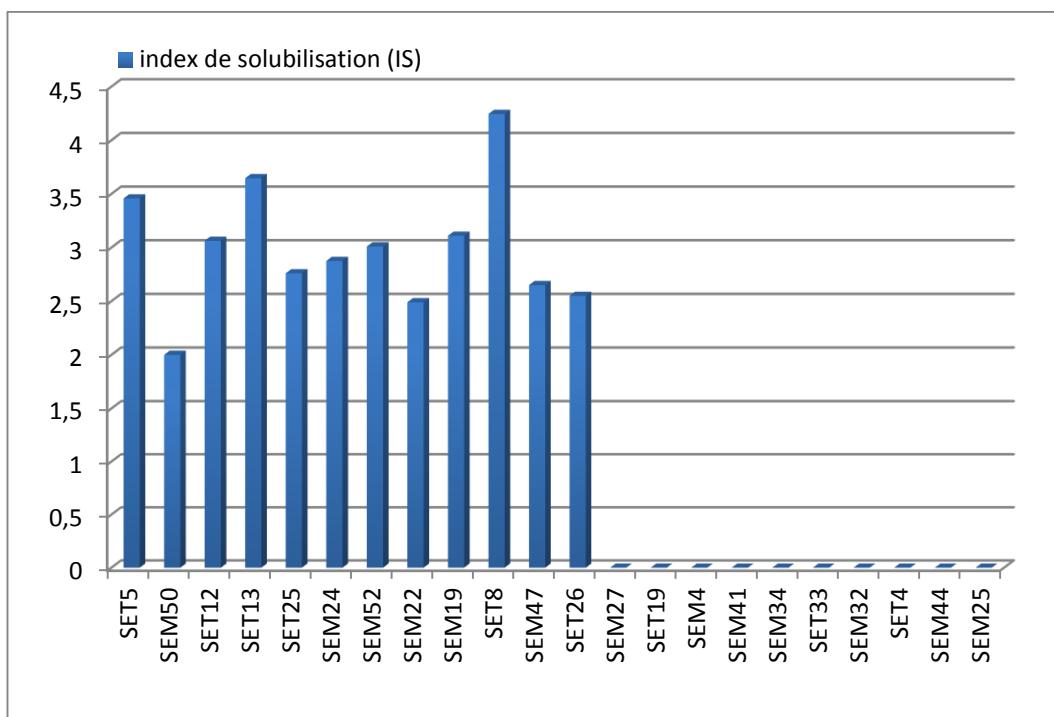
### ***Les souches racinaires***

Parmi les 22 souches étudiées, 12 souches ont la capacité de solubiliser le phosphate en milieu solide (Figure 26). Elles avaient des index de solubilisation qui varient entre 2 et 4,25 (Figure 27). La souche SET8 (*Microbacterium maritypicum*) présente l'index de solubilisation le plus élevé. Les autres souches qui solubilisent le phosphate sont : SET12 (*Pseudomonas koreensis*), SET25 (*Rhizobium nepotum*), SEM50 ; SET13 (*Pseudomonas* sp.) et SEM22 (*Achromobacter* sp.), SET5, SEM24, SEM52, SEM19, SEM47, SET26. Tandis que les souches identifiées comme *Xanthomonas theicola* (SET33, SET4), *Phyllobacterium ifriqiense* (SEM44) et *Pseudomonas* sp. (SEM25) ainsi que *Bacillus simplex* (SEM32) ne peuvent pas solubiliser le phosphate en milieu solide. Même si que les espèces appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* sont connues pour leur capacité à solubiliser le phosphate (Jain et Kichi, 2014).

Borah *et al.* (2017) ont pu isoler à partir des racines de *Oryza sativa* des endophytes capables de solubiliser le phosphate, identifiés comme : *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas putida*, *Brevibacillus agri*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus megaterium*.



**Figure 26:** Activité de solubilisation de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  par la souche **SET8** sur gélose Pikovskaya additionnée de bleu de bromophénol après 7 jours d'incubation à 30°C.



**Figure 27:** Indice de solubilisation du phosphate des souches logées dans les racines de *S. muricatus* ssp. *sulcatus* sur milieu solide

## 8.2. La production d'AIA

La capacité à produire l'AIA pourrait être considérée parmi les principaux critères du criblage des bactéries endophytes (Etesami *et al.*, 2015). Dans cette étude, elle a été évaluée par la méthode spéctrophotométrique du réactif de Salkowski. Cette méthode est préliminaire car elle cible tous les dérivés indoles y compris l'AIA, et les résultats obtenus représentent l'équivalents AIA produits par les souches testées.

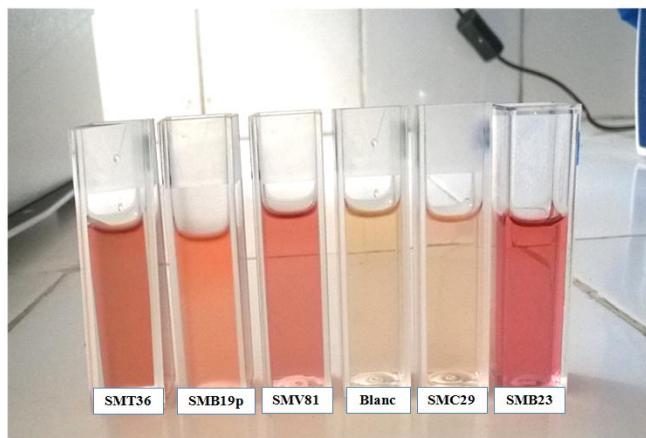
### ***Les isolats nodulaires***

Soixante-dix-huit pourcent des souches testées produisent des équivalents AIA (Tableau 10). Les souches présentent des taux de production très variables, allant de 1,8 µg/ml à 135 µg/ml (Figure 28); Les souches SMB19p, SMV81, SMT36 et SMB23 produisent de grandes quantités d'AIA (respectivement 23, 61, 87 et 135 µg / ml). Ghosh et Basu (2006) ont montré que *Rhizobium* sp. isolée de *Phaseolus mungo* est capable de produire 138 µg / ml d'AIA. Les bactéries isolées des nodules racinaires de *Vigna trilobata* pouvaient produire 92,6 µg / ml d'AIA (Kumar et Ram, 2012). Il a également été rapporté que certaines souches de symbiose de luzerne, *Sinorhizobium meliloti*, produisaient 20 µg / ml d'AIA (Williams et Signer, 1990), tandis que des souches de *R. leguminosarum* produisaient seulement 2,0 µg / ml d'AIA (Beltra *et al.*, 1980).

La production de cette auxine a été rapportée pour différent genres de rhizobia ; *Rhizobium* (Datta et Basu 2000 ; García-Fraile *et al.*, 2012 ; Kumar et Ram, 2012; Flores-Félix *et al.*, 2013), *Ensifer* (Bianco et Defez, 2010 ; Dubey *et al.*, 2010), *Mesorhizobium* (Wdowiak-Wróbel et Małek, 2016), *Bradyrhizobium* (Boiero *et al.*, 2007, Valdez *et al.*, 2016) et *Allorhizobium* (Ghosh *et al.*, 2015). Cette capacité a été également signalée pour les endophytes de nodules de légumineuses (Palaniappan *et al.*, 2010 ; Aserse *et al.*, 2013 ; Lin *et al.*, 2013 ; Saïdi *et al.*, 2013 ; Tariq *et al.*, 2014 ; Flores-Félix *et al.*, 2015 ; Khalifa et Almalki, 2015 ; Subramanian *et al.*, 2015 ; de Almeida Lopes *et al.*, 2016).

Les nodules des racines des plantes légumineuses contiennent des quantités appréciables d'Acide Indole Acétique (AIA). Cette phytohormone est impliquée dans le développement de la symbiose (legumineuse- rhizobia) et dans l'amélioration de la croissance de la plante hôte (Datta et Basu, 2000 ; Ghosh et Basu, 2006 ; Verma *et al.*, 1992 ; Desbrosses et Stougaard 2011 ; Duca *et al.*, 2014). Il a été signalé que cette hormone agit comme une molécule de

signal impliquée dans l'attachement des bactéries dans la racine qui aident à l'établissement de la symbiose légumineuse-*Rhizobium* (Spaepen *et al.*, 2007).



**Figure 28:** Production d'équivalent Acide Indole Acétique par les souches nodulaires de *S. muricatus* ssp. *sulcatus* sur milieu Winogradsky additionné de Tryptophane

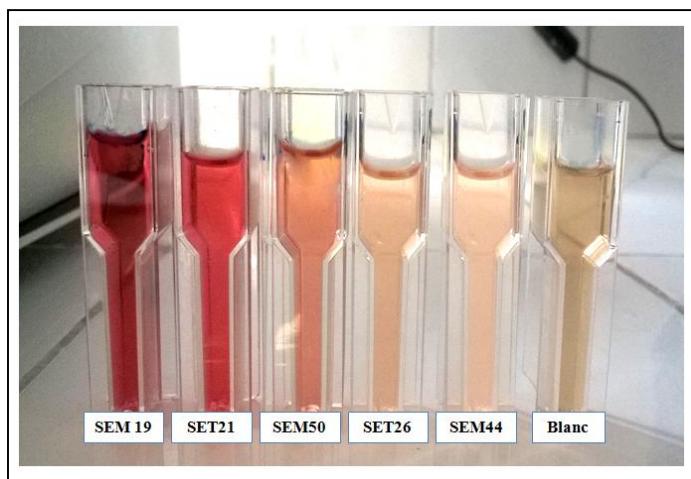
#### *Les isolats racinaires :*

Quatre-vingt-deux pourcent (18/22) des souches logées dans les racines de *S. muricatus* ssp. *sulcatus* pouvaient produire l'équivalent AIA à des quantités différentes (Figure 29), allant de 2 à 103 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), dont 8 souches produisent plus de (41  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Figure 30). La quantité la plus importante est produite par la souche SEM19 (103  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Les souches SEM41, SEM27, SEM25 et SET32 ne produisent pas l'AIA.

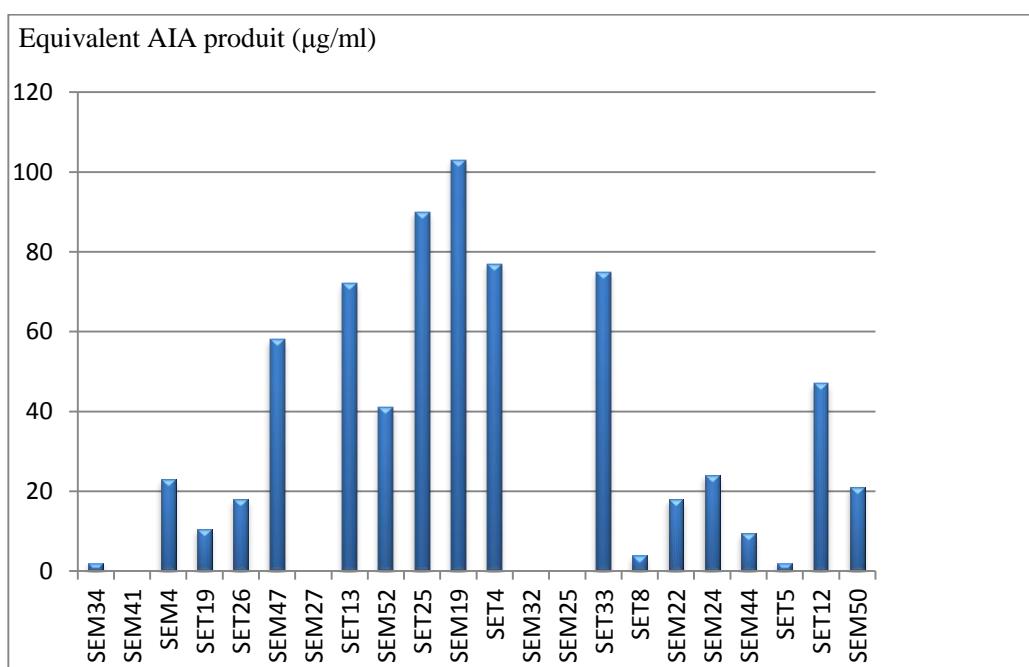
Des études récentes ont montré que plus de 40% de toutes les bactéries endophytes ou rhizosphériques sont capables de produire de l'AIA (Palaniappan *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2012 ; Andrade *et al.*, 2014 ; Hussein et Joo, 2015). Ce qui est en accord avec les résultats observés pour les endophytes racinaires de *Scorpiurus muricatus*.

Il a été rapporté que le caractère de production d'AIA fait partie de la stratégie utilisée par les bactéries pour contourner le système de défense des plantes. Il peut avoir un effet direct sur la survie bactérienne et sa résistance à la défense des plantes, ce qui permet l'invasion des bactéries à l'intérieur des plantes (Patten et Glick, 2002 ; Soto *et al.*, 2006 ; De Salamone *et al.*, 2005 ; Spaepen *et al.*, 2007). James *et al.* (2002) et Chi *et al.* (2005) estiment que cette hormone pourrait améliorer l'aptitude de l'interaction plante-bactérie. En effet, elle stimule la croissance du système racinaire et l'exsudation croissante des racines, ce qui permet de fournir des nutriments supplémentaires pour soutenir la croissance des bactéries de la

rhizosphère. Elle contribue également à l'amélioration de la capacité des rhizobia à concurrencer les populations indigènes pour la nodulation (Parmar et Dadarwal, 2000) et stimule la surproduction de poils absorbants et de racines latérales chez les plantes (Davies 2004).



**Figure 29:** Production d'équivalent Acide Indole Acétique par les endophytes racinaires de *S. muricatus* ssp. *sulcatus* sur milieu Winogradsky additionné de Tryptophane



**Figure 30:** Concentration d'équivalent AIA Produit par les endophytes racinaires sur milieu Winogradsky additionné de Tryptophane (réactif de Salkowski)

## **9. Effet de l'inoculation de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* par les souches nodulaires et racinaires**

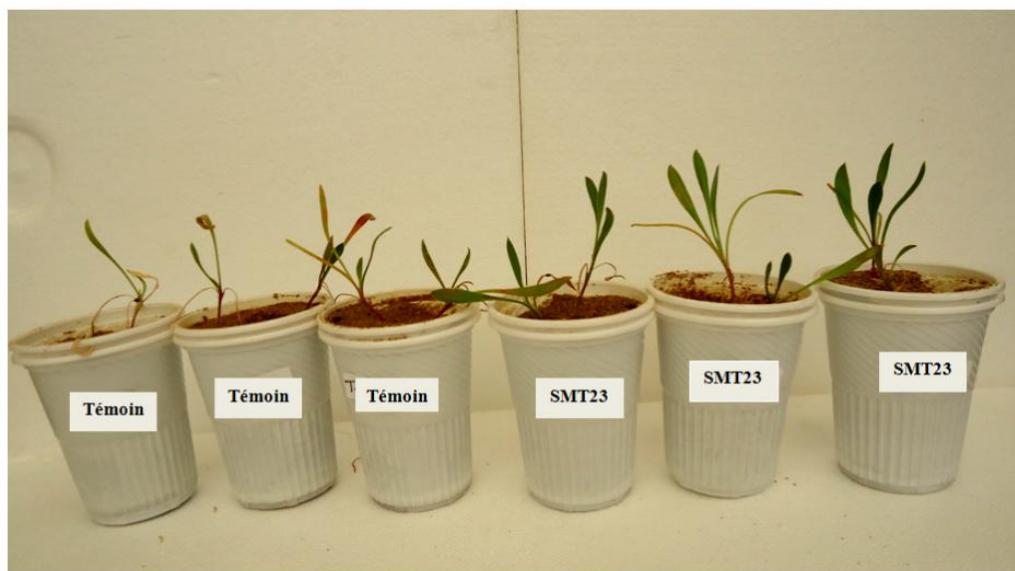
### ***Les souches nodulaires***

L'effet de l'inoculation sur la croissance des souches est évalué par la comparaison de la biomasse sèche des plantes inoculées avec le témoin non inoculé et le témoin azoté (Figure 31). Parmi les 51 souches testées, 31 ont pu améliorer la croissance des plantes inoculées comparativement aux témoins non inoculées et même aux témoins azotés pour certaines, contrairement aux 20 souches restantes présentant des poids secs inférieurs à celui des témoins non inoculés (Tableau 10). Les résultats du calcul d'indice d'efficacité de l'inoculation, ont permis de classer les souches en trois catégories ; inefficace, moyennement efficace et hautement efficace. Les souches SMT22, SMB8b, SMK25a et SMB2 présentent des valeurs inférieures à 25% et sont considérées comme inefficaces, les souches SMC26, SMK31C, SMB15, SMH21p, SMC29, SMK3a, SMK3C, SMV81, SMT15 avec des indices entre 25 et 75% sont considérés comme moyennement efficaces, tandis que les souches SMC24, SMB18, SMB6a, SMV84, SMB8p, SMB8, SMB27, SMK54, SMB23, SMV12a, SMV20, SMB4, SMK42, SMT11, SMH12, SMC26p, SMT36, SMT23 ayant des indices supérieurs à 75% sont considérées comme hautement efficace. Le meilleur indice (278%) est noté pour la souche SMT23.

L'effet de l'inoculation sur la biomasse végétale sèche au seuil est hautement significatif ( $p=0,000339$ ) (Annexe 7) ; le groupage de Fisher (Tableau10 ; Annexe 7) révèle une souche (SMT23) possédant un effet PGP statistiquement supérieur et différent du témoin azoté même si elle n'a pas pu former de nodules sur les racines de la plante hôte. Cette souche ne peut pas solubiliser le phosphate et produit une faible quantité d'équivalent AIA, ce qui permet de déduire que cette souche possède d'autres caractères PGP qui méritent d'être étudiés.

Les bactéries endophytes isolées des racines des légumineuses ainsi que de leurs nodules ont de multiples fonctions (George *et al.*, 2013, Kumar *et al.*, 2013). Certaines bactéries incapables de noduler leur plante hôte pourraient cependant stimuler la croissance des plantes (Sturz *et al.*, 1997). Palaniappan *et al.* (2010) ont montré la capacité des souches endophytes à améliorer la croissance de *Lespedeza* sp. cultivées en Corée du Sud, il en est de même pour les souches endophytes de *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Klebsiella* isolées des nodules d'arachide capables d'améliorer la croissance de leur plante hôte (Ibáñez *et al.*, 2008). La coinoculation des légumineuses avec les rhizobia et les endophytes peut favoriser la croissance

des plantes ; par l'amélioration de la nodulation et le rendement de la culture comme c'est le cas de la coinoculation du haricot avec *Rhizobium* sp. et *Pseudomonas* sp. isolées des nodules de cette plante (Colás Sánchez *et al.*, 2014). Pandya *et al.* (2015) ont isolé des espèces endophytes à partir de nodules de *Vigna radiata*, qui pouvaient améliorer la croissance de leur plante hôte lorsqu'ils sont inoculés avec des souches apparentées à *Ensifer adhaerens*.



**Figure31:** Effet de l'inoculation de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* par SMT23 après 2 mois de culture en conditions contrôlées

**Tableau 10 :** Caractéristiques PGP des souches isolées à partir des nodules de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* et leur effet sur sa croissance

Souche	poids sec des plantes (g)	Indice d'efficacité (%)	production d'équivalent AIA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Index de Solubilisation du phosphate
<b>SMT7</b>	0.111000 <sup>n</sup>	/	6	-
<b>SMC16</b>	0.113667 <sup>mn</sup>	/	9	-
<b>SMT8a</b>	0.125333 <sup>lmn</sup>	/	-	-
<b>SMK63</b>	0.125500 <sup>lmn</sup>	/	2.5	-
<b>SMH19</b>	0.128567 <sup>klmn</sup>	/	5.8	-
<b>SMB19p</b>	0.128567 <sup>klmn</sup>	/	23	-
<b>SMB19</b>	0.130000 <sup>jklmn</sup>	/	4.5	-
<b>SMB13</b>	0.130333 <sup>ijklmn</sup>	/	3.1	-
<b>SMT24</b>	0.133833 <sup>hijklmn</sup>	/	ND	-
<b>SMC15</b>	0.136000 <sup>ghijklmn</sup>	/	ND	-
<b>SMT16b</b>	0.136333 <sup>ghijklmn</sup>	/	-	-

<b>SMK25b</b>	0.143500 ghiijklmn	/	6.6	-
<b>SMB30</b>	0.144033 ghiijklmn	/	-	-
<b>SMV26</b>	0.146333 fghijklmn	/	4.5	-
<b>SMT17a</b>	0.148800 fghijklmn	/	2.6	-
<b>SMT13</b>	0.150000 fghijklmn	/	6	-
<b>SMK5a</b>	0.150333 fghijklmn	/	6.3	-
<b>SMB7</b>	0.151900 efgijklmn	/	ND	-
<b>SMK52</b>	0.153000 efgijklmn	/	6.6	-
<b>SMV13</b>	0.155500 efgijklmn	/	5	-
<b>SMT22</b>	0.164000 efgijklmn	6 (I)	5	-
<b>SMB8b</b>	0.171000 defghijklmn	22 (I)	ND	-
<b>SMK25a</b>	0.171333 defghijklmn	22.66 (I)	3.8	-
<b>SMB2</b>	0.172667 defghijklmn	24 (I)	6.2	-
<b>SMC26</b>	0.177286 defghijklmn	34.572 (ME)	ND	-
<b>SMK31C</b>	0.177400 defghijklmn	34.8 (ME)	ND	-
<b>SMB15</b>	0.178150 defghijklmn	36.3 (ME)	ND	-
<b>SMH21p</b>	0.185333 cdefghijklmn	50.666 (ME)	6.3	-
<b>SMC29</b>	0.186033 cdefghijklmn	52.066 (ME)	3	-
<b>SMK3a</b>	0.188000 cdefghijklmn	56 (ME)	-	-
<b>SMK3C</b>	0.188333 cdefghijklmn	56.666 (ME)	5	-
<b>SMV81</b>	0.195000 cdefghijklmn	70 (ME)	61	3.40
<b>SMT15</b>	0.195667 cdefghijklm	0.71334 (ME)	6.1	-
<b>SMC24</b>	0.197500 cdefghijklm	75 (HE)	-	-
<b>SMB18</b>	0.197833 cdefghijklm	75.666 (HE)	ND	-
<b>SMB6a</b>	0.200467 cdefghijkl	80.934 (HE)	ND	-
<b>SMV84</b>	0.207300 bcdefghijkl	94.6 (HE)	3.6	-
<b>SMB8p</b>	0.207667 bcdefghijkl	95.334 (HE)	ND	-
<b>SMB8</b>	0.208100 bcdefghij	96.2 (HE)	ND	-
<b>SMB27</b>	0.214333 bcdefghi	108.66 (HE)	-	2.66
<b>SMK54</b>	0.215000 abcdefgh	110 (HE)	1.8	-
<b>SMB23</b>	0.217333 abcdefgh	114.666 (HE)	135	-
<b>SMV12a</b>	0.219333 abcdefg	118.666 (HE)	-	-
<b>SMV20</b>	0.228667 abcdef	137.334 (HE)	2	-
<b>SMB4</b>	0.235067 abcde	150.134 (HE)	-	-
<b>SMK42</b>	0.250000 abcd	180 (HE)	4.5	-
<b>SMT11</b>	0.251667 abcd	183.334 (HE)	2.5	-
<b>SMH12</b>	0.266000 abc	212 (HE)	2.6	-
<b>SMC26p</b>	0.286000 ab	252 (HE)	ND	-
<b>SMT36</b>	0.288000 ab	256 (HE)	87	-
<b>SMT23</b>	0.299000 a	278 (HE)	3.1	-
<b>Témoin non inoculé (-)</b>	0.160000 efgijklmn	/		
<b>Témoin azoté (+)</b>	0.210000 bcdefghijk	/		

### ***Endophytes racinaires***

Le test d'inoculation de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* par 22 souche d'endophytes racinaires a révélé l'existence de souches à effet bénéfique ou délétère. En se basant sur le rendement de la matière sèche des plantes après 2 mois de culture en conditions contrôlées, 16 souches ont montré un certain potentiel PGP (Figure 32) où une nette amélioration du développement du système racinaire et de la partie aérienne comparativement au témoin non inoculée est observée (Figure 33). Le poids sec le plus élevé est obtenu avec la souche SEM 50 (*Pseudomonas sp.*). Par contre, le reste des souches semblent être délétères, les souches SET 26, SET47 non pas amélioré le poids sec des plantes par rapport au témoin non inoculé. Les souches SEM 34, SEM 41, SEM 4 et SET 19 ont causé la mort des plantes. En effet, Maheshwari et Annapurna (2017) ont rapporté que les endophytes peuvent avoir un effet nocif pour leur plante associée. Cependant, dans cette étude des espèces connus pour leur effet pathogène sur les plantes tel que *Xanthomonas theicola* (Ryan *et al.*, 2011) (SET33 et SET4) ont amélioré la croissance de *S. muricatus* ssp. *sulcatus*.

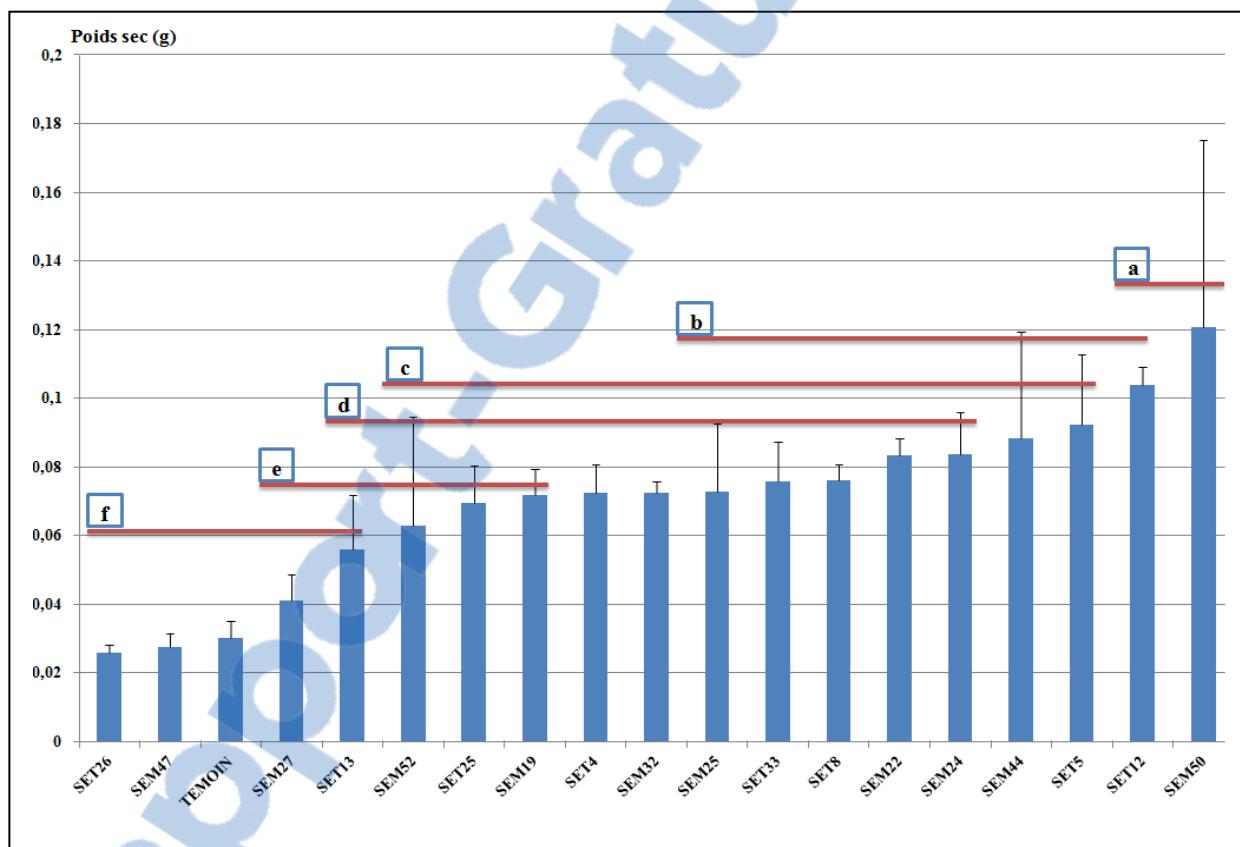
L'analyse de variance à un seul facteur sur l'effet des souches sur le poids sec des plantes a révélé un coefficient de corrélation ( $p= 0,000005$ ) ce qui traduit que l'effet des endophytes racinaires sur le poids sec des plantes est hautement significatif ( $\alpha<0.05$ ). Le groupage de Fisher a permis de classer les souches en six groupes différents (Figure 32). De Souza *et al.* (2015) ont rapporté que Les PGPB endophytes sont de bons candidats à l'inoculation car ils colonisent les racines et créent un environnement favorable au développement végétal et permettent la stimulation de la croissance des plantes

Toutes les souches solubilisatrices du phosphate ont amélioré significativement la croissance des plantes après inoculation à l'exception de SET13, SEM47 et SET26 (Tableau11). Les PSB (Bactéries Solubilisatrices du Phosphate) ont été largement testées comme biofertilisants et inoculants pour augmenter le rendement des cultures (Karpagam et Nagalakshmi, 2014). Actuellement, différentes espèces de bactéries telles qu'*Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Arthrobacter ilicis*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Microbacterium laevaniformans* et *Micrococcus luteus* ont été identifiées comme engrains phosphaté (Kumar *et al.*, 2014).

Les souches SEM4, SEM47 et SET13 produisent de grande quantité d'AIA, mais aucune amélioration de la croissance des plantes par rapport au témoin non inoculé n'est notée.

Cependant, les souches SEM25 et SET3 ne peuvent ni solubiliser le phosphate en milieu solide et ni produire d'équivalent AIA, améliorent significativement la croissance des plantes par rapport au témoin non inoculé. Ces résultats montrent que ces souches possèdent d'autres caractères PGP.

Il est important de noter que ce n'est pas la souche qui présente l'indice de solubilisation du phosphate le plus élevé (SET8) ni qui produit la plus forte concentration d'AIA qui a le meilleur effet sur la croissance de *Scorpiurus muricatus*.



**Figure32:** Poids sec des plantes de *Scorpiurus muricatus* inoculées par les endophytes racinaires après 2 mois de culture en conditions contrôlées



**Figure33:** Effet de l'inoculation de *Scorpisurus muricatus* ssp. *sulcatus* avec les endophytes racinaires après 2 mois de culture en conditions contrôlées

**Tableau 11:** Caractéristiques PGP des endophytes racinaires de *Scorpisurus muricatus* ssp. *sulcatus* et leurs effets sur sa croissance

Souche	Poids sec des plantes(g)	Production d'équivalent AIA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Index de solubilisation du phosphate
<b>SET19</b>	-	10,5	0
<b>SEM4</b>	-	77	0
<b>SEM41</b>	-	0	0
<b>SEM34</b>	-	2	0
<b>SET26</b>	0,026033 <sup>f</sup>	18	2,55
<b>SEM47</b>	0,0276 <sup>f</sup>	58	2,65
<b>SEM27</b>	0,04169 <sup>ef</sup>	0	0
<b>SET13</b>	0,056 <sup>def</sup>	72	3,647
<b>SEM52</b>	0,063433 <sup>cde</sup>	41	3,01
<b>SET25</b>	0,0695 <sup>cde</sup>	90	2,76
<b>SEM19</b>	0,0717 <sup>cde</sup>	103	3,11
<b>SET4</b>	0,072533 <sup>cd</sup>	77	0
<b>SET32</b>	0,072633 <sup>cd</sup>	0	0
<b>SEM25</b>	0,072933 <sup>bcd</sup>	0	0
<b>SET33</b>	0,0757 <sup>bcd</sup>	75	0
<b>SET8</b>	0,076167 <sup>bcd</sup>	3,8	4,24
<b>SEM22</b>	0,0834 <sup>bcd</sup>	18	2,49
<b>SEM24</b>	0,083667 <sup>bcd</sup>	24	2,875
<b>SEM44</b>	0,088367 <sup>bc</sup>	9,5	0
<b>SET5</b>	0,0922 <sup>bc</sup>	2	3,4
<b>SET12</b>	0,104033 <sup>ab</sup>	47	3,06
<b>SEM50</b>	0,124167 <sup>a</sup>	21	2
<b>Témoin non inoculé</b>	0,03010 <sup>f</sup>	/	/

# *Conclusion et perspectives*

## **Conclusion**

*Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* est une légumineuse spontanée, qui peut jouer un rôle important dans la résolution du problème de l'alimentation du bétail en Algérie et dans la réhabilitation des parcours dégradés. Le présent travail avait comme objectif l'étude de la diversité des bactéries logées dans les nodules et les racines de cette plante, poussant dans différentes régions de l'ouest algérien et de leurs effets sur sa croissance.

Les différentes campagnes de prospection menées dans l'ouest algérien ont permis de localiser *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* au niveau de six régions : El-Maleh dans la wilaya d'Ain Témouchent, El-Mactaâ dans la wilaya de Mostaganem, Nedroma et Sidi Boudjnene dans la wilaya de Tlemcen, Misserghin et Kristel dans la wilaya d'Oran. Le système racinaire est fortement nodulé dans la plupart des régions prospectées à l'exception de la région d'El-Mactaâ. Les échantillons récupérés ont permis d'isoler 51 isolats nodulaires et 22 isolats racinaires.

Les tests de nodulation des isolats nodulaires sur sable stérile et en hydroponie ont révélé leur incapacité à former des nodules sur les racines de leur plante hôte d'où l'intérêt de rechercher la présence du gène *nodC* (un des gènes responsable de la nodulation) chez ces isolats qui n'a été détecté que chez un seul isolat SMT8a. Ce résultat permet de déduire, pour le reste des isolats, la présence d'endophytes nodulaires qu'il faudrait confirmer par le test d'autres couples d'amorce *nodC* ou amplifier d'autres gènes de nodulation.

La diversité génétique des isolats de la collection a été évaluée en premier lieu par la rep-PCR fingerprinting et après par le séquençage de l'ADNr 16S. En fonction des profils obtenus par ERIC-PCR, un dendrogramme analytique a été élaboré, regroupant ainsi les isolats nodulaires en plusieurs groupes. Sur la base de 60% d'homologie, les isolats nodulaires sont groupés en 9 clusters différents. Ce qui laisse suggérer une diversité importante au sein de cette collection.

Le gène codant pour l'ARNr16S des représentants de chaque groupe et d'autre isolats sélectionnés au hasard a été partiellement séquencé (930pb). L'analyse phylogénétique des séquences a montré que les souches qui colonisent les nodules de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* appartiennent à 8 espèces différentes appartenant à 4 genres distincts : *Rhizobium vignae*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium leguminosarum*, *Agrobacterium nepotum*, *Pyllobacterium ifriqiense*, *Phyllobacterium endophyticum*, *Starkeya* et *Pseudomonas*. Ces

résultats confirment la grande diversité des bactéries qui colonisent les nodules de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus*.

L'analyse du polymorphisme des empreintes génomiques par la BOX/PCR a montré que les souches isolées à partir des racines de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* sont caractérisées par une importante hétérogénéité, confirmée par le séquençage partiel du gène codant pour l'ARNr16S (930 pb). Ces bactéries racinaires appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Pyllobacterium*, *Xanthomonas*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Microbacterium* et *Bacillus*.

La capacité des souches à solubiliser le phosphore et à produire l'équivalent AIA est déterminée. Seulement deux souches nodulaires (SMB27, SMV81) et 12 endophytes racinaires solubilisent le phosphate inorganique. La production d'équivalent d'AIA est observée chez 78% des souches nodulaires et 82% des souches racinaires testées.

L'étude a été complété par un test d'efficience des souches nodulaires et racinaires et parmi les 51 souches nodulaires testées, 31 ont pu améliorer la croissance des plantes inoculées notamment pour la souche SMT23 possédant un effet PGP statistiquement supérieur et différent même du témoin azoté. Pour les souches racinaires le poids sec le plus important est obtenu avec la souche SEM 50 ; ce qui confirme leur caractère PGP.

Cependant, l'analyse de ces résultats a révélé que les souches les plus efficientes ne sont pas celles qui produisent les plus grandes quantités d'équivalent AIA ni qui avaient l'index de solubilisation du phosphate le plus élevé permettant ainsi de conclure que ces souches possèdent d'autres caractères PGP (Plant Growth Promoting) qui leur permettent d'améliorer la croissance de *Scorpiurus muricatus* d'où l'importance de les définir.

L'originalité de ces travaux, permettant l'évaluation de la diversité génétique des bactéries logées dans les nodules et les racines de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* et leur pouvoir PGP, constitue une valeur scientifique considérable et prometteuse afin de les exploiter dans la réhabilitation des zones dégradés, aspect non réalisé dans le cadre de la réalisation de cette thèse vu le temps imparti. Cependant, l'ouverture de nouvelles perspectives, dans le but de rentabiliser davantage nos investigations, reste judicieuse:

- L'élargissement de cette collection en élargissant les zones de prospection et optimiser les conditions d'isolement (milieu, facteur biotique ou abiotique).
- Optimiser les conditions du test de nodulation.

- Tester d'autres couples d'amorce pour amplifier le gène codant pour *nodC* surtout chez les souches définies comme *Rhizobium leguminosarum*, *Rizobium vignae*, *Phyllobacterium ifriqiense*, ainsi que d'autres gènes de nodulation.
- Comprendre le mécanisme par lequel ces bactéries ont pu coloniser les nodules de *Scorpiurus muricatus*.
- Rechercher les enzymes utilisées par les endophytes pour coloniser les racines de *Scorpiurus muricatus*
- Déterminer l'effet de la double inoculation souche nodulaires/endophytes racinaires sur la croissance de *S. muricatus*. In vitro et le terrain
- Tester la capacité des souches à solubiliser le phosphate inorganique en milieu liquide.
- Définir le type d'auxine produite par les souches par HPLC (Chromatographie en phase liquide) et les exploiter en biotechnologie.
- Définir les autres caractères PGP des souches de la collection bacterienne.

**<La connaissance de toute chose n'est acquise ou complète que si ses causes sont connues. >**

**« Avicenne »**

*Références  
bibliographiques*

- Abbate V, Maugeri G, Cristaudo A et Gresta F (2010).** *Scorpiurus muricatus* L. sub sp. *subvillosum* (L.) Thell, a potential forage legume species for a Mediterranean environment: a review. *Grass and Forage Science*, 65, 2–10.
- Abdelguerfi A (1976).** Contribution à la répartition des espèces de luzernes annuelles en fonction des facteurs du milieu (200 stations). Liaison entre les caractères de 600 populations étudiées à Thèse Ing. INA Alger: 1-74.
- Abdelguerfi A et Laouar M (1999).** Autoécologie et variabilité de quelques légumineuses d'intérêt fourrager et/ou pastoral : possibilités de valorisation en région méditerranéenne. *Pastagens Forragens* 1999 ; 20 : 81-112.
- Abdelguerfi A, Laouar M, Tazi M, Bounejmate M et Gaddes NE (2000).** Present et futur des pâturages et des légumineuses fourragères en région méditerranéenne Cas du Nord de l'Afrique et de l'Ouest de l'Asie. *Options Méditerranéennes*: 45:461-467.
- Abdelguerfi A (2001).** Ressources génétiques d'intérêt pastoral et/ou fourrager : distribution et variabilité chez les légumineuses spontanées (*Médicago*, *Trifolium*, *Scorpiurus*, *Hedysarum* et *Onobrychis*) en Algérie. Thèse d'Etat en Sciences agronomiques. El-Harrach, Algérie : Institut National Agronomique, 433 p.
- Abdelguerfi A et Abdelguerfi-Laouar M (2004).** Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral : Diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen, in Ferchichi A. (comp), Ferchichi A. (collab). Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Zaragoza : CIHE AM, 2004, 29-41 p. (Cahiers options méditerranéennes, n. 62).
- Abdelguerfi A, Laouar M et M'Hammedi Bouzina M (2008).** Les productions fourragères et pastorales en Algérie : Situation et 14 Possibilités d' Amélioration. Revue Semestrielle “Agriculture & développement” (INVA, Alger), janvier 2008, n°6: 14-25.
- Adem R (2002).** Le contrôle laitier en Algérie. Les performances zootechniques des élevages bovins laitiers en Algérie. Synthèse campagne 2001/2002, 16 p.
- Afzal A et Bano A (2008).** Rhizobium and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum* ). *Int J Agric Biol* 10:85–88.

- Agarwal S et Shende ST (1987).** Tetrazolium reducing microorganisms inside the root of *Brassica* species. Curr Sci: 56:187-188.
- Alazard D et Duhoux E (1990).** Development of stem nodules in a tropical forage legume, *Aeschynomene afraspera*. J. Exp. Bot: 41:1199-1206.
- Ali S, Charles TC et Glick BR (2012).** Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. J Appl Microbiol: 113:1139-44.
- Ali S, Duan J, Charles TC et Glick BR (2014).** A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. J Theor Biol: 343:193-198.
- Allan GJ et Porter JM (2000).** TRibal Delimitation And Phylogenetic Relationships Of Loteae And Coronilleae (Faboideae :Fabaceae ) With Special Reference To *Lotus* : Evidence From Nuclear Ribosomal Its Sequences American Journal of Botany: 87(12):1871-1881.
- Allen EK et Allen ON (1981).** The leguminosae: A source book of characteristics, uses and nodulation. Madison: University of Wisconsin Press: 812.
- Alves A, Riesco R, Correia A et Trujillo ME (2015).** *Microbacterium proteolyticum* sp. nov. isolated from roots of *Halimione portulacoides*. Int J Syst Evol Microbiol 65:1794–1798
- Andrews M et Andrews ME (2017).** Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses Int J Mol Sci. Mar 26 :18(4). pii: E705. doi: 10.3390/ijms18040705. Review.
- Andrade LF, de Souza GLOD, Nietsche S, Xavier AA, Costa MR, Cardoso AMS, et al. (2014).** Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. J. Microbiol. 52 (1): 27–34. doi: 10.1007/s12275-014-3019-2 . PMID:24390835
- Anne P (1945).** Le dosage rapide du carbone organique dans les sols Ann Agron Avril, Mai, Juin, 1945, 5 ème année, no 2 : 161-172.
- Aoki T, Akashi T et Ayabe S (2000).** Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis, Journal of Plant Research, vol: 113:475-488 p.
- Ardley JK, Reeve WG, O'Hara GW, Yates RJ, Dilworth MJ et Howieson JG (2013).** Nodule morphology, symbiotic specificity and association with unusual rhizobia

are distinguishing features of the genus Listia within the southern Africa crotalariaoid clade Lotononis s.l. Annals of Botany: 112:1-15.

**Aserse AA, Räsänen LA, Aseffa F, Hailemariam A et Lindström K (2013).** Diversity of sporadic symbionts and non symbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. Appl Microbiol Biotechnol: 97:10117-10134.

**Atallah T, Rizk H, Cherfane A, Daher FB, El-Alia R, De Lajuide P et Hajj S (2008).** Distribution and nodulation of spontaneous legume species in grasslands and shrublands in Mediterranean Lebanon. Arid Land Research and Management: 22:109-122.

**Aubert G (1978).** Méthode d'analyse des sols, CRDP Marseille, 189 p.

**Azevedo JL, Maccheroni WJR, Pereira JO et de Araujo WL (2000).** Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electron J Biotechnol: 3(1):e1–e4.

**Bai Y, D'Aoust F, Smith DL et Driscoll BT (2002).** Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. Can J Microbiol: 48:230-238.

**Bai Y, Zhou X et Smith DL (2003).** Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. Crop Sci: 43:1774-1781.

**Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S et Vivanco JM (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu. Rev. Plant Biol: 57(1): 233–266. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159. PMID: 16669762.

**Bala A, Murphy P, Giller KE (2001).** Genetic diversity of rhizobia from natural populations varies with the soil dilution sampled. Soil Biol. Biochem. 33, 841–843.

**Barka EA, Belarbi A, Hatchet C, Nowak J et Audran JC (2000).** Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. FEMS. Microbiol. Lett: 186:91-95.

**Bashan Y (1986).** Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasiliense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. J Gen Microbiol: 132:3407-3414.

**Bassett B, Goodman RN et Novacky A (1977).** Ultrastructure of soybean nodules. Release of rhizobia from the infection thread. Can. J. Microbiol: 23:573-582.

- Bastian F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R et Bottini R (1998).** Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul.*, 24, 7–11.
- Beale PE, Lahlou A et Bounejmate M (1991).** Distribution of wild annual legume species in Morocco and relationship with soil and climatic factor. *Australian Journal of Agricultural Research*: 42:217-1230.
- Bec-Fert e MP, Krishnan HB, Savagnac A, Pueppke SG et Prom'e J (1996).** *Rhizobium fredii* synthesizes an array of lipooligosaccharides, including a novel compound with glucose inserted into the backbone of the molecule. *FEBS Lett*: 393:273-79.
- Beck DP, Materon LA, Afandi F (1993).** paractical *Rhizobium*- Légume. Technology Manual. P.290.ICARDA. Syria.
- Behaeghe T, Blouard R (1962).** Amélioration des semences et sélection des plantes prairiales au Congo, au Rwanda et au Burundi. *Bulletin d'information de l'INEAC*, XI, 4.6, pp : 307-338.
- Behm JE, Geurts R et Kiers ET (2014).** "Parasponia: a novel system for studying mutualism stability." *Trends in Plant Science*: 19(12):757-763.
- Beijerinck M (1888).** Die Bacterien der papilionaceenknollchen. *Botanische Zeitung*: 46:797-804.
- Beijerinck MW (1890).** Künstliche Infection von Vicia Faba mit Bacillus radicicola. Ernährungsbedingungen dieser Bacterie. *Bot. Zeitung* : 52:837-843.
- Bekki A (1983).** Contribution à l'étude de quelques espèces de Luzerne et leurs symbioses dans un environnement salé. DES biologie végétale. Université d'Oran: 48.
- Bekki A (1986).** Fixation d'azote en condition de stress salin chez *Medicago*: Sensibilité respective des partenaires symbiotiques. Thèse de Doctorat, Université des sciences et techniques de Nice, 80.
- Bekki A, Trichant JC et Rigand J (1987).** Nitrogen fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiol. Plant.*, 71: 61-67.

- Bekri MA, Desair J, Keijers V, Proost P, Searle-van Leeuwen M, Vanderleyden J et al. (1999).** *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. *J. Bacteriol.* 181:2440–2447.
- Beltra R, Diaz F et Fraile G (1980).** The formation of growth substances by *Rhizobium* species. *Bakteriol. Parasitenkd Infektionskr. Hyg. Abt.* 135: 617–622.
- Ben Romdhane S, Trabelsi M, Aouani ME, de Lajudie P et Mhamdi R (2009).** The diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) under water deficiency as a source of more efficient inoculants. *Soil Biol Biochem* 41: 2568-2572.
- Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Muresu R, Giacomini A, et Squartini A (2004).** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:462–468.
- Bensalem K (1982).** Contribution à L'étude du genre *Scorpiurus* L. en Algérie. Thèse Ing. I.N.A. EL-Harrach: 1-37.
- Bensalem K, Abdelguerfi A et Abdelguerfi-Berrekaia R (1988).** Contribution à L'étude des espèces spontanées du genre *Scorpiurus* L. en Algérie. I- Répartition des espèces en fonction des facteurs du milieu. *Ann. Inst. Agro. EL-Harrach* : 12(1):291-303.
- Bensalem K, Abdelguerfi A et Abdelguerfi-Berrekaia R (1990).** Relations du genre *Scorpiurus* L. avec certains facteurs du milieu en Algérie. *Fourrages*, 124, 407-419.
- Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora R. A, Ulrich A et Hallmann J (2005).** Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Ecol.* 51:215-229.
- Berg T, Tesoriero L et Hailstones DL (2005).** PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in Brassica seed. *Plant Pathol.* 54:416-427.
- Beringer JE (1974).** Factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General. Microbiology*, 84, 188-198.
- Bertrand H (1997).** Stimulation de l'absorption minérale et de la croissance du Colza inoculé avec des bactéries isolées de son rhizoplan. Université Claude Bernard Lyon. Lyon I: 99.

- Bianco C, Defez R (2010).** Improvement of phosphate solubilization and *Medicago* plant yield by an indole-3-Acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 76:4626–4632
- Bianco L (2014).** Rhizobial infection in *Adesmia bicolor* (Fabaceae) roots. *Arch. Microbiol*: 196:675-679.
- Boiero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassán F, Luna V, Castellano-Hinojosa A, Correa Galeote D et Bedmar EJ (2007).** Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:874–880
- Boivin C, Barran L. R, Malpica C. A et Rosenberg C (1991).** Genetic analysis of a region of the *Rhizobium meliloti* pSym plasmid specifying catabolism of trigonelline, a secondary metabolite present in legumes. *Journal of Bacteriology*: 173(9):2809-2817.
- Bonaldi K, Gargani D, Prin Y, Fardoux J, Gully D, Nouwen N, Goormachtig S et Giraud E (2011).** Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285: the nod-dependent versus the nod-independent symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact*: 24:1359-1371.
- Borah M, Das P, Pathak SS, Boro RC et Barooah M (2017).** Phosphate Solubilization by Endophytic Bacteria isolated from *Oryza sativa* *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 6 (10): 2713-2721. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.610.319>
- Bottomley PJ (1992).** Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. In: G. Stacey, R. Burris, and H.J. Evans (Eds.) *Biological Nitrogen fixation*. Chapman and Hall. New York: 943.
- Boukhatem ZF, Merabet C, Bekki A, Sekkour S, Domergue O, Dupponois R, et Galiana A (2016).** Nodular bacterial endophyte diversity associated with native *Acacia* spp. in desert region of Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 10(18), 634-645.
- Brandl MT et Lindow SE (1998).** Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1998)3256–3263.
- Brewin NJ (1991).** Development of the legume root nodule. *Annu Rev Cell Biol*: 7:191-226.

- Brewin NJ, Beringer JE et Johnston AW B (1980b).** Plasmid-mediated transfer of host range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. Journal of General Microbiology: 120:413-420.
- Broughton WJ et Perret X (1999).** Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. Current Opinion in Plant Biology: 2:305-311.
- Callo G et Dupuis M (1980).** Le calcaire actif des sols et sa signification Dull Afes, 17-26.
- Chabaca R (2009).** Enquête sur l'élevage Algérien, Exposé dans le cadre du programme Européen Averroès SupAgro, Montpellier, 26 p.
- Chabot R, Antoun H et Cescas M P (1996).** Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Plant and Soil 184, 311-321.
- Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Bâ A, Gillis M, De Lajudie P et Dreyfus B (2000).** Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. Appl Environ Microbiol 66:5437–5447.
- Chaintreuil CF, Rigault L, Moulin T, Jaffre J, Fardoux E, Giraud B, Dreyfus X et Bailly (2007).** Nickel resistance determinants in Bradyrhizobium strains from nodules of the endemic New Caledonia legume *serianthes calycina*. Appl. Environ. Microbiol. 73:8018– 8022.
- Chandler MR (1978).** Some observations on infection of *Arachis hypogaea* by *Rhizobium*. J. Exp. Bot: 29:749-55.
- Chandler MR, Date RA et Roughley RJ (1982).** Infection and root nodule development in *Stylosanthes* sp. By *Rhizobium*. J. Exp. Bot: 33:45-57.
- Chen C, Bauske EM, Musson G, Rodriguez-Kibana R et Kloepffer JW (1995).** Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. Biol Control: 5:83-91.
- Chen JY, Gu J, Wang ET, Ma XX, Kang ST, Huang LZ, Cao P, Li LB et Wu YL (2014).** Wild peanut *Arachis duranensis* are nodulated by diverse and novel *Bradyrhizobium* species in acid soils. Syst. Appl. Microbiol. 37(7), 525-532.
- Chen LS, Figueiredo A, Pedrosa FO et Hungria M (2000).** Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. Appl. Environ. Microbiol. 66(11), 5099-5103.

- Cheng HP et Walker GC (1998).** Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180:5183-5191.
- Chi F, Shen Sh, Cheng Hp, Jing Yx, Yanni Yg et Dazzo Fb (2005).** Ascending migration of endophytic rhizobia, From roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microb.* 71:7271-7278.
- Chou YJ, Elliott GN, James EK, Lin KY, Chou JH, Sheu SY, Sheu DS, Sprent JI et Chen WM (2007).** *Labrys neptuniae* sp. nov, isolated from root nodules of the aquatic legume *Neptunia oleracea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(3), 577-581.
- Colás Sánchez A, Torres Gutiérrez R, Cupull-Santana R, Rodríguez-Urrutia A, Fauvart M, Michiels J, Vanderleyden J(2014).** Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *Eur J Soil Biol* 62:105–112
- Claworthy JN (1984).** Recherche sur le pâturage au Zimbabwe. Recherche sur l'amélioration des pâturages en Afrique Orientale et austale. Comptes rendus d'un atelier tenu à Harara, Zimbabwe, du 17 au 21 sept. 1984. Publication du CRDI Canada, pp 25-61.
- Complant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Ait Barka E (2005).** Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied And Environmental Microbiology*, Sept, p. 4951–4959.
- Complant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C et Ait Barka E (2005).** Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Applied And Environmental Microbiology*, Apr. 2005, p. 1685–1693.
- Cooper JE (2007).** Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1355–1365.
- Coutinho BG, Licastro D, Mendonça-Previato L, Câmara M et Venturi V (2015).** Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. *Molec Plant-Microbe Interact*: 28:10-21.

**Cristaudo AF, Gresta G, Avola V, Miano (2007).** Germination capability of immature seeds of *Lotus ornithopodioides* L. and *Scorpiurus subvillosus* L. Options Méditerranéennes 79:289-292.

**Cummings SP, Gyaneshwar P, Vinuesa P, Farruggia FT, Andrews M, Humphry D, Elliott GN, Nelson A, Orr C, Pettitt D, Shah GR, Santos SR, Krishnan HB, Odee D, Moreira FM, Sprent JI, Young JP et James EK ( 2009).** Nodulation of *Sesbania* species by *Rhizobium* (*Agrobacterium*) strain IRBG74 and other rhizobia. Environ. Microbiol.11(10), 2510-2525.

**Czernic P, Gully D, Cartieaux F, Moulin L, Guefrachi I, Patrel D, Pierre O, Fardoux J, Chaintreuil C, Nguyen P et al. (2015).** Convergent evolution of endosymbiont differentiation in dalbergioid and inverted repeat-lacking clade legumes mediated by nodule-specific cysteine-rich peptides. Plant Physiology: 169: 1254-1265.

**Datta C et Basu PS (2000).** Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. Microbiol Res 155:123–127.

**Davies PJ, (2004).** Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action, Springer.

**De Bruijn FJ (1992).** Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol: 58(7):2180-2187.

**De Almeida Lopes KB, Carpentieri-Pipolo V, Oro TH, Stefani Pagliosa E et Degrassi G (2016).** Culturable endophytic bacterial communities associated with field-grown soybean. J Appl Microbiol 120:740–755

**De Faria S M, Lewis GP, Sprent JI et Sutherland JM (1989).** Occurrence of nodulation in the leguminosae. New Phytologist: 111:607-619.

**De Lajudie P, Willems A et Nick G (1999).** *Agrobacterium* bv. 1 strains isolated from tropical legumes. Syst Appl Microbiol22, 119–132.

**de Lajudie P et Young JPW (2017).** International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee for the Taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium* Minutes of the meeting, Budapest, 25 August 2016 Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67:2485–2494. DOI 10.1099/ijsem.0.002144

- De Meyer SE, De Beuf K, Vekeman B et Willems A (2015).** A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol. Biochem.* 83, 1-11.
- Denarie J, Debelle F et Rosenberg C (1992).** Signalling and host range variation in nodulation. *Annu Rev Microbiol*: 46:497-531.
- Deng ZS, Zhao LF, Kong ZY, Yang WQ, Lindström K, Wang ET et Wei GH (2011).** Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76(3), 463-475.
- Deng ZS, Zhao LF, Xu L, Kong ZY, Zhao P, Qin W, Chang JL et Wei GH (2011).** *Paracoccus sphaerophysae* sp. nov., a siderophore-producing, endophytic bacterium isolated from root nodules of *Sphaerophysa salsula*. *Int J Syst Evol Microbiol*: 61:665-669.
- Depret G, Laguerre G (2008).** Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations nodulating pea. *New Phytol.* 179, 224–235.
- De Salamone IEG , Hynes RK et Nelson LM (2005).** Role of cytokine in sinplant growth promotion by rhizosphere bacteria, in: ZA Siddiqui (Ed), PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Springer, The Netherlands, , pp.173–195.
- Desbrosses GJ et Stougaard J (2011).** Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell Host Microbe* 10:348–358
- Di Giorgio G, Granzano D, Ruisi P, Amato G et Giambalvo D (2009).** Phenomorphological and agronomic diversity among *Scorpiurus muricatus* natural populations collected in Sicily. *J. Agric. Sci*: 147:411-422. doi:10.1017/S0021859609008661.
- Diouf D, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, de Lajudie P, Neyra M (2007).** Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. *Microb. Ecol.* 54: 553–566.
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MSS et Wang LJ (2002).** The phenyl propanoid pathway and plant defense agenomics perspective. *Mol Plant Pathol*: 3:371-390.

- Djedidi S, Yokoyama T, Ohkama-Ohtsu N, Risal CP, Abdelly C et Sekimoto H (2011).** Stress tolerance and symbiotic and phylogenetic features of root nodule bacteria associated with *Medicago* species in different bioclimatic regions of Tunisia. *Microbes Environ.* 26(1), 36-45.
- Djordjevic MA, Redmond JA, Batley M et Rolfe BG (1987).** Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in *Rhizobium trifolii*. *EMBO Journal*: 6:1173-1179.
- Dobritsa AP et Samadpour M (2016).** Transfer of eleven *Burkholderia* species to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov., a new genus to accommodate twelve species of *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66:2836-2846.
- Dobritsa AP, Kutumbaka KK et Samadpour M (2016).** Reclassification of *Paraburkholderia panaciterrae* (Farh et al. 2015) Dobritsa & Samadpour 2016 as a later synonym of *Paraburkholderia ginsengiterrae* (Farh et al. 2015) Dobritsa & Samadpour 2016. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66:4085–4087. DOI : 10.1099/ijsem.0.001314
- Dominguez E et Galiano E. F (1974 b).** Revision del genero *Scorpiurus* L. 2. Parte sistematica (Revision of the genus *Scorpiurus* L. Systematic part). *Lagascalia*: 4:259-280.
- Dommergues Y et Mangenot F (1970).** Ecologie Microbienne du Sol. Masson & Cie, Paris.
- Dormer KJ (1945).** On the absence of a plumule in some leguminous seedlings. *New Phytologist*: 44:25-28.
- Doty SL, Oakley B, Xin G, Kang JW, Singleton G, Khan Z, Vajzovic A et Staley JT (2009).** Diazotrophic endophytes of native black cotton wood and willow. *Symbiosis*: 47:23-33.
- Downie JA (1998).** Functions of rhizobial nodulation genes. in The Rhizobiaceae. eds Spaink H. P., Kondorosi Á., Hooykaas P. J. J. (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands), 387-402 p.
- Doyle JJ et Luckow MA (2003).** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131: 900-910.
- Drouineau G (1942).** Dosage rapide du calcaire actif des sols Nouvelles données sur la répartition et la nature des fractions calcaires *Annales Agron.*, (Nouvelle série). 12: 44 1- 450.

- Dubey RC, Maheshwari DK, Kumar H, Choure K (2010).** Assessment of diversity and plant growth promoting attributes of rhizobia isolated from *Cajanus cajan* L. Afr J Biotechnol 9:8619–8629
- Duca D, Lorv J, Patten C. L, Rose D et Glick B. R (2014).** Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. Antonie Van Leeuwenhoek: 106:85-125.
- Duchaufour P (1970).** Précis de Pédologie Masson, Paris, p 291.
- Dudeja S. S, Giri R, Saini R, Suneja-Madan P et Kothe E (2012).** Interaction of endophytes with legumes. J. Basic Microbiol: 52:248-260.
- Dudeja SS et Nidhi (2014).** Molecular diversity of rhizobial and non rhizobial bacteria from nodules of cool season legumes. In: Biotechnology: Prospects and applications (Editors: R.K. Salar, S.K.Gahlawat, P. Siwach and J.S.Duhan) published by Springer-Verlag, Germany. doi: 10.1007/978-81-322-1683-4\_10, Springer India.
- Dudeja SS (2016).** Beneficial effects and molecular diversity of endophytic bacteria in legume and non legumes. In Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity. Vol. 1.Edited by D.P. Singh, H.B. Singh, and R. Prabha. Springer, New Delhi. pp. 245–256. doi:10.1007/978-81-322-2647-5\_14.
- Eardly BD, Nour SM, Van Berkum P et Selander RK (2005).** Rhizobial 16S rRNA and dnaK genes: mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. Applied and Environmental Microbiology: 71: 1328-1335.
- Elvira Recuenco M, VanVuurde JWJ (2000).** Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions, Can.J.Microbiol. 46:1036–1041.
- Etesami H, Alikhani HA et Hosseini HM (2015).** Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. MethodsX, 2: 72–78
- Estrada-de Los Santos P, Vinuesa P, Martínez-Aguilar L, Hirsch AM et Caballero-Mellado J (2013).** Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. Curr. Microbiol: 67:51-60.

**Estrada-de los Santos P, Rojas-Rojas FU, Tapia-García EY, Vásquez-Murrieta MS et Hirsch AM (2016).** To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. Ann. Microbiol: 66:1303-1314.

**Evguenieva-Hackenberg S E, Radeva G, Squartini A (1996).** Characterization of *Rhizobium 'hedysari'* by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. Journal of Applied. Wiley Online Library.

**Ezzakkioui F, El Mourabit N, Chahboune R, Castellano-Hinojosa A, Bedmar EJ et Barrijal S (2015).** Phenotypic and genetic characterization of rhizobia isolated from *Hedysarum flexuosum* in Northwest region of Morocco. J. Basic Microbiol. 55(7), 830-837.

**Fernandez-Lopez M, D'Haeze W, Van Montagu M et Holsters M (1998).** Changes in the glycosylation pattern at the reducing end of azorhizobial Nod factors affect nodulation efficiency. FEMS Microbiol. Lett: 158:237-42.

**Fernández MAP, Lamont BB (2003).** Nodulation and performance of exotic and native legumes in Australian soils Australian Journal of Botany. Australian Journal of Botany, 51, 543–553 CSIRO.

**Ferreira EM, Marques JF (1992).** Selection of Portuguese *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Trifolii* strains for production of legume inoculants. Plant Soil 147:151–158.

**Finan T. M (2002).** Evolving insights: symbiosis islands and horizontal gene transfer. J Bacteriol: 184:2855-2856.

**Flores-Félix JD, Carro L, Velázquez E, Valverde A, Cerdá-Castillo E, García-Fraile P et Rivas R (2013).** *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. Int J Syst Evol Microbiol 63, 821–826.

**Flores-Félix JD, Menéndez E, Rivera LP, Marcos-García M, Martínez-Hidalgo P, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E, García-Fraile P et Rivas R (2013).** Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. J Plant Nutr Soil Sci 176:876–882

**Flores-Félix JD, Carro L, Ramírez-Bahena MH, Tejedor C, Igual JM, Peix A et Velázquez E (2014).** *Cohnella lupini* sp. nov, an endophytic bacterium isolated from root nodules of *Lupinus albus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64(1), 83-87.

**Flores-Félix JD, Silva LR, Rivera LP, Marcos-García M, García-Fraile P, Martínez-Molina E, Mateos PF, Velázquez E, Andrade P et Rivas R (2015).** Plants probiotics as a tool to produce highly functional fruits: the case of *Phyllobacterium* and vitamin C in strawberries. *PLoS One* 10:e0122281

**Frank B (1889).** Über die Pilzsymbiose der Leguminosen, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 7:332-346.

**Fred EB, Baldwin IL et McCoy E (1932).** Root nodule bacteria and leguminous plants. UW Madison Libraries Parallel Press. <http://digicoll.library.wisc.edu/cgi-bin/HistSciTech/HistSciTech-idx?type=header&id=HistSciTech.RootNodule&isize=M>.

**Frommel MI, Nowak J et Lazarovits G (1991).** Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96:928-936.

**Gage DJ (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 68: 280-300.

**Gagné S, Richard C, Rousseau H et Antoun H (1987).** Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Can. J. Microbiol.* 33:996-1000.

**Gaiero JR, McCall CA, Thompson KA, Day NJ, Best AS, Dunfield KE (2013).** Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *Am. J. Bot.* 100, 1738–1750

**Gao JL, Sun P, Wang XM, Lv FY et Sun JG (2017).** *Microbacterium zeae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from maize stem. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017 May;110(5):697-704. doi: 10.1007/s10482-017-0837-3. Epub 2017 Feb 7.

**García-Fraile P, Velazquez E, Mateos PF, Martínez-Molina E, et Rivas R (2008).** *Cohnella phaseoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus coccineus* in Spain, and emended description of the genus *Cohnella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(8), 1855-1859.

**García-Fraile P, Carro L, Robledo M, Ramírez-Bahena M. H, Flores-Félix J. D, Fernández M. T, Mateos P. F, Rivas R, Igual J. M, Martínez-Molina E, Peix Á et Velázquez E (2012).** *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS One* 7:e38122.

**Gardner JM, Feldman AW et Zablotowicz RM (1982).** Identity and behavior of xylem-residing bacteria in through lemon roots of Florida citrus trees. Appl Environ Microbiol: 43:1335-1342.

**Garrity G, Bell J et Lilburn T (2005).** Class I. Alphaproteobacteria class. nov. In: Brenner, D. et al. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer, New York, vol: 2, part C, 1-574 p.

**Gaunt MW, Turner SL, Rigottiergois L, Lloydmacgilp SA et Young JPW (2001).** Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. Int J Syst Evol Microbiol: 51:2037-2048.

**George P, Gupta A, Gopal M, Thomas L, Thomas GV (2013).** Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and *Enterobacter* sp. RNF 267 isolated from the rhizosphere of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). World J. Microbiol. Biotechnol., 29: 109 -117.

**Ghosh S et Basu PS (2006).** Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. Microbiological Research 161 (2006) 362-366. doi:[10.1016/j.micres.2006.01.001](https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.01.001).

**Ghosh PK, De TK et Maiti TK (2015).** Production and metabolism of indole acetic acid in root nodules and symbiont (*Rhizobium undicola*) isolated from root nodule of aquatic medicinal legume *Neptunia oleracea* Lour. JBot 2015:ID 575067

**Gibson AH (1980).** Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets.

**Giraud E, Hannibal L, Fardoux J, Verméglio A et Dreyfus B (2000).** Effect of *Bradyrhizobium* photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene sensitiva*. Proc Natl Acad Sci USA: 97:14795-14800.

**Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre J. C, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck W. L, Chang W. S, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Vermeglio A et Medigue C et Sadowsky M (2007).** Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. Science: 316:1307-1312.

- Glick BR, Penrose DM et Li JP (1998).** A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol*: 190:63-68. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.1997.0532>.
- Glick BR (2005).** Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett*: 251(1):1-7.
- Glick BR (2012).** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. Article ID 963401.
- Glick BR (2014).** Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res*: 169:30-39.
- Glick BR (2015).** *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. Springer, Heidelberg.
- Goldman A, Boivin C, Fleury V, Message B, Lecoeur L, Maille M et Tepfer D (1991).** Betaïne use by rhizosphere bacteria: Genes essential for trigonelline, stachydrine, and carnitine metabolism in Rhizobium meliloti are located on pSym in the symbiotic region. *Mol. Plant-Microbe Interact*: 4:571-578.
- Goormachtig S, Capoen W et Holsters M (2004a).** Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends. Plant. Sci*: 9:518-522.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P et Tiedje JM (2007).** DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol*: 57:81-91.
- Goumiri R et Abdelguerfi A (1991).** Contribution A L'étude Des Espèces Spontanéesde La Tribu Des Hédysarées En Algérie: Analyses Chimiques Du Fourrage Au Stade végétatif. In: "Proceeding 4ème Congrès Internat. Sur Les Terres De Parcours", 22-26avril 1991, Montpellier (France), Vol: 1:377-378 p.
- Graham PH, Sadowsky MJ, Keyser HH (1991).** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 41, 582–587.
- Gram C (1884).** Über die isolierte Farbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin* 2, 185-189.

- Grange L, Hungria M (2004).** Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1389-1398.
- Gresta F, Avola G, Abbate V (2007).** Germination ecology of *Scorpiurus subvillosus* L.: seeds: the role of temperature and storage time. *Plant Ecol.* 190, 123–130.
- Gresta F, Avola G, Anastasi U, Miano V (2007).** Effect of maturation stage, storage time and temperature on seed germination of *Medicago* species., *Seed Sci. & Technol.*, 35, 698-708.
- Grouzis M (1987).** Structure, productivité et dynamique des systèmes écologiques sahéliens (Mare d'oursi, Burkina Faso). Thèse d'Etat. Université de Paris Sud, Centre d'Orsay.335.
- Grouzis M (1992).** Germination et établissement des plantes annuelles sahéliennes.
- Gu J, Wang ET, Chen WX (2007).** Genetic diversity of rhizobia associated with *Desmodium* species grown in China. *Lett Appl Microbiol* 44, 286–292.
- Guerrouj K, Pérez-Valera E, Chahboune R, Abdelmoumen H, Bedmar EJ et Missbah M El Idrissi (2013).** Identification of the rhizobial symbiont of *Astragalus glombiformis* in Eastern Morocco as *Mesorhizobium camelthorni*. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*.
- Guerrouj K, Ruíz-Díez B, Chahboune R, Ramírez-Bahena MH, Abdelmoumen H, Quiñones MA, El Idrissi MM Velázquez E et Fernández-Pascual M (2013).** Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Syst Appl Microbiol* 36, 218–223.
- Gupta RR, Singal R, Shankar A, Kuhad, RC et Saxena RK (1994).** A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Gen. Appl. Microbiol.* . 40: 255-260.
- Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen WM, Elliott G N, Bontemps C, Estrada-de los Santos P, Gross E, Reis Dos FB, Sprent JI, Young JPW et James EK (2011).** Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects.*Mol. Plant Microbe Inter:* 24:1276-1288.
- Haag AF, Arnold MF, Myka KK, Kerscher B, Dall'Angelo S, Zanda M, Mergaert P et Ferguson GP (2013).** Molecular insights into bacteroid development during Rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiol Rev*: 37:364-383

- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee W et Kloepper J (1997).** Bacterial endophytes in agricultural crops. Can J Microbiol: 43:895-914.
- Hallmann J, Berg G (2006).** Spectrum and Population Dynamics of Bacterial Root Endophytes. Microbial Root Endophytes pp 15-31.
- Hamadache A (2001).** Les ressources fourragères actuelles en Algérie. Situation et possibilité d'amélioration. In Actes de l'atelier national sur la stratégie du développement des cultures fourragères en Algérie. Ed. ITGC, 79 p.
- Hamilton RS, Hughes SJ et Maxted N (2001).** Ex Situ conservation of forage legumes. In The GeneticDiversity of Legumes species in the Mediterranean, Maxted and Bennett. Kluwer Academic Press: 263-291.
- Han SE, Park SR, Kwon HB, Yi BY, Lee GB, Byun MO (2005).** Genetic engineering of drought-resistant tobacco plants by introducing the trehalose phosphorylase (TP) gene from *Pleurotus sajor-caju*. Plant Cell Tiss Org Cult 82:151–158.
- Han SZ, Wang ET et Chen, WX (2005).** Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylotropis* and *Cassia* grown in China. Syst. Appl. Microbiol. 28(3), 265-276.
- Harold PR, Van Overbeek LS et Elsas JDV (2008).** Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol: 16:463–471.
- Hassan S, et Mathesius U (2012).** The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. J. Exp. Bot: 63:3429-3444.
- Hellriegel H et Wilfarth H (1988).** Untersuchungen über die stickstoffnahrung der gramineon und leguminosen. Beilageheft zu der ztschr. Ver Rübenzucker – Industrie Deutchen Reichs.
- Hirsch AM (1992).** Developmental biology of legume nodulation. New Phytol: 122:211-237.
- Ho YN, Mathewa DC, Hsiao SC, Shiha CH , Chienb MF, Chianga HM et Huang CC (2012).** Journal of Hazardous Materials 219– 220 : 43– 49.
- Hoffman BM, Lukyanov D, Yang ZY, Dean DR et Seefeldt LC (2014).** Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. Chem Rev: 114:4041-4062.

- Holliday P (1989).** A Dictionary of Plant Pathology. Cambridge: Cambridge University Press.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT et Williams ST (1994).** Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. pp: 518-537. 9th Edn., USA: Williams and Wilkins, Baltimore.
- Hoque MS, Broadhurst LM et Thrall PH (2011).** Genetic characterization of root nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across southeastern Australia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61(2), 299-309.
- Hossain MZ et Lundquist P (2016).** Nodule Inhabiting Non-rhizobial Bacteria and Their influence on growth of selected leguminous plants of Bangladesh. *Biores. Comm.* 2(1), 134-138.
- Hou BC, Wang ET, Li Y, Jia RZ, Chen WF, Man CX, Sui XH et Chen WX (2009).** Rhizobial resource associated with epidemic legumes in Tibet. *Microbial Ecol.* 57(1), 69-81.
- Huber TA, Agarwal AK et Keister DL (1984).** Extracellular polysaccharide composition, explanta nitrogenase activity, and DNA homology in *Rhizobium japonicum*. *J Bacteriol.* 158:1168-1171.
- Hungria M, Franchini JC, Campo RJ, Crispino CC, Moraes JZ, Sibaldelli RNR, Mendes IC et Arihara J (2006).** Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub>fixation and N fertilizer to grain yield. *Can J Plant Sci* 86:927–939.
- Hurek T et Reinhold-Hurek B (2003).** *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol.*, in press.
- Hussein KA et Joo JH(2015).** Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 58 :847–855. doi: 10.1007/s13765-015-0114-y.
- Hynes MF et O'connell MP (1990).** Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Cano J. Microbiol:* 36: 864-869.
- Ibáñez F, Angelini J, Taurian T, Tonelli ML et Fabra A (2009).** Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 32:49–55.
- Ibanez SC, Gallet F, Dommanget, Després L (2009).** Plant chemical defence: A partner control mechanism stabilising plant–seed-eating pollinator mutualisms. *BMC Evolutionary Biology* 9 : 261.

- Ikeda S, Okubo T, Anda M, Nakashita H, Yasuda M, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Eda S, Momiyama A, Terasawa K, Mitsui H et Minamisawa K (2010).** Community-and genome-based views of plant-associated bacteria: plant–bacterial interactions in soybean and rice. *Plant Cell Physiol.* 51(9), 1398-1410.
- Ishii S et Sadowsky MJ (2009).** Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental Microbiology.* 11(4), 733-740. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01856.x.
- Jain P et Kichi DS (2014)** Phosphate solubilizing microorganism (psm):an ecofriendly biofertilizer and pollution manager. *J. Dyn. Agric. Res.* 1: 23–28.
- James EK, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquio WL, Reddy PM, Iannetta PPM, Olivars FL et Ladha JK (2002).** Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67, *Mol.Plant. Microbiol.Interact.* 15: 894–906.
- Jarvis BDW, Sivakumaran S, Tighe SW et Gillis M (1996).** Identification of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species based on cellular fatty acid composition. *Plant and Soil:* 184:143-158.
- Johnston AWB, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, Setchell SM, Hirsch PR et Beringer JE (1978).** High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature, London:* 276:635-636.
- Johnston-Monje D et Raizada MN (2011).** Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS One* 6:e20396. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020396>.
- Jordan DC (1982).** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants, *Int. J. Syst. Bacteriol:* 32:136-139.
- Jordan DC (1984).** International committe on systematic bacteriology. Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Bacteriol:* 34:248.
- Judd AK, Sadowsky MJ, Bhagwat AA, Cregan PB et Liu RL (1993).** Isolation of a *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 mutant which has an extended host range for nodulation-restricting soybean genotypes. *FEMS Microbiology Letters* 106, 205–210.

- Kan FL, Chen ZY, Wang ET, Tian CF, Sui XH et Chen WX(2007).** Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. Arch. Microbiol. 188(2), 103-115.
- Kanoun A, Kanoun M, Yakhlef H et Cherfaoui MA (2007).** Pastoralisme en Algérie : systèmes d'élevage et stratégies d'adaptation des éleveurs ovins. Rencontre. Rech. Rumin : 14:181–184.
- Karpagam T et Nagalakshmi PK (2014).** Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from agricultural soil. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci 3: 601-614
- Kempe J et Sequeria L (1983).** Biological control of bacterial wilt potatoes: attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. Plant Dis: 67:499-503.
- Khalifa AYZ et Almalki MA (2015).** Isolation and characterization of an endophytic bacterium, *Bacillus megaterium BMN1*, associated with root-nodules of *Medicago sativa* L. growing in Al-Ahsaa region, Saudi Arabia. Ann Microbiol 65:1017–1026
- Khan Z et Doty SL (2009).** Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. Plant Soil: 322:197-207.
- Kimura M (1980).** A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. J. Mol. Evol. 16, 111-120.
- Kjeldahl J (1883).** Neue méthode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern Zanal chem, 22: 366-382.
- Kneen BE et LaRue TA (1983).** Congo red absorption by *Rhizobium leguminosarum*. Appl Environ Microbiol 45: 340–342.
- Kobayashi D et Palumbo JD (2000).** Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Microbial endophytes. Bacon C. W, White J. F. (eds.), Marcel, Dekker, New York, 199-233 p.
- Konaté IA, Filali-Maltouf EB et Berraho (2007).** Diversity analysis of Moroccan carob ("Ceratonia siliqua" L.) accessions using phenotypic traits and RAPD markers. Acta Botanica Malacitana Ceratonia Siliqua 32. 79.

**Kondorosi E, Mergaert P et Kereszt A (2013).** A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of Rhizobium bacteria provoked by host plant factors. *Annu Rev Microbiol*: 67:611-628.

**Kovtunovych G, Lar O, Kamalova S, Kordyum V, Kleiner D et Kozyrovska N (1999).** Correlation between pectate lyase activity andability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN 13 to penetrate into planttissues. *Plant Soil*: 215:1-6.

**Kramer PJ et Kozlowski TT (1979).** Physiology of woody plants, Academic Press, New York, 811 pp.

**Krishnan R, Menon RR, Busse HJ, Tanaka N, Krishnamurthi S et Rameshkumar N (2017).** *Novosphingobium pokkali* sp nov, a novel rhizosphere-associated bacterium with plant beneficial properties isolated from saline-tolerant pokkali rice. *Res. Microbiol.* 168(2), 113-121.

**Kumar A, Choudhary CS, Paswan D, Kumar B, et al. (2014).** Sustainable way for enhancing phosphorus efficiency in agricultural soils through phosphate solubilizing microbes. *Asian J. Soil Sci* 9: 300-310. <http://dx.doi.org/10.15740/HAS/AJSS/9.2/300-310>.

**Kumar V, Pathak DV, Dudeja SS, Saini R, Narula S et Anand RC (2013).** Legume nodule endophytes more diverse than endophytes from roots of legumes or non legumes in soils of Haryana, India. *J. Microbiol. Biotechnol.Res.*, 3(3): 8392

**Kumar RP et Ram MR (2012).** Production of indole acetic acid by Rhizobium isolates from *Vigna trilobata* (L) Verdc. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6:5536-5541. doi: 10.5897/AJMR11.105.

**Lafay B et Burdon JJ (1998).** Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrub by legumes in south eastern Australia. *Appl. Environ. Micro-biol*: 64:3989-3997.

**Lafay B, Bullier E et Burdon JJ (2006).** Bradyrhizobia isolated from root nodules of *Parasponia* (Ulmaceae) do not constitute a separate coherent lineageInternational Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 1013-1018, doi: 10.1099/ijsm.0.63897-0.

**Laguerre G, Van Berkum P, Amarger N et Prevost D (1997).** Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis* and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol*: 63:4748-4758.

- Laguerre G, Nour G, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P et Amarger N (2001).** Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts, Microbiol. 147, 981–993.
- Laguerre G, Louvier P, Allard MR et Amarger N (2003).** Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2276–2283.
- Lalande R, Bissonnette N, Coutlee D et Antoun H (1989).** Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. Plant Soil: 115:7-11.
- Lebeis SL (2014).** The potential for give and take in plant-microbiome relationships. Front. Plant Sci. 5, 287.
- Lee S, Flores-Encarnacion M, Contreras-Zentella M, Garcia-Flores L, Escamilla JE et Kennedy (2004).** Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis genes. J Bacteriol 186: 5384–5391.
- Legume Phylogeny Working Group LPWG: Bruneau Anne, Doyle Jeff J, Herendeen Patrick, Hughes Colin E, Kenicer Greg, Lewis Gwilym, Mackinder Barbara, Pennington R Toby, Sanderson Michael J, Wojciechowski Martin F et Koenen Erik (2013).** Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. Taxon: 62(2):217-248.
- Legume Phylogeny Working Group (2017).** A new subfamily classification of the Leguminosae based on taxonomically comprehensive phylogeny. Phylogeny and classification of the Leguminosae. TAXON 66 (1). February 2017:44-77. doi: <https://doi.org/10.12705/661.3>.
- Lei X, Wang ET, Chen WF, Sui XH et Chen WX (2008).** Diverse bacteria isolated from root nodules of wild Vicia species grown in temperate region of China. Arch. Microbiol. 190: 657–671.
- Leite J, Fischer D, Rouws L. F, Fernandes-Junior PI, Hofmann A, Kublik S, Schloter M, Xavier GR et Radl V (2017).** Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. Front. Plant Sci: 7:2064.

- Leung K, Strain SR, De Bruijn FJ et Bottomley PJ (1994).** Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Appl Environ Microbiol* 60: 416±426.
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B et Lock M (2005).** Legumes of the world. London: Royal Botanic Gardens Kew.
- Li JH, Wang ET, Chen WF et Chen WX (2008).** Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biol. Biochem.* 40:238–246.
- Li L, Sinkko H, Montonen L, Wei G, Lindström K et Räsänen LA (2011).** Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79: 46–68. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01198.x. PMID:22066910
- Li QQ, Wang ET, Zhang YZ, Zhang YM, Tian CF, Sui XH, Chen WF et Chen WX (2011).** Diversity and biogeography of rhizobia isolated from root nodules of *Glycine max* grown in Hebei Province, China. *Microbial Ecol.* 61(4), 917-931.
- Licitra G, Carppino S, Schadt I, Avondo M et Barresi S (1997).** Forage quality of native pastures in a Mediterranean area. *Animal Feed Science and Technology*: 69:315-328. doi: 10.1016/S0377-8401(97)00060-6.
- Lin T, Zhao L, Yang Y, Guan Q, Gong M (2013).** Potential of endophytic bacteria isolated from *Sophora alopecuroides* nodule in biological control against Verticillium wilt disease. *Aust J Crop Sci* 7:139–146
- Lindström K (1989).** *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 39:365-367.
- Lindström K et Martinez-Romero ME (2005).** International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. Minutes of the meeting, 26 July 2004, Toulouse, France. *Int J Syst Evol Microbiol*: 55:1383.
- Lindström K et Young JPW (2011).** International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 61:3089-3093.

- Lindström K, Amsalu Aserse A et Mousavi SA (2015).** Evolution and taxonomy of nitrogen-fixing organisms with emphasis on rhizobia. Biological Nitrogen Fixation. John Wiley & Sons, Inc, 21-38 p.
- Liu J, Wang ET et Chen WX (2005).** Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. Syst. Appl. Microbiol. 28(5), 465-477.
- Liu J, Wang ET, Ren DW et Chen WX (2010).** Mixture of endophytic Agrobacterium and *Sinorhizobium meliloti* strains could induce nonspecific nodulation on some woody legumes. Arch. Microbiol: 192:229-234.
- Liu XY, Wang ET, Li Y et Chen WX (2007).** Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. Arch. Microbiol. 188(1), 1-14.
- Liu Y, Yi Z et Zeng R (2014).** Draft genome sequence of a symbiotic bacterium, *Rhizobium vignae* CCBAU 05176<sup>T</sup>. Genome Announc. 2(4):00657-14.
- Loper JE et Scroth MN (1986).** Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugarbeet. Phytopathology, 76: 386-389.
- Lorquin J, Lortet G, Ferro M, Mear N, Dreyfus B et al. (1997).** Nod factors from *Sinorhizobium saheli* and *S. Teranga* bv. *sesbaniae* are both arabinosylated and fu-cosylated, a structural feature specific to *Sesbania rostrata* symbionts. Mol. Plant-Microbe Interact: 10:879-90.
- Louws FJ, Schneider M et De Bruijn FJ (1996).** Assessing genetic diversity of microbes using repetitive-sequence-based PCR (rep-PCR). In Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Environmental Samples. Ed. G Toranzos. pp 63–93. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA.
- Lugtenberg B et Kamilova F (2009).** Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu Rev Microbiol : 63:541-556.
- Luo S, Xu T, Chen L, Chen J, Rao C, Xiao X, Wan Y, Zeng G, Long F, Liu C et Liu Y (2012).** Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop

sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. *Appl Microbiol Biotechnol*: 93:1745-1753.

**Mahdhi M, De Lajudie P et Mars M (2008).** Phylogenetic and symbiotic characterization of rhizobial bacteria nodulating *Argyrolobium uniflorum* in Tunisian arid soils. *Can. J. Microbiol.* 54(3), 209-217.

**Mahdhi M, Fterich A, Rejili M, Rodriguez-Llorente ID et Mars M (2012).** Legume nodulating bacteria (LNB) from three pasture legumes (*Vicia sativa*, *Trigonella maritima* and *Hedysarum spinosissimum*) in Tunisia. *Ann. Microbiol.* 62(1), 61-68.

**Maheshwari DK et Annapurna K (2017).** Endophytes: Crop Productivity and Protection, Sustainable Development and Biodiversity 16, © Springer International Publishing AG. DOI10.1007/978-3-319-66544-3\_1

**Malinowski DP et Belesky DP (1999).** *Neotyphodium coenophialum*-endophyte infection affects the ability of tall fescue to use sparingly available phosphorus. *Journal of Plant Nutrition*, 22: 835–853.

**Manninger E et Antal M (1970).** Rhizobien und andere Bakterien in den Wurzelknollchender Leguminosen. I. Die Entkeimung der Oberfläche der Wurzelknollchen von *Soja max.* 816 Bakteriol. Parasiten. Infect: 124:684-687.

**Mantelin S, Saux MF, Zakhia F, Béna G, Bonneau S, Jeder H, de Lajudie P et Cleyet-Marel JC (2006).** Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 827–839.

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

**Martínez-Hidalgo P et Hirsch AM (2017).** The Nodule Microbiome: N<sub>2</sub>-Fixing Rhizobia Do Not Live Alone. Review. Volume 1, Number 2  
Pages 70-82.

- Martinez-Hidalgo P, Olivares J, Delgado A, Bedmar E et Martinez-Molina E (2014 b).** Endophytic Micromonespora from *Medicago sativa* are apparently not able to fix atmospheric nitrogen. *Soil Biol Biochem.* 74:201-203.
- Martinez-Molina E (2013).** Nodular Endophytes: An Untapped Diversity in: *Beneficial Plant-microbial Interactions: Ecology and applications*, González Belén Rodelas, M. and González-lopez, J CRC Press Taylor etand Francis Group A Science Publishers Book.
- Maymone B, Dattilo M et Mazziotti Di Celso P (1953).** Ricerche sulla produttività della Leguminosa *Scorpiurus muricata* L. var. *subvillosa* L., pregevole foraggera dei prati naturali e dei pascoli meridionali (Research on the productivity of *Scorpiurus muricata* L. var. *subvillosa* L). *Annali della sperimentazione agrariana*: 7:1289-1329.
- Menna P, Barcellos FG et Hungria M (2009).** Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and glnII, recA, atpD and dnaK genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2934–2950.
- Mergaert P, Van Montagu M et Holsters M (1997).** Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol*: 25:811-817.
- Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset A. E, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A et al. (2006).** Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*: 103:5230-5235.
- Mhamdi R, Mrabet M, Laguerre G, Tiwari R et Aouani ME (2005).** Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium*-like strains. *Can. J. Microbiol.* 51(2), 105-111.
- M'hammedi Bouzina M, Abdelguerfi A, Berrekia R et Guittonneau GG (1989).** Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Scorpiurus* L. en Algérie. III. Dureté et germination des graines de 17 populations de *S. vermiculatus* : Relation avec les conditions du milieu d'origine. *Ann. Inst. Nat. Agron.*, El-Harrach, vol. 13 N° 2, PP 330 - 334.
- M'Hammedi Bouzina M et Abdelguerfi A (1990).** Study on hardness and germination of *Scorpiurus* seeds in relation to conditions of the native area. In 6th Meeting of the FAO European Sub-Network on Mediterranean Pastures and Fodder Crops. *Bulletin* 6:87–90.

**M'hammedi Bouzina M (1992).** Contribution à l'étude des graines de quelques légumineuses fourragères en Algérie. Thèse de magister. El-Harrach, Algérie : Institut National Agronomique, 105 p.

**M'hammedi Bouzina M et Abdelguerfi A (1992).** Caractérisation de la dureté des graines chez quelques espèces spontanées de trois genres de légumineuses en Algérie. Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes. Colloque International en hommage à Jean Pernes, 662-663 p.

**M'hammedi Bouzina M, Abdelguerfi-Laouar M, Abdelguerfi A et Guittonneau GG (2005).** Autoécologie et distribution du complexe d'espèces *Scorpiurus muricatus* (*S. sulcatus* – *S. subvillosum*) en Algérie. *Acta Bot. Gallica*: **152**(1):11-23 p.

**Misaghi IJ et Donndelinger CR (1990).** Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*: 80:808-811.

**Mitter B, Petric A, Chain PS, Trognitz F, Nowak J, Compant S et Sessitsch A (2013).** Genome analysis, ecology, and plant growth promotion of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. In: Bruijn FJ (ed), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, First edn. John Wiley & Sons, Inc, 865-874 p.

**Mostasso L, Mostasso FL, Dias BG, Vargas MAT et Hungria M (2002).** Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crop Res* 73:121–132.

**Moulin L, Munive A, Dreyfus B et Boivin-Masson C (2001).** Nodulation of legumes by members of the β-subclass of Proteobacteria. *Nature*: 411:948–950.

**Mousavi SA, Österman J, Wahlberg N, Nesme X, Lavire C, Vial L, Paulin L, De Lajudie P et Lindström K (2014).** "Phylogeny of the *Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol*: 37(3):208–15. doi: 10.1016/j.syapm.2013.12.007.

**Muresu R, Polone E, Sulas L, Baldan B, Tondello A, Delogu G, Cappuccinelli P, Alberghini S, Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Mori B, Calamassi R, Dazzo FB et Squartini A (2008).** Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiol. Ecol*: 63:383-400. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00424.x.

- Muresu R, Maddau G, Delogu G, Cappuccinelli P et Squartini A (2010).** Bacteria colonizing root nodules of wild legumes exhibit virulence-associated properties of mammalian pathogens. Antonie van Leeuwenhoek, Volume 97, Issue 2, pp 143–153.
- Musson G, McInroy JA et Kloepper JW (1995).** Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. Biocon Sci Technol: 5:407-416.
- Nakatsukasa H, Uchiumi T, Kucho K, Suzuki A, Higashi S et Abe M (2008).** Transposon mediation allows a symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii to become a symbiosis island in *Agrobacterium* and *Rhizobium*. J Gen Appl Microbiol: 54:107-118.
- Narula S, Anand RC et Dudeja SS (2013).** Beneficial traits of endophytic bacteria from field pea nodules and plant growth promotion of field pea. J Food Legum: 26:73-79.
- Nascimento FX, Rossi MJ et Glick BR (2016).** Role of ACC deaminase in stress control of leguminousplants. In: Subramaniam G, Arumugam S, Rajendran V (eds) Plant growth promotingactinobacteria. Springer, Germany, 179-192 p.
- Nedjraoui D et Bedrani S (2008).** La désertification dans les steppes algériennes: causes, impacts et actions de lutte. VertigO -la revue électronique en sciences de l'environnement, Volume 8 Numéro 1. doi : <http://vertigo.revues.org/5375> .
- Negrer (1961).** Petite flore des régions arides du Maroc Occidental, CNRS, Paris, 373-374.
- Nick G (1998).** Polyphasic taxonomy of rhizobia isolatedfrom tropical tree legumes, Dissertationes Biocentri ViikkiUniversitatis Helsingiensis, Department of Applied Chemistryand Microbiology, University of Helsinki, Finland.
- Nour SM, Fernandez MP, Normand P et Cleyet-Marel JC (1994).** *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate Chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Syst. Bacteriol.. 44 : 511 -522.
- Nour SM, Cleyet-Marel JC, Normand P et Fernandez MP (1995).** Genomic heterogeneity of strains nodulating Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 45 : 640-648.
- Oke V et Long SR (1999).** Bacterial genes induced within thenodule during the Rhizobium legume symbiosis. Mol Microbiol: 32:837-850.

- Okubo T, Fukushima S et Minamisawa K (2012).** Evolution of Bradyrhizobium–Aeschynomene mutualism: Living testimony of the ancient world or highly evolved state? *Plant Cell Physiol*: 53:2000-2007.
- Oldroyd GE (2013).** Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol*: 11:252-263.
- Onofre-Lemus J, Hernández-Lucas I, Girard L et Cabal-lero-Mellado J (2009).** ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in Burkholderia species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Appl Environ Microbiol*: 75:6581-6590.
- Oono R, Schmitt I, Sprent JI et Denison RF (2010).** Multiple evolutionary origins of legume traits leading to extreme rhizobial differentiation. *New Phytol*: 187:508-520.
- Oteino N, Lally RD, Kiwanuka S, Lloyd A, Ryan D, Germaine KJ et Dowling DN (2015).** Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front Microbiol*.
- Ourarhi M, Abdelmoumen H, Guerrouj K, Benata H, Muresu R, Squartini A et Missbah-ElIdrissi M (2011).** *Colutea arborescens* is nodulated by diverse rhizobia in Eastern Morocco. *Arch Microbiol* 193:115–124.
- Ouzzane A et Abdelguerfi A (1989).** Etude du système racinaire en minirhizotrons chez quatre légumineuses spontanées d'intérêt pastoral et fourrager. *Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach*. 13. 2:568-580.
- Pablo R, Hardoim, Leo S, Overbeek V et van Elsas JD (2008).** Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* Vol.16 No.10.
- Palaniappan P, Chauhan PS, Saravanan VS, Anandham R et Sa T (2010).** Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biol Fertil Soils*: 46:807-816.
- Palumbo J, Kado C et Phillips DA (1998).** An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J Bacteriol* 180, 3107–3113.

- Pandya M, Kumar GN et Rajkumar S (2013).** Invasion of rhizobial infection thread by non rhizobia for colonization of *Vigna radiata* root nodules. FEMS Microbiol Lett: 348:58-65.
- Pandya M, Rajput M et Rajkumar S (2015).** Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiata*. Microbiology: 84:80-89.
- Pansu M et Gautheyrou J (2003).** Handbook of Soil Analysis: Mineralogical, Organic and Inorganic Methods (Ed). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 993.
- Parmar N et Dadarwal KR (2000).** Stimulation of plant growth of chickpea by inoculation of fluorescent *Pseudomonads*, J.Appl.181Microbiol.86:36–44
- Parniske M et Downie JA (2003).** Locks, keys and symbioses. Nature 425:569–570.
- Patané C (1998).** Effetti di alcuni pretrattamenti sulle caratteristiche germinative dei semi duri di *Scorpiurus subvillosum*. Sementi Elette 6:43–46.
- Patanè C et Gresta F (2006).** Germination of *Astragalus hamosus* and *Medicago orbicularis* as affected by seed-coat dormancy breaking techniques. J. Arid Environ. 67, 165–173.
- Patten CL et Glick BR (2002).** Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system, Appl.169 Environ. Microbiol. 68:3795–3801.
- Pawlowski K et Bisseling T (1996).** Rhizobial And Actinorhizal Symbioses: What Are The Shared Features? Plant Cell: 8:1899-1913.
- Peix A, Rivas-Boyero AA, Mateos PF, Rodríguez-Barrueco C, Martínez-Molina E et Velazquez E (2001).** Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. Soil Biol Biochem 33 , 103–110.
- Pellock BJ, Cheng HP et Walker GC (2000).** Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. Journal of Bacteriology : 182:4310-4318.
- Pernès J (1984).** Gestion des ressources génétiques des plantes. Tome II : ManueL (J. Pernès et al.,ed.) A.C.C.T. Paris.

- Perrine-Walker FM, Prayitno J, Rolfe BG, Weinman JJ et Hocart CH (2007b).** Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *J. Exp. Bot.* 58(12): 3343-3350. doi: 10.1093/jxb/erm181. PMID: 17925300.
- Phillipson MN et Blair ID (1957).** Bacteria in clover root tissue. *Can. J. Microbiol.* 3:125-129.
- Pikovskaya RE (1948).** Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362-370.
- Pillay VK et Nowak J (1997).** Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can. J. Microbiol.* 43:354-361.
- Poupin MJ, Timmermann T, Vega A, Zuniga A et Gonzalez B (2013).** Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8:e69435 10.1371/journal.pone.0069435.
- Prakash RK, Schilperoort RA et Nuti MP (1981).** Large plasmids of fast-growing rhizobia: homology studies and location of structural nitrogen fixation (*nif*) genes. *Journal of Bacteriology*: 145:1129-1136.
- Prell J et Poole P (2006).** Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* 14:161-168.
- Puławska J, Willems A, De Meyer SE et Süle S (2012).** *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. *Syst. Appl. Microbiol.* 35 (2012) 215–220.
- Quezel P et Santa S (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. CNRS éd, Paris, Vol: 1:1-565.
- Rajendran G, Patel MH et Joshi SJ (2012).** Isolation and characterization of nodule associated *Exiguobacterium* sp. from the root nodules of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) and their possible role in plant growth promotion. *Int. J. Microbiol*
- Ramirez-Bahena MH, Garcia-Fraile P, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM et Mateos PF (2008).** Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii*

Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov., Int. J. Syst. Evol. Microbiol: 58:2484-2490.

**Ramírez-Bahena MH, Tejedor C, Martín I, Velázquez E et Peix A (2013).** *Endobacter medicaginis* gen. nov., sp. nov., isolated from alfalfa nodules in an acidic soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63(5), 1760-1765.

**Rana D et Krishnan HB (1995).** A new root-nodulating symbiont of the tropical legume *Sesbania*, *Rhizobium* sp. SIN-1, is closely related to *R. galegae*, a species that nodulates temperate legumes. FEMS Microbiol. Lett: 134:19-25.

**Rashid S, Charles TC et Glick BR (2012).** Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. Appl Soil Ecol: 61:217-224.

**Rasolomampianina R, Bailly X, Fetiarison R, Rabevohitra R, Béna G, Ramaroson L, Raherimandimby M, Moulin L, De Lajudie P, Dreyfus B et Avarre JC (2005).** Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to alpha- and beta-Proteobacteria. Mol. Ecol. 14: 4135–4146.

**Raupach GS et Kloepper JW (1998).** Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathology: 88:1158-1164.

**Reinhold-Hurek B et Hurek T (2011).** Living inside plants: bacterial endophytes. Curr. Opin. Plant Biol: 14:435-443.

**Relić B, Perret X, Estrada-Garcia MT, Kopcinska J, Golinowski W, Krishnan HB, Pueppke SG et Broughton WJ (1994).** Nod factors of Rhizobium are a key to the legume door. Mol. Microbiol: 13:171-178.

**Ribeiro RA, Barcellos FG, Thompson FL et Hungria M (2009).** Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. Res Microbiol: 160:297-306.

**Richardson AE (2001).** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. Aust J Plant Physiol 28: 897–906.

- Rivas R, Velazquez E, Valverde A, Mateos PF et Martinez-Molina E (2001).** A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22, 1086–1089
- Robledo M, Jiménez-Zurdo JI, Velázquez E, Trujillo ME, Zurdo-Piñeiro JL, Ramírez-Bahena MH et al. (2008).** *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7064–7069. doi:10.1073/pnas.0802547105.
- Rodríguez H et Fraga R (1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv*: 17:319-339.
- Rome S, Fernandez M, Brunel B, Normand P et Cleyet-Marel JC (1996).** *Sinorhizobium medicae* sp. nov., Isolated from Annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46(4): 972-980.
- Roos IMM et Hattingh MJ (1987).** Systemic invasion of plum leaves and shoots by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* introduced into petioles. *Phytopathology*: 77:1253-1257.
- Rosenblueth M et Martínez-Romero E (2006).** Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molec. Plant. Microbe. Interact*: 19:827-837.
- Roth LE et Stacey G (1989).** Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: The symbiosome membrane comes from three sources. *Eur. J. Cell. Biol*: 49:13-23.
- Ruppitsch W, Pietzka A, Prior K, Bletz S, Fernandez HL, Allerberger F, Harmsen D et Mellmann A (2015).** Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 53:2869–2876. doi:[10.1128/JCM.01193-15](https://doi.org/10.1128/JCM.01193-15)
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ et Dowling DN (2008).** Bacterial endophytes: recent developments and applications. *Fems Microbiol Lett.* ; 278: 1-9.
- Ryan RP, Vorhölter FJ, Potnis N, Jones JB, Van Sluys MA, Bogdanove AJ et Dow JM (2011).** Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions *Nature Reviews Microbiology* volume 9, pages 344–355 doi: 10.1038/nrmicro2558
- Safiyh T, Barac T, Greenberg B, Borremans B, Vangronsveld J et van der Lelie D (2005).** Horizontal Gene Transfer to Endogenous Endophytic Bacteria from Poplar Improves Phytoremediation of Toluene. *Journal of structural engineering*.

- Safronova VI, Piluzza G, Belimov AA et Bullitta S (2004).** Phenotypic and genotypic analysis of rhizobia isolated from pasture legumes native of Sardinia and Asinara Island. Antonie van Leeuwenhoek: 85:115-127. doi: 10.1023/B:ANTO.0000020278.58236.77.
- Saha R, Saha N, Donofrio RS et Bestervelt LL (2013).** Microbial siderophores: a mini review. J BasicMicrobiol: 53:303-317.
- Saïdi S, Mnasri B et Mhamdi R (2011).** Diversity of nodule-endophytic agrobacteria-like strains associated with different grain legumes in Tunisia. Systematic and Applied Microbiology 3 ; 524–530.
- Saïdi S, Chebil S, Gtari M et Mhamdi R (2013).** Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates. World J Microbiol Biotechnol: 29:1099-1106.
- Saini R, Dudeja SS, Giri R et Kumar V (2015).** Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivated in Northern India. J Basic Microbiol: 55:74-81.
- Saitou N et Nei M (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4 (4): 406-425.
- Santoyo G, Orozco-Mosqueda MC, Moreno-Hagelsieb G et Glick BR (2016).** Plant growth-promoting bacterial endophytes, Microbiol. Res: 183:92-99.
- Sawana A, Adeolu M et Gupta RS (2014).** Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus Burkholderia: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. Front. Genet: 5:429.
- Schleifer KH, Ludwig W (1989).** Phylogenetic relationships of bacteria. In: Fernholm B, Bremer K, Jörnvall H (eds) The hierarchy of life. Elsevier, Amsterdam, pp 103–107.
- Schneider A, Huyghe C, Maleplate T, Labalette F, Peyronnet C et Carrouée B (2015).** Conséquences zootechniques de l'introduction des légumineuses françaises dans les systèmes de productions animales. In: A. Schneider, C. Huyghe (eds.) Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Editions Quae, Versailles, France: 11-78 p.

- Schortemeyer M, Santruckova H et Sadowsky MJ (1997).** Relationship between root length density and soil microorganisms in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass. Comm. Soil Sci. Plant Anal: 28:1675-1682.
- Schrire BD, Lewis PG et Lavin M (2005).** Biogeography of the Leguminosae. In: Lewis, P.G., Schrire. B., Mackinder, B. & Lock, M. (Eds.) Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, 21-54 p.
- Schultze M et Kondorosi Á (1998).** Regulation of symbiotic root nodule development. Annu. Rev. Genet: 32:33-57.
- Schulz B et Boyle C (2006).** What are endophytes? In Microbial Root Endophytes Edited by B. J. E. Schulz, C. J. C. Boyle & T. N. Sieber. Berlin: Springer-Verlag, 1-13 p.
- Scorticchini M, Marcelletti S, Ferrante P et Firrao G (2013).** A Genomic redefinition of *Pseudomonas avellanae* species. PLoS One. 2013 Sep 25;8(9):e75794. doi: 10.1371/journal.pone.0075794.e Collection.
- Scott RI, Chard JM, Hocart MJ, Lennard JH et Graham DC (1996).** Penetration of potato tuber lenticels by bacteria in relation to biological control of blackleg disease. Potato Res: 39:333-334.
- Sen D et Weaver RW (1984).** A basis for different rates of N<sub>2</sub>- fixation by the same strains of *Rhizobium* in peanut and cowpea root nodules. Plant Sci Lett: 34:239-246.
- Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, Barka EA, Salles JF et al. (2005).** *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. Int. J. Syst. Evol. Microbiol: 55:1187-1192. doi: 10.1099/ijsm.0.63149-0.
- Sevilla M, Gunapala N, Burris R et Kennedy C (2001).** Comparison of benefit to sugarcane plant growth and N<sub>2</sub> incorporation following inoculation of sterile plants with Acetobacter diazotrophicus wild-type and rifinif-mutant strains, MolPlant. Microbe. Interact.J.14:358–366.
- Shamseldin A, Abdelkhalek A et Sadowsky MJ (2016).** Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. Symbiosis: 1-19.
- Shaw LJ, Morris P et Hooker JE (2006).** Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms, Environmental Microbiology, vol: 8:1867-1880 p.

- Shin P, T Albin T, Thouin J, Fardoux J, Chaintreuil C, Gully D, Jean- François A, Furuta N, Miwa H, Yasuda M, Nouwen N, Teaumroong N et Giraud E (2016).** Rhizobium-legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. ISME J; 10(1): 64–74.
- Shiraishi A, Matsushita N et Hougetsu T (2010).** Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. Syst. Appl. Microbiol. 33: 269–274.
- Shishido M, Petersen DJ, Massicotte HB et Chanway CP (1996).** Pine and spruce seedling growth and mycorrhizal infection after inoculation with plant growth promoting *Pseudomonas* strains. FEMS Microbiol Ecol: 21:109-119.
- Singh NK, Rai UN, Verma DK et Rathore G (2014).** *Kocuria flava* induced growth and chromium accumulation in *Cicer arietinum* L. Int. J. Phytoremediation. 16(1), 14-28.s
- Somasegaran P et Hoben HJ (1994).** Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc . p.450.
- Sørensen J et Sessitsch A (2006).** Plant-associated bacteria - lifestyle and molecular interactions. In Elsas JDV, Jansson JK, Trevors JT, editors, Modern soil microbiology. 2. ed. Boca Raton: C R C Press LLC, 211-236 p.
- Soto MJ, Sanjua'n J et Olivares J(2006).** Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons, Microbiology 152: 3167–3174.
- Spaink HP (2000).** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annu Rev Microbiol: 54:257-288.
- Spaepen S, Vanderleyden J et Remans R (2007).** Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism- plant signaling. FEMS Microbiol Rev 31:425–448.
- Sprent JI et Raven PH (1992).** Evolution of nitrogen-fixing symbiosis. in Biological nitrogen fixation. London: Chapman and Hall.
- Sprent JI (2001).** Nodulation in Legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Sprent JI (2008).** 60 Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? Journal of Experimental Botany: 59:1081-1084.

- Sprent JI, Ardley JK et James EK (2013).** From North to South: A latitudinal look at legume nodulation processes. *South African Journal of Botany*: 89:31-41.
- Sprent JI, Ardley J et James EK (2017).** Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol*: 215:40–56. doi:10.1111/nph.14474.
- Squartini A, Struffi P, Döring H, Selenska Pobell S, Tola E, Giacomini A, Vendramin E et Nuti MP (2002).** *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly “*Rhizobium hedysari*”), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 1267–1276.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kampfer P, Maiden MC, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Trupper HG, Vauterin L, Ward AC et Whitman WB (2002).** Report of the ad hoc committee for the revaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*: 52:1043-1047.
- Stackebrandt E et Goebel BM (1994).** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44, 846–849.
- Stajković O, De Meyer S, Miličić B et Willems A (2009).** Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Botanica serbica*, 33(1), 107-114.
- Stepkowski T, Moulin L, Krzyzanska A, McInnes A, Law IJ et Howieson J (2005).** European origin of Bradyrhizo-biumpopulations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. *Applied and Environmental Microbiology*: 71:7041-7052.
- Stougaard J (2000).** Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant physiology*: 124:531-540.
- Strobel G et Daisy B (2003).** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*: 67:491-502.
- Sturz A, Christie B, Matheson B et Nowak J (1997).** Biodiversity of endophytic bacteria 979 which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host 980 growth. *Biol. Fertil. Soils*: 25:13-19.

- Subba-Rao NS, Mateos PF, Baker D, Pankratz HS, Palma J, Dazzo FB et Sprent JI (1995).** The unique root-nodule symbiosis between *Rhizobium* and aquatic legume, *Neptunia natans* (L. f.) Druce. *Planta*: 196:311-320.
- Subramanian P, Kim K, Krishnamoorthy R, Sundaram S et Sa T (2015).** Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. *Plant Growth Regul* 76:327–332
- Sugiyama A, Shitan N et Yazaki K (2007).** Involvement of a soybean ATP-bin-ding cassette-type transporter in the secretion of genistein, a signal flavonoidin legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant Physiology*: 144:2000-2008.
- Sullivan JT et Ronson CW (1998).** Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci USA*: 95:5145.9. *PubMed* [<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.9.5145>] 10.1073/pnas.95.9.5145.
- Suman A, VijayaGopal R, Subhash RS, riveni et Nissipau M (2017).** Study the Efficacy of *Pseudomonas fluorescens* against Sheath Blight in Rice by *Rhizoctonia solani* Biyyani. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2017) 6(4): 2581-2589.
- Sun H, He Y, Xiao Q, Ye R et Tian Y (2013).** Isolation, characterization and antimicrobial activity of endophytic bacteria from *Polygonum cuspidatum*. *Afr J Microbiol Res* 7:1496–1504.
- Sura-de Jong M, Reynolds RJ, Richterova K, Musilova L, Staicu LC, Chocholata I, Cappa JJ, Tajhavi S, van der Leilie D, Frantik T, Dolinova I, Strejcek M, Cochran AT, Lovecka P et Pilon-Smits EAH (2015).** Selenium hyperaccumulators harbor a diverse endophytic bacterial community characterized by high selenium resistance and plant growth promoting properties. *Front. Plant Sci.* 6, 113.
- Sziderics AH, Rasche F, Trognitz F, Sessitsch A et Wilhelm E (2007).** Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Can J Microbiol*: 53:1195-1202.
- Takeuchi M et Hatano K (1998).** Proposal of six new species in the genus *Microbacterium* and transfer of *Flavobacterium marinotypicum* ZoBell and Upham to the genus *Microbacterium* as *Microbacterium marinotypicum* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 973-982

- Talavera S et Domínguez E (2000).** *Scorpiurus*. In: Talavera S. *et al.* (eds.), Flora Iberica, vol. 7(II). Real Jardín Botánico, Madrid: 935-942.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A et Kumar S (2013).** MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–2729.
- Tan ZY, Wang ET, Peng GX, Zhu ME, Martinez-Romero E et Chen WX (1999).** Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49(4), 1457-1469.
- Tan RX et Zou WX (2001).** Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18, 448–459.
- Tan Z, Hurek T et Reinhold-Hurek B (2006).** Effect of N-fertilisation plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. *Environ. Microbial.* 5:1009-1015.
- Tariq M, Hameed S, Yasmeen T, Zahid M et Zafar M (2014).** Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) *World J Microbiol Biotechnol* 30:719–725
- Teamtisong K, Songwattana P, Noisangiam R, Piromyou P, Boonker N, Tittabutr P, Minamisawa K, Nantagij A, Okazaki S, Abe M, Uchiumi T et Teaumroong N (2013).** Divergent Nod-Containing Bradyrhizobium sp. DOA9 with a megaplasmid and its host range. *Microbes Environ.* 29:370-376.
- Tellstrom V, Usadel B, Thimm O, Stitt M, kuster H et Niehaus K (2007).** The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant physiology*: 143:825-837.
- Thakkar V et Patel R (2015).** Mechanism of plant growth promoting activity of 993 *Burkholderia* species. *FASEB J*: 29:887.3.
- Tighe SW, De Lajudie P, Dipietro K, Lindstrom K, Nick G et Jarvis BDW (2000).** Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the sherlock microbial identification system. *Int J Syst Evol Microbiol*: 50:787-801.

- Tillard P et Drevon JJ (1988).** Nodulation and nitrogénase activity of chickpea cultivar INRA 199 inoculated with different strains of *Rhizobium ciceri* Agronomie, 8: 387-392.
- Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA et Morra MJ (2002).** Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Appl. Environ. Microbiol., 68(5): 2161-2171.
- Trinick MJ et Hadobas PA (1988).** Biology of the *Parasponia-Bradyrhizobium* symbiosis. Plant Soil: 110:177-185.
- Trujillo ME, Kroppenstedt RM, Schumann P, Carro L et Martínez-Molina E (2006)** *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:2381–2385.
- Turner SL et Young JP (2000).** The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. Molecular Biology and Evolution: 17: 309-319.
- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM et Webb DA (1968).** Flora europea, Vol. II. Cambridge: Cambridge University Press.
- Valdez RA, Soriano B, Prado G, Zavaleta D, Matsubara M, Zúñiga D, Dion P, Valladolid A, Ruesta A, Castellano-Hinojosa A, Correa-Galeote D et Bedmar EJ (2016).** Symbiotic and agronomic characterization of bradyrhizobial strains nodulating cowpea in Northern Peru. In: González-Andrés F, James E (eds) Biological nitrogen fixation and beneficial plant-microbe interaction. Springer, Germany, pp 195–212
- Valverde A, Velázquez E, Fernández-Santos F, Vizcaino N, Rivas R, Mateos PF, Martinez-Molina E, Igual JM et Willems A (2005).** *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1985–1989.
- Valverde A, Velázquez E, Gutiérrez C, Cervantes E, Ventosa A et Igual JM (2003).** *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53(6), 1979-1983.
- Van Rhijn P et Vanderleyden J (1995).** The *Rhizobium* plant symbiosis. Microbiological Reviews: 59(1):124-142.

- Vance CP, Egli MA, Griffith SM et Miller SS (1998).** Plant regulated aspects of nodulation and N<sub>2</sub>-fixation. *Plant Cell Environment*: 11(5):413-427.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, Devos P, Kersters K et Swings J (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*: 60:407-438.
- Velàzquez E, Martines-hidalgo P, Carro L, Alonso P, Peix A, Trujill M, Wang LL, Wang ET, Liu J, Li Y et Chen WX (2006).** Endophytic Occupation of Root Nodules and Roots of *Melilotus dentatus* by *Agrobacterium tumefaciens*, *Microbial Ecology*, 52: 436-443.
- Velázquez E, Martínez-Hidalgo P, Carro L, Alonso P, Peix A, Trujillo M et Martínez-Molina E (2013).** Nodular endophytes: An untapped diversity. In: *Beneficial Plant Microbial Interactions: Ecology and Applications*, 214-36 p. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Verma DPS (1992).** Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell*: 4:373-382.
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ et Lupski JR (1994).** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5, 25–40.
- Vincent JM (1970).** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: International Biological Programme Handbook n°.15. Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford, 73-97 p.
- Vinuesa P, Rademaker JLW, Bruijn FJD et Werner D (1998).** Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of Canary Islands by PCRrestriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16s rDNA) intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR fingerprinting and partial 16s rDNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2096– 2104.
- Vinuesa P, Silva C, Lorite MJ, Izaguirre-Mayoral ML, Bedmar EJ et Martínez-Romero E (2005).** Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from rrs, atpD, recA and nifH sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Systematic and Applied Microbiology*: 28:702-716.

- Visnevschi-Necrasov DJ, Harris MA, Faria, Pereira G et Nunes E (2011).** Short communication. Genetic diversity within *Scorpiurus* species from the Iberian Peninsula estimated using ITS DNA sequences. Span J Agric Res 9 (1), 198.
- Vora RS (1989).** Seed germination characteristics of selected native plants of the Low Rio. Grande Valley, Texas. Journal of range management, 42(1): 36- 40.
- Wang LL, Wang ET, Liu J, Li Y et Chen WX (2006).** Endophytic occupation of root nodules and roots of *Melilotus dentatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. Microbial Ecol. 52(3), 436-443.
- Wang D, Yang S, Tang F et Zhu H (2012).** Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism, Cellular Microbiology 14(3), 334-342.
- Wdowiak-Wróbel S et Małek W (2016).** Properties of Astragalus sp. microsymbionts and their putative role in plant growth promotion. Arch Microbiol. doi:10.1007/s00203-016-1243-3
- Wei XL, Han M S, Xia CC, Ding SL, Xu L, Lin YB, Wang L et Wei GH (2015).** *Diaphorobacter ruginosibacter* sp. nov., isolated from soybean root nodule, and emended description of the genus *Diaphorobacter*. Arch. Microbiol. 197(5), 683-692.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA et Lane DJ (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, J. Bacteriol. 173 ,697–703.
- Williams MNV et Singer ER (1990).** Metabolism of tryptophan and tryptophan analogs by *Rhizobium meliloti*. Plant Physiol. 92, 1009–1013.
- Woese CR (1987).** Bacterial evolution, Microbiol. Rev: 51:221-271.
- Wojciechowski MF (2003).** Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. In B. B. Klitgaard and A. Bruneau [eds.], Advances in legume systematics, part 10, Higher level systematic: 5-35. Royal Botanic Garden, Kew, UK.
- Wolde-meskel E, Terefework Z, Frostegård Å et Lindström K (2005).** Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. Int. J.Syst. Evol. Microbiol. 55(4), 1439-1452.

- Woronin MS (1866).** Über die bei der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) und bei dergewöhnlichen Gartenlupine (*Lupinus mutabilis*) auftretenden Wurzelanschwellungen. Mémoires de l'Academie Impériale des Sciences de St. Pétersbourg, VII Series, vol. X.
- Xia Y, DeBolt S, Dreyer J, ScottD et Williams MA (2015).** Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Front. PlantSci.* 6:490.doi:10.3389/fpls.2015.00490
- Xu L, Zhang Y, Wang L, Chen W et Wei G (2014).** Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian Mountains in China. *Syst. Appl. Microbiol.* 37(6), 457-465.
- Yadav AN, Verma P, Kour D, Rana KL, Kumar V, Singh B, Chauahan VS, Sugitha TCK, Kumar Saxena A H et haliwal SD (2017).** Plant Microbiomes and Its Beneficial Multifunctional Plant Growth Promoting Attributes. *Int J Environ Sci Nat Res* 3(1): IJESNR.MS.ID.555601.
- Yahiaoui-Younsi A, Abdelguerfi A et Bouazza L (2000).** Etude de la floraison de trois espèces du genre *Scorpiurus* avec les conditions du milieu d'origine. *Cahiers options Méditerranéennes*, 45: 245–248.
- Yang GP, Debelle EF, Savagnac A, Ferro M, Schiltz O, Maillet F, Promé D, Treilhou M, Vialas C, Lindström K, Dénarié J et Promé JC (1999).** Structure of the *Mesorhizobium huakuii* and *Rhizobium galegae* Nod factors: a cluster of phylogenetically related legumes are nodulated by rhizobia producing Nod factors with α, β-unsaturated N-acyl substitutions. *Mol. Microbiol.* 34:227-37.
- Young JPW et Haukka KE (1996).** Diversity and phylogeny of rhizobia. *New. Phytol.* 133:87-94.
- Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, Kerr A et Sawada H (2001).** A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol*: 51:89-103.
- Younsi A (1991).** Etude du comportement de populations spontanées de différentes espèces de légumineuses fourragères et pastorales. Thèse Ing. Agro. INA. El Harrach: 79 p.

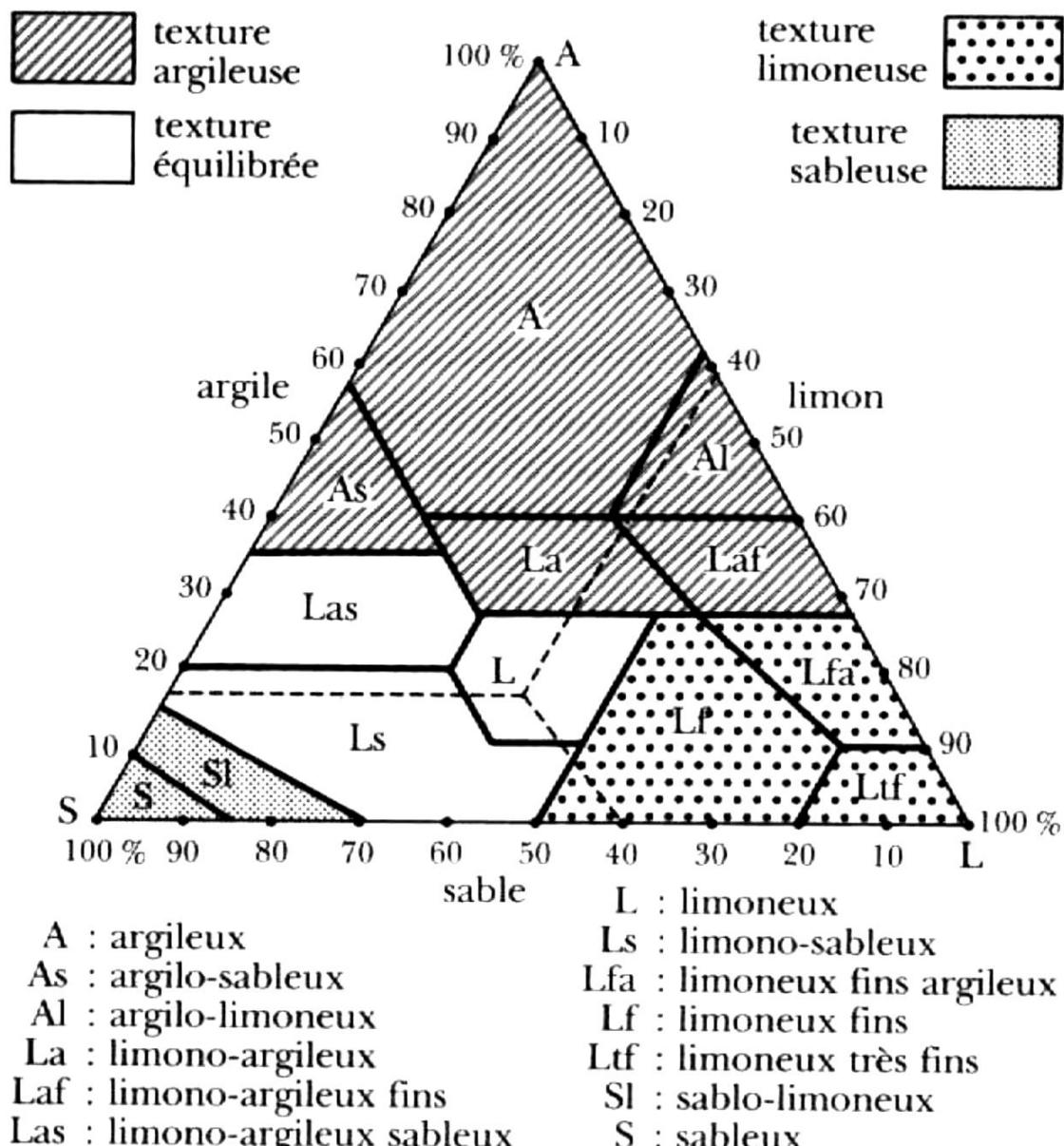
- Yu J, Fan L, Yang S, Tang M, Yang W, Li H et Wei G (2009).** Characterization of copper-resistant *Agrobacterium* isolated from legume nodule in mining tailings Bull. Environ. Contam. Toxicol. 82(3), 354-357.
- Zaheer A, Mirza BS, Mclean JE, Yasmin S, Shah TM, Malik KA et Mirza MS (2016).** Association of plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules of chickpea. Res. Microbiol. 167:510-520
- Zakhia F, Jeder H, Willems A, Gillis M, Dreyfus B et de Lajudie P (2006).** Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report fornifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. Microb. Ecol. 51: 375–393.
- Zakria M, Njoloma J, Saeki Y et Akao S (2007).** Colonization and nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp. strain B501 gfp1 and assessment of its growth-promoting ability in cultivated rice. Microbes and Environments : 22:197-206.
- Zéraïa L (1983).** Protection de la flore. Liste et localisation des espèces assez rares, rares et rarissimes. St. Centr. Rech. Ecol. Forest. Alger, 135 p.
- Zgadzaj R, James EK, Kelly S, Kawaharada Y, De Jonge N, Jensen DB, Madsen LH et Radutoiu S (2015).** A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. PLoS Genet 11:e1005280.
- Zhang YF, Wang FQ et Chen WX (2006).** Numerical taxonomy and 16S rDNA PCR-rFLP analysis of rhizobial strains isolated from root nodules of cowpea and mung bean grown in different regions of China. Wei Sheng Wu Xue Bao 46, 861–868 (in Chinese).
- Zhao CT, Wang ET, Chen WF et Chen WX (2008).** Diverse genomic species and evidences of symbiotic gene lateral transfer detected among the rhizobia associated with *Astragalus* species grown in the temperate regions of China. FEMS Microbiol Lett 286, 263–273.
- Zhao L, Deng Z, Yang W, Cao Y, Wang E et Wei G (2010).** Diverse rhizobia associated with *Sophora alopecuroides* grown in different regions of Loess Plateau in China. Syst. Appl. Microbiol. 33(8), 468-477.
- Zoghlami A et Hassen H (2004).** Genetic resources of spontaneous species of forage and pastoral legumes in Tunisia. In: Ferchichi A. (ed.) Rangeland and pasture rehabilitation in Mediterranean areas, Cahiers Options Med., CIHEAM, 62, 375-377.

# *Annexes*

## Annexe 1 : Analyse physicochimique de sol

### a. Granulométrique

Le triangle de texture permet de classer les sols d'après leur composition



**TRIANGLE DES TEXTURES**  
*(d'après U.S. department of agriculture)*

**b. Normes internationales du pH du sol :( INRA, 1995)**

pH	Type de sol
< 3.5	Hyper-acide
3.5 - 5	Très acide
5.0 - 6.5	Acide
6.5 - 7.5	Neutre
7.5 - 8.7	Basique
> 8.7	> 8.7 Très basique

**c. Normes internationales de la salinité (Wetz, 2001)**

Profondeur de sol	Sols non salins	Légèrement salins	Modérément salins	Sols salins	Sols très salins
<b>0 – 60 cm</b>	< 2 ds/m*	2 – 4 ds/m	4 – 8 ds/m	8 – 16 ds/m	> 16 ds/m
<b>60 – 120 cm</b>	< 4 ds/m	4 – 8 ds/m	8 – 16 ds/m	16 – 24 ds/m	> 24 ds/m

**d. Normes internationales de l'azote total (kjeldahl, 1882) et du phosphore assimilable (Olsen, 1954).**

Éléments	Normes					Référence
N total (%o)Kjeldhal	< 0.5 Très pauvre	0.5-1 Pauvre	1-1.5 Moyen	1.5-2.5 Riche	>2.5 Très riche	Calvet et Vellemin (1986)
P Assimilable (ppm)	/	< 50 Sol pauvre	50-80 Teneur satisfaisante	> 80 Sol riche	/	Lebreton J.C (2004)

**e. Normes internationales de la matière organique**

Classe du sol	Très pauvre	Pauvre	Moyennement pauvre	Riche	Très riche
Matière organique %	< 0,7	0,7-1,5	1,5-3	3-6	> 6

**f. Les normes des taux de calcaire**

Taux de CaCO <sub>3</sub>	Qualification du sol
CaCO <sub>3</sub> T ≤ 5 %	Sol non calcaire
5 % < CaCO <sub>3</sub> T ≤ 12.5 %	Sol faiblement calcaire
12.5 % < CaCO <sub>3</sub> T ≤ 25 %	Sol modérément calcaire
25 % < CaCO <sub>3</sub> T ≤ 50 %	Sol fortement calcaire
CaCO <sub>3</sub> T >50 %	Sol très fortement calcaire

Source : programme d'interprétation LANO/CA de Basse Normandie

(<http://www.lano.asso.fr/web/calcaire-actif.html>)

**Annexe 2 : Composition des Milieux de cultures**

**a. Milieu de culture YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970)**

Extrait de levure ..... 1g

Agar-Agar ..... 18g

Mannitol ..... 10g

Solution minérale de Bergersen 10 M ..... 100ml :

Bergersen (1961)

KCl	1g
FeCl <sub>3</sub>	0.02g
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.53g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O	4.5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1g
H <sub>2</sub> O distillée	1000ml

H<sub>2</sub>O distillée.....qsp 1000ml

pH (6.9 – 7)

**b. Eau gélosé (0,8 %) (Tillard et Drevon, 1988)**

Agar-agar.....0,8 g

Eau distillée.....100 ml

Autoclaver pendant 20 min à 120°C.

**c. Gélose nutritive**

Extrait de viande ..... 1 g  
Extrait de levure ..... 2,5 g  
Peptone ..... 5 g  
Chlorure de sodium ..... 5 g  
Agar ..... 18 g  
Eau distillée ..... qsp 1000ml

Ph : 7

**d. Gélose PVK (Pikovskaya, 1948).**

Glucose ..... 10 g/l  
Agar ..... 15 g/l  
CaHPO<sub>4</sub> ..... 5 g/l  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ..... 0.5 g/l  
NaCl ..... 0.2 g/l  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ..... 0.1 g/l  
KCl ..... 0.2 g/l  
Yeast extract ..... 0.5 g/l  
MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O ..... 0.002 g/l  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ..... 0.002 g/l

additionné de 0,1% bleu de bromophénol (Gupta *et al*, 1994)

**e. Milieu de Winogradsky exempté d'azote (Holt 1994)**

D-Glucose ..... 0,5g  
CaCO<sub>3</sub> ..... 0,1g  
Solution stock ..... 5ml  
Eau distillée ..... 1000ml

pH: 6,2 ajusté avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Solution stock (g/l)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....50,0g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.....25,0g

NaCl.....25,0g

FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O.....1,0g

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O.....1,0g

MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O.....1,0g

Eau distillée.....1000ml

pH:7,2 ajusté avec du NaOH

**f. Milieu TY (Tryptophane Yeast) (Beringer, 1974):**

Tryptone..... 5g

Extrait de levure..... 3g

Agar-agar .....15g

CaCl<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)..... 0,88g

Eau distillée qsp

pH : 6,8- 7

**g. Solution nutritive de culture des plantes (Bertrand, 1997)**

Eléments	Poids moléculaire	Solution finale	Solution mère g/l	Ml de solution mère/l de sol.finale
Macro-éléments	mM			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	0,1	13,609	
KCl	74,55	3	223,65	
CaCl <sub>2</sub> , 2(H <sub>2</sub> O)	147,02	2	249,04	
MgSO <sub>4</sub> , 7(H <sub>2</sub> O)	246,48	1	246,48	
Micro-éléments	μM			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,8	4	6, 25	0,04
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	169	6	25	
ZnSO <sub>4</sub> , 7(H <sub>2</sub> O)	287,54	0,9	6, 25	
CuSO <sub>4</sub> , 5(H <sub>2</sub> O)	249,68	1	6, 25	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2(H <sub>2</sub> O)	241,95	0,1	0, 625	
Sequestrène de fer	16,6			
KNO <sub>3</sub>	101,1	0,5	100	0,5
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	164,09	0,5	82	1

**Annexe 3 : Coloration de Gram**

- 1- Déposer une goutte d'eau sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie à l'aide d'un pique en bois et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- 3- Couvrir le frottis par du violet de gentiane pendant 60 secondes

- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone ou avec de l'éthanol en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuschine (ou safranine) pendant 60 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes et mettre la lame inclinée sur du papier absorbant
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du violet de gentiane et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

#### **Annexe 4 : Composition des standards de turbidité de McFarland (NCCLS, 2000)**

Standard de turbidité numéro	Dihydrate de chlorure de baryum (1,175 %) (ml)	Acide sulfurique (1 %) (ml)	Densité approximative correspondante de bactéries/ml
0,5	0,5	99,5	1.10 <sup>8</sup>
1	0,1	9,9	3.10 <sup>8</sup>
2	0,2	9,8	6.10 <sup>8</sup>
3	0,3	9,7	9.10 <sup>8</sup>
4	0,4	9,6	12.10 <sup>8</sup>
5	0,5	9,5	15.10 <sup>8</sup>
6	0,6	9,4	18.10 <sup>8</sup>
7	0,7	9,3	21.10 <sup>8</sup>
8	0,8	9,2	24.10 <sup>8</sup>

#### **Annexe 5:**

#### **Composition du tampon Tris – Borate – EDTA (solution 10x concentrée)**

Préparer en mélangeant:

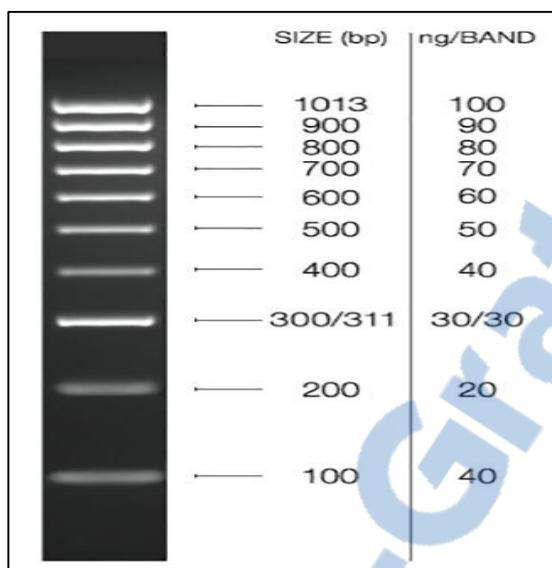
- 109g de Tris

- 55,7g d'acide borique
- 9,3g du EDTA

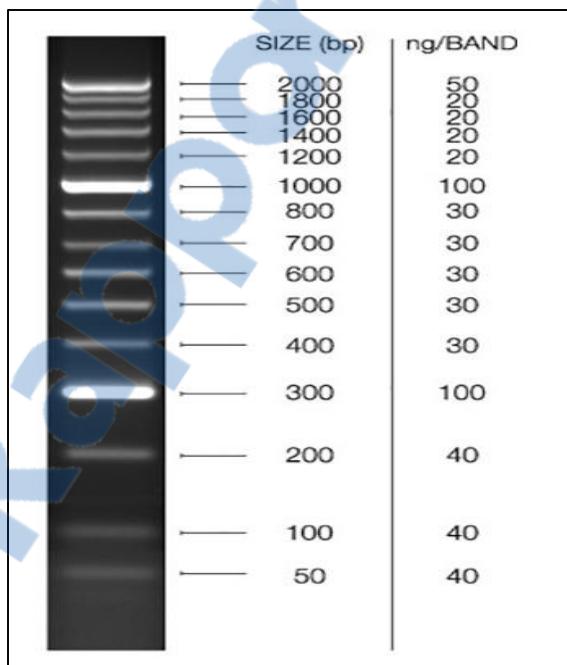
Mélanger les différents poids dans 1 litre H<sub>2</sub>O bidistillée, Stériliser à 121°C pendant 20min et conserver à température ambiante.

#### Marqueurs de poids moléculaire

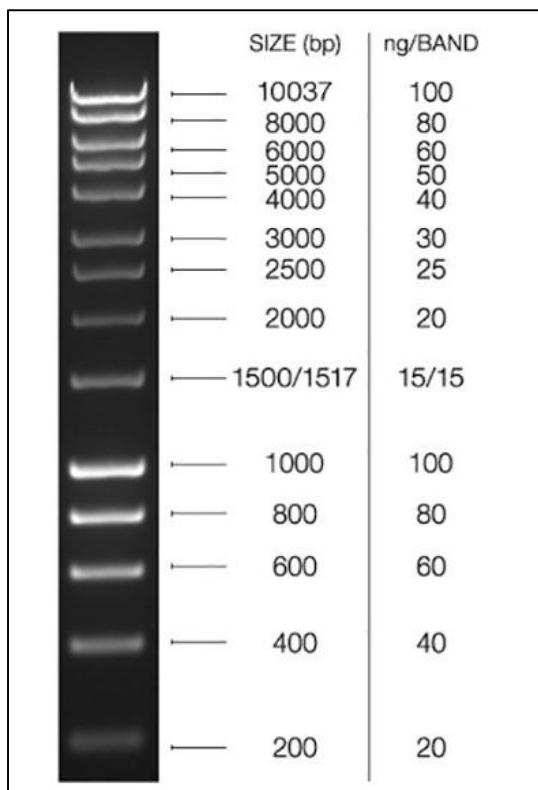
**HyperLadder™ (IV) 100bp Bioline**



**HyperLadder™ (II) 50bp Bioline**



### HyperLadder™ (I) 1kb Bioline



### Annexe 6 : Données climatiques des régions prospectées

#### *Nedroma*

Le climat de Nedroma est chaud et tempéré. L'été, à Nedroma, les pluies sont moins importantes qu'elles ne le sont en hiver. Selon la classification de Köppen-Geiger, le climat est de type Csa. La température moyenne annuelle à Nedroma est de 16.9 °C. Chaque année, les précipitations sont en moyenne de 399 mm. Entre le plus sec et le plus humide des mois, l'amplitude des précipitations est de 54 mm. 15.4 °C de variation sont affichés sur l'ensemble de l'année. 25.4 °C font du mois de Aout le plus chaud de l'année. 10.0 °C font du mois de Janvier le plus froid de l'année. Entre le plus sec et le plus humide des mois, l'amplitude des précipitations est de 54 mm. 15.4 °C de variation sont affichés sur l'ensemble de l'année.

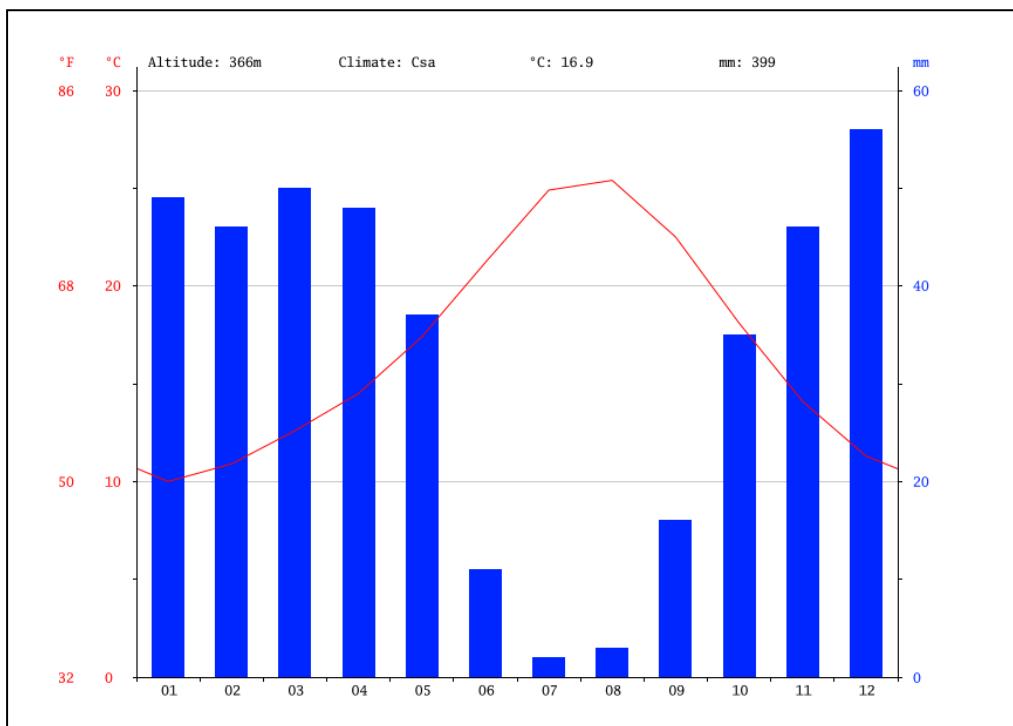
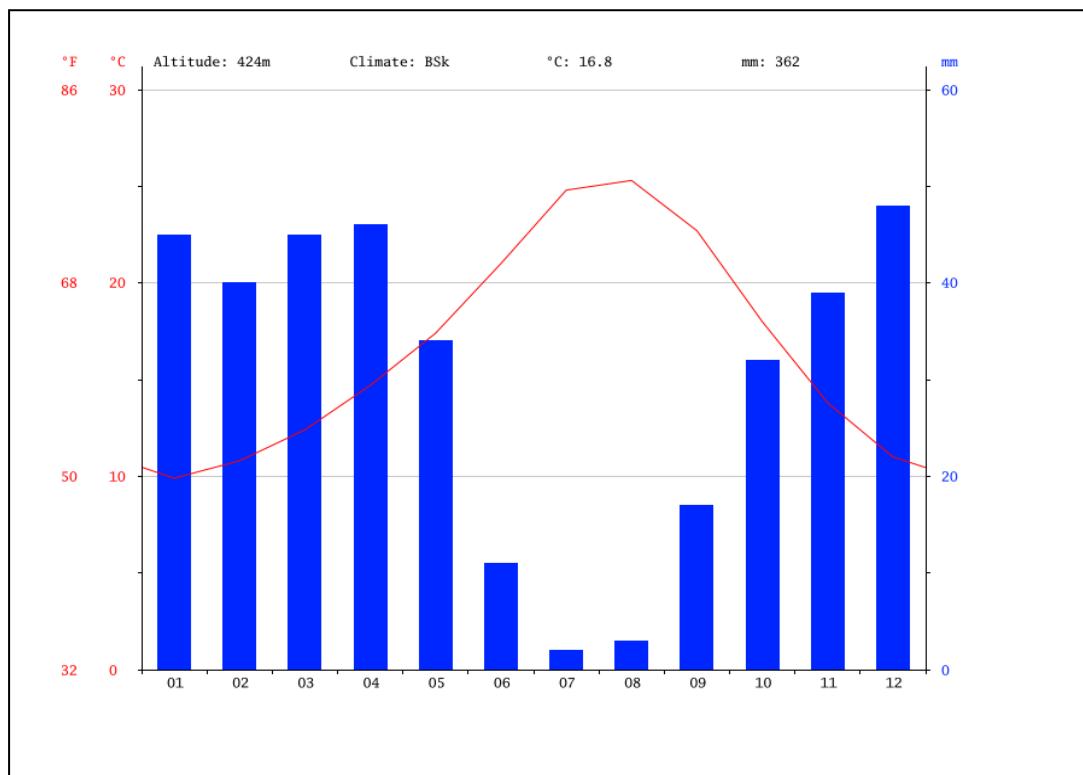


Figure : Variations de la température et des précipitations annuelles dans la région de Nedroma. [Https://images.climate-data.org/location/45777/climate-graph.png](https://images.climate-data.org/location/45777/climate-graph.png)

### Sidi Boudjenane

Sidi Boudjenane bénéficie d'un climat de steppe. A n'importe quel période de l'année, les précipitations sont faibles à Sidi Boudjenane. La classification de Köppen-Geiger est de type BSk. La température moyenne annuelle à Sidi Boudjenane est de 16.8 °C. La moyenne des précipitations annuelles atteint 362 mm.

Une différence de 46 mm est enregistrée entre le mois le plus sec et le mois le plus humide. Une variation de 15.4 °C est enregistrée sur l'année. Août est le mois le plus chaud de l'année. La température moyenne est de 25.3 °C à cette période. Janvier est le mois le plus froid de l'année. La température moyenne est de 9.9 °C à cette période. Une différence de 46 mm est enregistrée entre le mois le plus sec et le mois le plus humide. Une variation de 15.4 °C est enregistrée sur l'année.



**Figure :** Variations de la température et des précipitations annuelles dans la région de Sidi Boudjnjene. [Https://fr.climate-data.org/location/342218/](https://fr.climate-data.org/location/342218/)

### Misserghin

Le climat de Misserghin est chaud et tempéré. En hiver, les pluies sont bien plus importantes à Misserghin qu'elles ne le sont en été. Cet emplacement est classé comme Csa par Köppen et Geiger. Misserghin affiche une température annuelle moyenne de 17.8 °C. Sur l'année, la précipitation moyenne est de 407 mm.

Entre le plus sec et le plus humide des mois, l'amplitude des précipitations est de 67 mm. Entre la température la plus basse et la plus élevée de l'année, la différence est de 13.8 °C. 25.4 °C font du mois de Aout le plus chaud de l'année. Le mois le plus froid de l'année est celui de Janvier avec une température moyenne de 11.6 °C. Entre le plus sec et le plus humide des mois, l'amplitude des précipitations est de 67 mm. Entre la température la plus basse et la plus élevée de l'année, la différence est de 13.8 °C.

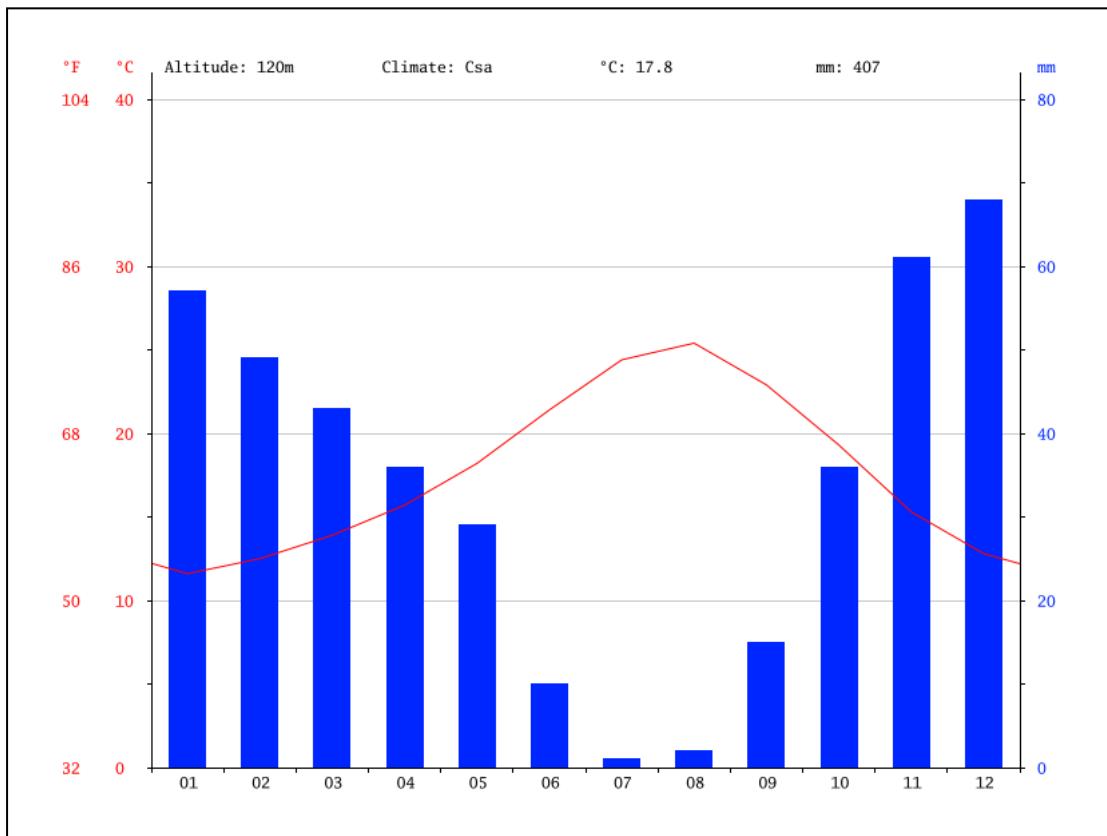
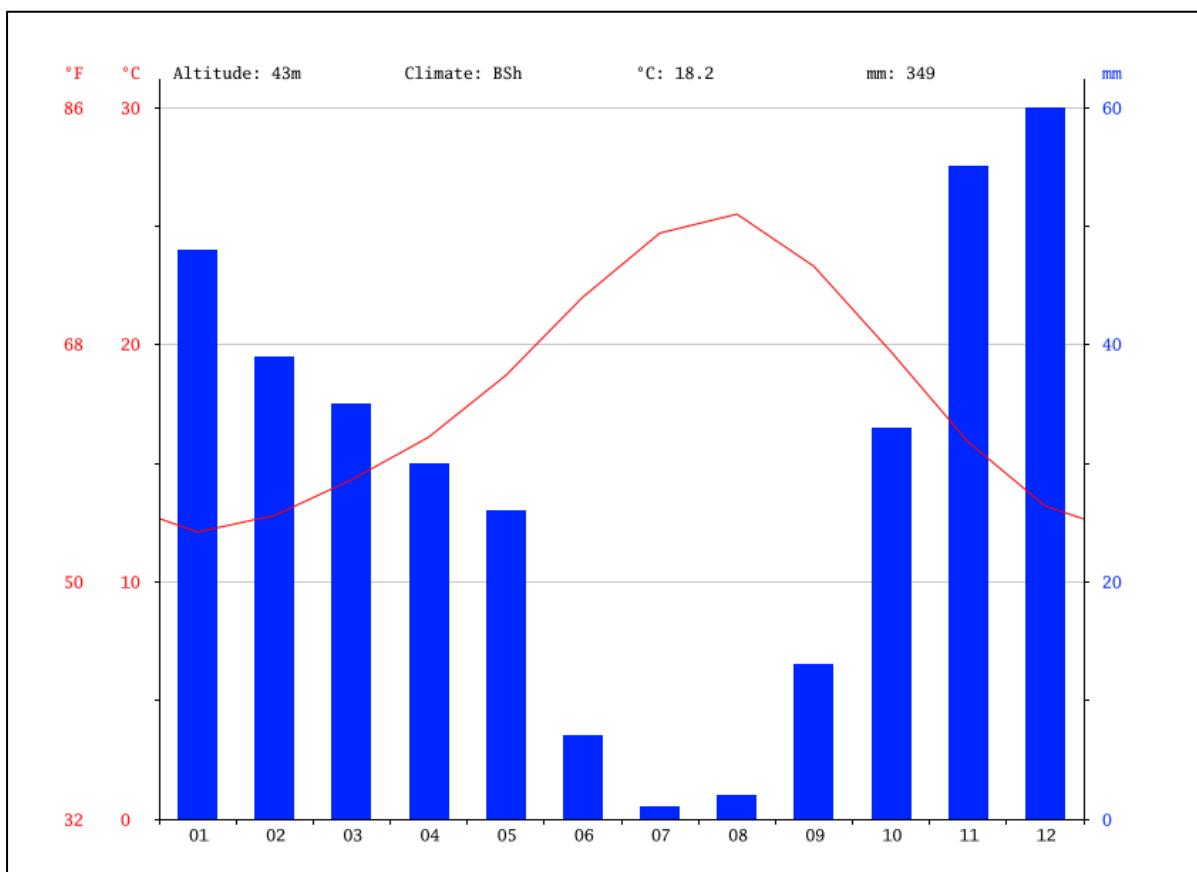


Figure : Variations de la température et des précipitations annuelles dans la région de Misserghin. [Https://fr.climate-data.org/location/425230/](https://fr.climate-data.org/location/425230/)

### Kristel

Kristel bénéficie d'un climat de steppe. Tout au long de l'année, il y a peu de précipitations à Kristel. La carte climatique de Köppen-Geiger y classe le climat comme étant de type BSh. La température moyenne annuelle est de 18.2 °C à Kristel. Il tombe en moyenne 349 mm de pluie par an.

Une différence de 59 mm est enregistrée entre le mois le plus sec et le mois le plus humide. Une variation de 13.4 °C est enregistrée sur l'année. Aout est le mois le plus chaud de l'année. La température moyenne est de 25.5 °C à cette période. Le mois le plus froid de l'année est celui de Janvier avec une température moyenne de 12.1 °C. Une différence de 59 mm est enregistrée entre le mois le plus sec et le mois le plus humide. Une variation de 13.4 °C est enregistrée sur l'année.



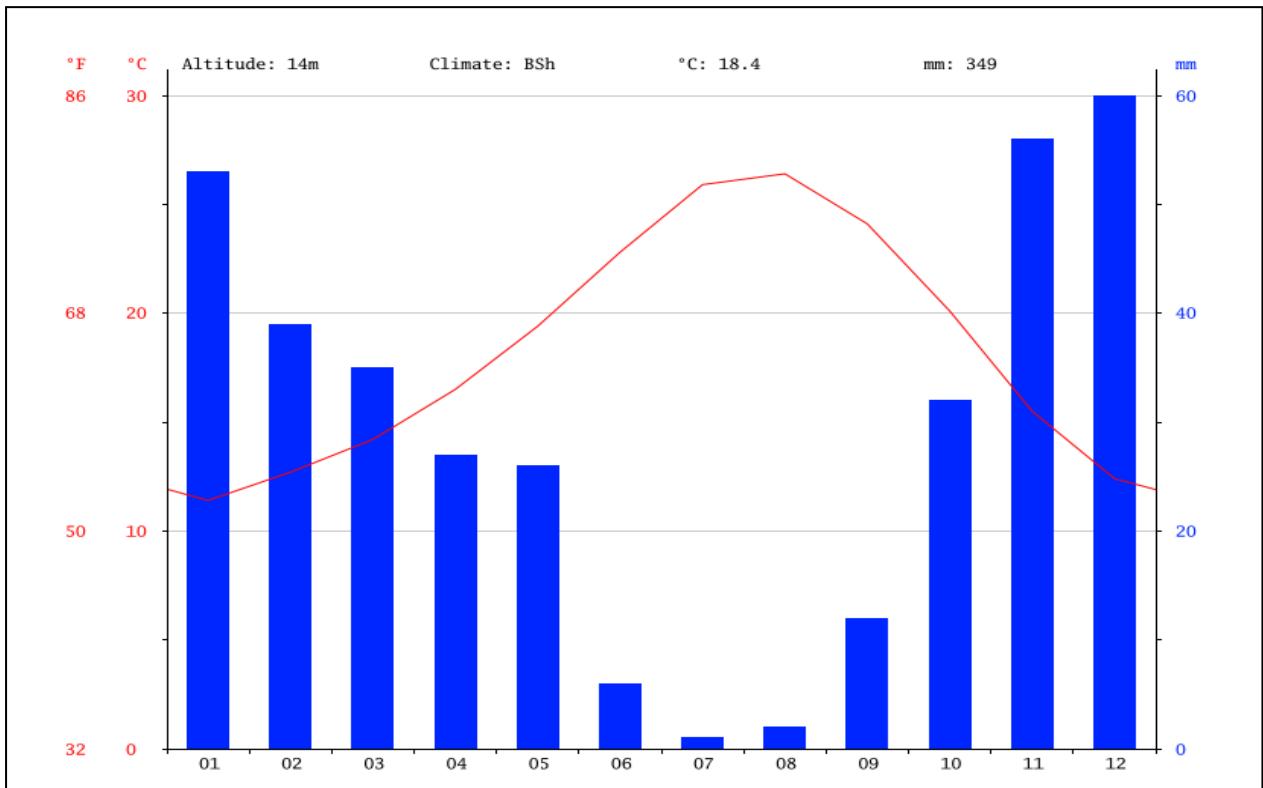
Variations de la température et des précipitations annuelles dans la région de Kristel.

<https://fr.climate-data.org/location/482630/>

### *Mactaâ*

Un climat de steppe est présent à Mactaâ. Les pluies sont faibles à Mactaâ Douz et ce toute l'année. La classification de Köppen-Geiger est de type BSh. La température moyenne annuelle est de 18.4 °C à Mactaâ Douz. Les précipitations annuelles moyennes sont de 349 mm.

Les précipitations varient de 59 mm entre le plus sec et le plus humide des mois. 15.0 °C de variation sont affichés sur l'ensemble de l'année. Au mois de Aout, la température moyenne est de 26.4 °C. Aout est de ce fait le mois le plus chaud de l'année. Avec une température moyenne de 11.4 °C, le mois de Janvier est le plus froid de l'année. Les précipitations varient de 59 mm entre le plus sec et le plus humide des mois. 15.0 °C de variation sont affichés sur l'ensemble de l'année.



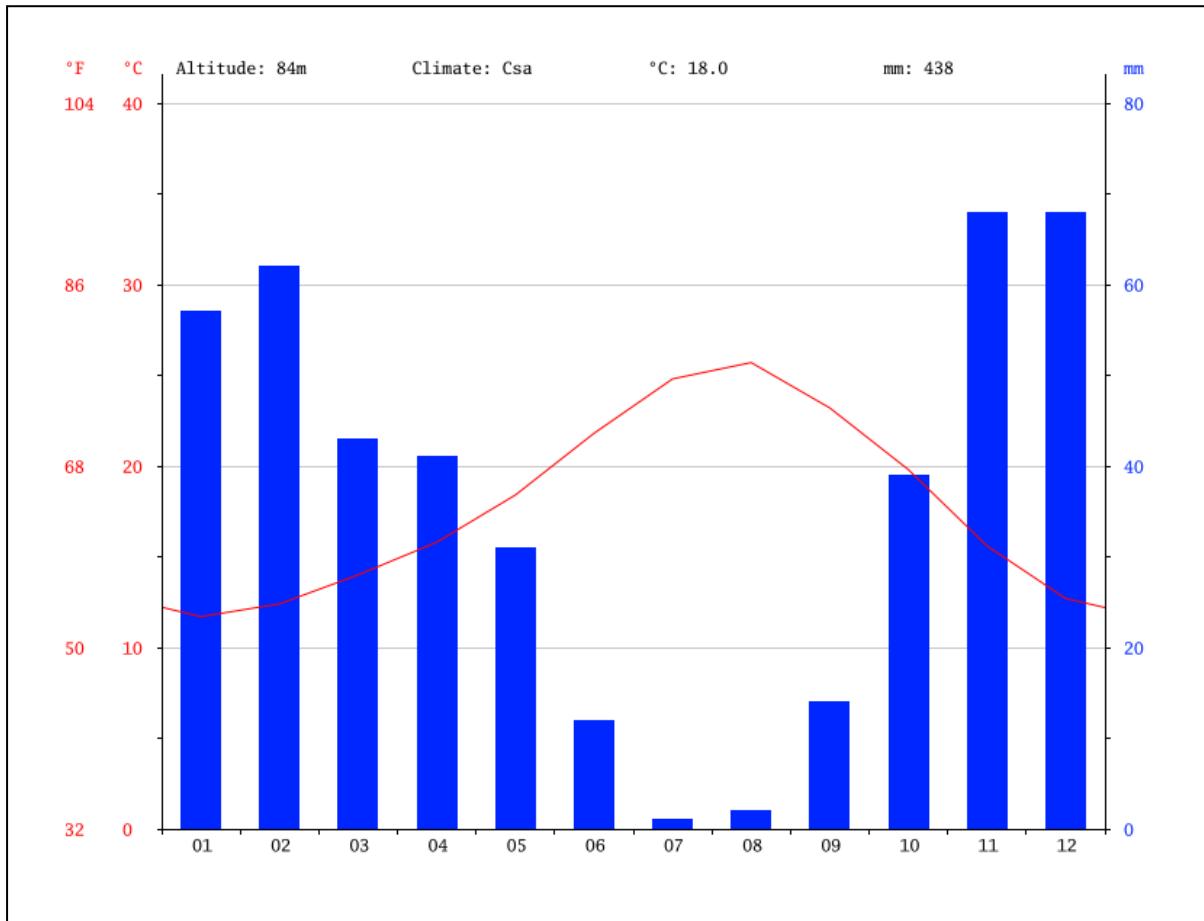
Variations de la température et des précipitations annuelles dans la région d'El-Mectaâ.

[Https://fr.climate-data.org/location/487401/](https://fr.climate-data.org/location/487401/)

### ***El Malah***

La ville de El Malah bénéficie d'un climat tempéré chaud. La pluie dans El Malah tombe surtout en hiver, avec relativement peu de pluie en été. La classification de Köppen-Geiger est de type Csa. El Malah affiche une température annuelle moyenne de 18.0 °C. Chaque année, les précipitations sont en moyenne de 438 mm

La différence de précipitations entre le mois le plus sec et le mois le plus humide est de 67 mm. Une variation de 14.0 °C est enregistrée sur l'année. Le mois le plus chaud de l'année est celui de Aout avec une température moyenne de 25.7 °C. Au mois de Janvier, la température moyenne est de 11.7 °C. Janvier est de ce fait le mois le plus froid de l'année. La différence de précipitations entre le mois le plus sec et le mois le plus humide est de 67 mm. Une variation de 14.0 °C est enregistrée sur l'année.



**Figure :** Variations de la température et des précipitations annuelles dans la région d'El-Maleh. [Https://fr.climate-data.org/location/45764/](https://fr.climate-data.org/location/45764/)

➤ **Annexe 7 : Analyse statistique**  
**Souche nodulaire**

Effect	Univariate Tests of Significance for Var2 (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	4,441281	1	4,441281	2038,077	0,000000
Var1	0,252249	52	0,004851	2,226	0,000339
Error	0,211378	97	0,002179		

LSD test; variable Var2 (Spreadsheet1) Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = ,00218, df = 97,000															
Var1	Var2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
SMT23	0,2990	***													
SMT36	0,2880	***	***												
SMC26p	0,2860	***	***												
SMH12	0,2660	***	***	***											
SMT11	0,2517	***	***	***	***										
SMK42	0,2500	***	***	***	***										
SMB4	0,2351	***	***	***	***	***									
SMV20	0,2287	***	***	***	***	***	***	***							
SMV12a	0,2193	***	***	***	***	***	***	***	***						
SMB23	0,2173	***	***	***	***	***	***	***	***	***					
SMK54	0,2150	***	***	***	***	***	***	***	***	***					
SMB27	0,2143	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***				
SMB8p	0,2135	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***			
Temoind+	0,2100		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMB8	0,2081		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMV84	0,2073		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMB6a	0,2005			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMB18	0,1978			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMC24	0,1975			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMB8P	0,1960			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMT15	0,1957			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMV81	0,1950			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMK3C	0,1883			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMK3a	0,1880			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMC29	0,1860			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMH21p	0,1853			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMB15	0,1782				***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMK31C	0,1774				***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMC26	0,1773				***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMB2	0,1727				***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMK25a	0,1713				***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMB8b	0,1710				***	***	***	***	***	***	***	***	***		
SMT22	0,1640					***	***	***	***	***	***	***	***		
Temoind-	0,1600					***	***	***	***	***	***	***	***		
SMV13	0,1555					***	***	***	***	***	***	***	***		
SMK52	0,1530					***	***	***	***	***	***	***	***		
SMB7	0,1519					***	***	***	***	***	***	***	***		
SMK5a	0,1503						***	***	***	***	***	***	***		
SMT13	0,1500						***	***	***	***	***	***	***		
SMT17a	0,1488						***	***	***	***	***	***	***		

SMV26	0,1463						***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SMB30	0,1440						***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SMK25b	0,1435						***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SMT16	0,1363						***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SMC15	0,1360						***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SMT24	0,1338						***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SMB13	0,1303								***	***	***	***	***	***	***	***	***
SMB19	0,1300								***	***	***	***	***	***	***	***	***
SMH19	0,1286									***	***	***	***	***	***	***	***
SMB19p	0,1286										***	***	***	***	***	***	***
SMK63	0,1255											***	***	***	***	***	***
SMT8a	0,1253												***	***	***	***	***
SMC16	0,1137													***	***	***	***
SMT7	0,1110															***	***

*Souches racinaires*

Effect	Univariate Tests of Significance for Var2 (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,279860	1	0,279860	787,2514	0,000000
Var1	0,035333	18	0,001963	5,5218	0,000005
Error	0,013509	38	0,000355		

Cell No.	Var1	Var2 Mean	LSD test; variable Var2 (Spreadsheet1) Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search)					
			1	2	3	4	5	6
6	SET26	0,026033	****					
5	SEM47	0,027600	****					
19	TEMOIN	0,030100	****					
4	SEM27	0,041167	****	****				
11	SET13	0,056000	****	****	****			
14	SEM52	0,063433		****	****	****		
12	SET25	0,069500		****	****	****		
16	SEM19	0,071700		****	****	****		
9	SET4	0,072533			****	****		
3	SET32	0,072633			****	****		
8	SEM25	0,072933			****	****	****	
1	SET33	0,075700			****	****	****	
17	SET8	0,076167			****	****	****	
15	SEM22	0,083400			****	****	****	
13	SEM24	0,083667			****	****	****	
18	SEM44	0,088367				****	****	
2	SET5M	0,092200				****	****	
10	SET12	0,104033					****	****
7	SEM50	0,124167						****

# Diversity of nodular bacteria of *Scorpiurus muricatus* in western Algeria and their impact on plant growth

Zoulikha Bouchiba, Zineb Faiza Boukhatem, Zohra Ighilhariz, Nouria Derkaoui, Benaissa Kerdouh, Hanaa Abdelmoumen, Younes Abbas, Mustapha Missbah El Idrissi, and Abdelkader Bekki

**Abstract:** A total of 51 bacterial strains were isolated from root nodules of *Scorpiurus muricatus* sampled from 6 regions of western Algeria. Strain diversity was assessed by rep-PCR amplification fingerprinting, which grouped the isolates into 28 different clusters. Partial nucleotide sequencing of the 16S rRNA gene and BLAST analysis revealed that root nodules of *S. muricatus* were colonized by different species close to *Rhizobium vignae*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium leguminosarum*, *Phyllobacterium ifriqiense*, *Phyllobacterium endophyticum*, *Starkeya* sp., and *Pseudomonas* sp. However, none of these strains was able to form nodules on its host plant; even *nodC* was present in a single strain (SMT8a). The inoculation test showed a great improvement in the growth of inoculated plants compared with noninoculated control plants. A significant amount of indole acetic acid was produced by some strains, but only 2 strains could solubilize phosphate. In this report we described for the first time the diversity of bacteria isolated from root nodules of *S. muricatus* growing in different regions in western Algeria and demonstrated their potential use in promoting plant growth.

**Key words:** diversity, nodular bacterial, plant-growth-promoting rhizobacteria, *Scorpiurus muricatus*, western Algeria.

**Résumé :** Un total de 51 souches bactériennes ont été isolées de nodules racinaires de *Scorpiurus muricatus* échantillonnés dans 6 régions de l'ouest de l'Algérie. La diversité des souches a été évaluée par empreinte de l'amplification par rep-PCR qui a permis de grouper les isolats en 28 grappes différentes. Le séquençage nucléotidique partiel du gène de l'ARNr 16S et l'analyse par BLAST ont révélé que les nodules racinaires de *S. muricatus* étaient colonisés par différentes espèces proches de *Rhizobium vignae*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium leguminosarum*, *Phyllobacterium ifriqiense*, *Phyllobacterium endophyticum*, *Starkeya* sp. et *Pseudomonas* sp. Toutefois, aucune de ces souches n'était capable de former un nodule sur sa plante hôte même si *nodC* était présent dans une souche unique (SMT8a). Le test d'inoculation a révélé une grande amélioration de la croissance des plants inoculés comparativement au contrôle non inoculé. Une quantité significative d'acide indolacétique était produite par certaines souches mais seules deux souches pouvaient solubiliser le phosphate. Dans ce rapport, les auteurs ont décrit pour la première fois la diversité des bactéries isolées des nodules racinaires de *S. muricatus* croissant dans différentes régions de l'ouest de l'Algérie et démontré leur utilité potentielle dans la promotion de la croissance des plantes. [Traduit par la Rédaction]

**Mots-clés :** diversité, bactéries nodulaires, RFCP, *Scorpiurus muricatus*, ouest de l'Algérie.

## Introduction

Algeria suffers a serious forage production deficit mainly due to drought, increasing human pressure, and overgrazing (Sebbane et al. 2006; Nedjraoui and Bédrani 2008). It is necessary to promote fodder plants culture, especially those used for animal feeding and nitrogen soil imbalance restoration (Voisin et al. 2013).

*Scorpiurus muricatus* is a spontaneous Mediterranean annual legume that is quite common in Algeria with a large distribution through the country (Bensalem et al. 1990). It has a great ecological amplitude because of its high tolerance to different soil types, pH, and drought (Ehrman and Cocks 1990; Yahiaoui-Younsi et al. 2000; M'Hammed-Bouzina et al. 2005). It protects soil from

Received 5 August 2016. Revision received 12 February 2017. Accepted 13 February 2017.

**Z. Bouchiba, Z.F. Boukhatem, Z. Ighilhariz, N. Derkaoui, and A. Bekki.** Laboratoire de Biotechnologie des Rhizobiums et Amélioration des Plantes, Université d'Oran1 Ahmed Ben Bella, Oran, Algérie.

**B. Kerdouh.** Centre de Recherche Forestière, Agdal-Rabat, Maroc.

**H. Abdelmoumen and M. Missbah El Idrissi.** Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, Faculté des sciences, Université Mohammed V, Rabat, Maroc.

**Y. Abbas.** Faculté Polydisciplinaire de Béni Mellal, Mghila B.P. 592, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal – Maroc.

**Corresponding author:** Zoulikha Bouchiba (email: [Zoulikhabouchiba@gmail.com](mailto:Zoulikhabouchiba@gmail.com)).

Copyright remains with the author(s) or their institution(s). Permission for reuse (free in most cases) can be obtained from [RightsLink](#).

erosion thanks to its strong and pivoting root system (Ouzzane and Abdelguerfi 1989).

This legume species has generally been neglected by researchers and farmers (Abbate et al. 2010), although it has a great potential as animal feed because of its high vegetative mass (Younsi 1991), high protein content, and forage quality (Licitra et al. 1997), as well as its high palatability and galactagogue effects (Di Giorgio et al. 2009). Furthermore, its ability to elicit symbiosis with soil bacteria, traditionally called rhizobia, allows the plant to benefit from the fixed atmospheric nitrogen (Loi et al. 2000; Graham and Vance 2003).

Rhizobia are bacteria have the ability to form nodules and fix nitrogen through a symbiotic interaction with legumes. This symbiotic relationship is characterized by high specificity between the 2 partners and is controlled by a molecular dialogue (Wang et al. 2012). Because of their ecological and economic importance, these symbiotic bacteria have been extensively investigated and it is reported that the majority of legumes form symbiosis with members of genera that belong to the subclass *Alphaproteobacteria* (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium*) (Berrada and Fikri-Benbrahim 2014). More recently, the genera *Neorhizobium* and *Pararhizobium* were proposed by Mousavi et al. (2014, 2015). Some legumes, such as *Mimosa* sp. plant species, are nodulated predominately by members of the subclasses *Betaproteobacteria*, such as *Burkholderia* and *Cupriavidus* genera (Gyaneshwar et al. 2011), and *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*), which was reported to nodulate black locust (Shiraishi et al. 2010).

Many studies have shown that legumes have an intrinsic capacity to accommodate both symbiotic and non-symbiotic endophytic bacteria within root nodules (Sturz et al. 1997; Zakhia et al. 2006; Li et al. 2008; Deng et al. 2011). These nonsymbiotic bacteria were not able to induce nodules or fix nitrogen symbiotically.

Endophytic bacteria can be defined as those bacteria that colonize the internal tissue of the plant, showing no external sign of infection or negative effect on their host (Holliday 1989; Schulz and Boyle 2006). Of the nearly 300 000 plant species that exist on the earth, each individual plant is thought to be a host to one or more endophytes (Strobel et al. 2004). The ability to colonize internal plant tissues is limited to a range of microbes, endophytes, and symbionts because plants have developed sophisticated surveillance systems for monitoring microbial presence or invasion, as well as the corresponding response strategies (Jones and Dangl 2006; Turner et al. 2013). However, little is known about the mechanisms controlling the endophytic infection. In a recent study; Zgadzaj et al. (2015) demonstrated that the invasion of nodules by endophytic bacteria is controlled by plant symbiotic genes, and it depends on a functional Nod-factor-induced infection pathway.

Safranova et al. (2004) were able to isolate some rhizobial strains from *S. muricatus* nodules, and these bacteria were able to re-infect the plant in in vitro experiments. Muresu et al. (2008) failed to recover authentic rhizobia from *S. muricatus* nodules. However, they were able to show by direct PCR amplification of the 16S rRNA gene from isolates from nodules that rhizobia (*Mesorhizobium* sp.) existed and were predominant inside the nodules but were in a nonculturable state.

To our knowledge, there are no studies about the nodular microorganisms associated with *S. muricatus* in the south Mediterranean area.

The present work investigates, for the first time, the diversity of bacteria isolated from root nodules of *S. muricatus* growing spontaneously in different regions of western Algeria. This work highlights also their potential in plant growth promotion.

## Materials and methods

### Sampling and physicochemical soil analysis

Prospection was conducted in periods (2 to 4 weeks) following precipitations. Soils were sampled around spontaneous plants of *S. muricatus* and prospected in 6 locations in western Algeria (Table 1). Soil subsampling was performed around each plant at a depth of 20 cm. Then, representative soil homogenates for each site were prepared by mixing the various individual subsamples, which were subjected to a physicochemical analysis: pH (Callot and Dupuis 1980), electrical conductivity (Aubert 1978), total and active limestone (Drouineau 1942; Callot and Dupuis 1980), organic carbon (Anne 1945), total nitrogen (Kjeldahl 1883), and phosphorus (Olsen et al. 1954). Nodules were found in all sites, collected from roots of *S. muricatus*, and stored in tubes containing CaCl<sub>2</sub>.

### Soil trapping assay

For the regions in which nodules presence was weak, a trapping assay was performed according to Bala et al. (2001) and Diouf et al. (2007). Seeds of *S. muricatus* were scarified with sulfuric acid (95%) for 45 min, then surface sterilized with CaClO (3%) for 1 min and thoroughly rinsed with sterile distilled water. Seeds were then placed on water agar (0.8%) at 28 °C in the dark for pre-germination. After 36 h of incubation, the germinated seeds were aseptically transferred to sterile glass tubes containing nitrogen-free plant nutritive solution (Bertrand 1997). Soil suspensions were prepared by diluting 10 g of soil samples in 90 mL of sterile physiological solution (NaCl, 0.9%) and shaken for 1 h. A series of soil dilutions were carried out in sterilized physiological solution (0.9%). One millilitre of each dilution was added to each tube 3 days after plant transfer. Four repetitions were performed per treatment. Uninoculated plants served as the control. Nodules appeared after 6 weeks of culture; they were harvested and used for strains isolation (Table 1).

**Table 1.** Origin and genotypic characteristics of strains isolated from *Scorpiurus muricatus* root nodules.

Strain	Sample site (geographic coordinates)	Closest partial 16S rRNA gene sequence (% similarity)	Acc. No.	rep-PCR group
SMC26	El-Mactaa (35°47'16.3N, 0°06'45.8W)	—	—	01
SMC26p		—	—	02
SMC24*		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (97%)	KX397266	01
SMC29		<i>Pseudomonas brenneri</i> (97%)	KX397260	04
SMC16*		<i>Rhizobium vignae</i> (97%)	KX397270	24
SMC15*		<i>Rhizobium vignae</i> (97%)	KX397274	10
SMH12	El-Maleh (35°22'55.6N, 1°05'30.9W)	<i>Rhizobium radiobacter</i> (98%)	KX397256	01
SMH19		—	—	14
SMH21p		<i>Rhizobium radiobacter</i> (97%)	KX397264	13
SMK31C	Kristel (35°46'37.0N, 0°30'48.4W)	<i>Rhizobium nepotum</i> (96%)	KX397269	19
SMK63		—	—	03
SMK52		<i>Starkeya novella</i> (96%)	KX397262	03
SMK42		—	—	20
SMK5a		—	—	05
SMK25a		—	—	05
SMK3a		<i>Rhizobium vignae</i> (97%)	KX397276	10
SMK3C		—	—	25
SMK54		<i>Phyllobacterium endophyticum</i> (96%)	KX397278	26
SMK25b		—	—	27
SMV20	Messerghin (35°36'16.9N, 0°47'03.1W)	—	—	22
SMV81		<i>Starkeya novella</i> (96%)	KX397263	03
SMV84		—	—	06
SMV13		<i>Starkeya novella</i> (96%)	KX397255	03
SMB6a		—	—	16
SMV26		—	—	12
SMV12a		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (97%)	KX397275	10
SMT11	Nedroma (35°02'37.8N, 1°29'39.5W)	—	—	01
SMT8a		<i>Phyllobacterium ifriqiyyense</i> (98%)	KX397265	28
SMT24		<i>Starkeya novella</i> (96%)	KX397261	14
SMT13		<i>Phyllobacterium endophyticum</i> (97%)	KX397272	23
SMT17a		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (97%)	KX397273	10
SMT15		<i>Rhizobium radiobacter</i> (98%)	KX397258	11
SMT7		—	—	17
SMT16b		—	—	10
SMT23		—	—	20
SMT36		<i>Pseudomonas brenneri</i> (97%)	KX397257	08
SMT22		<i>Rhizobium vignae</i> (97%)	KX397277	06
SMB7	Sidi Boudjnene (34°57'25.9N, 1°58'59.2W)	—	—	08
SMB27		—	—	01
SMB8		<i>Rhizobium vignae</i> (97%)	KX397279	08
SMB4		—	—	15
SMB19		—	—	07
SMB13		—	—	07
SMB23		<i>Rhizobium vignae</i> (97%)	KX397267	18
SMB30		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (97%)	KX397268	09
SMB2		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (98%)	KX397271	10
SMB19p		—	—	03
SMB8b		—	—	05
SMB8p		—	—	06
SMB18		<i>Pseudomonas</i> sp. (92%)	KX397259	16
SMB15		—	—	21

\*Strains obtained by trapping test.

**Bacterial isolation and growth conditions**

Nodules collected in natura and from trapping assays were surface-sterilized with 3% calcium hypochlorite for 3 min, rinsed 7 times with sterile distilled water, and

then crushed in 100 µL of sterile distilled water. The nodules homogenates were spread on a yeast mannitol agar (YMA) supplemented with 0.0025% (*m/v*) Congo red and the plates were incubated at 26 °C for 3–7 days

(Vincent 1970). The surface nodules sterilization was controlled, by spreading of 100 µL of final rinse water on YMA. The purity of colonies showing morphological characteristics close to rhizobial strains was checked by repeated streaking on YMA plates and by microscopic examination of living cells (Gram staining). The isolates were stored at 4 °C on YMA slopes for common use and at -80 °C in 20% glycerol (v/v) for long-term storage.

#### DNA extraction and rep-PCR fingerprinting

Bacteria were grown in tryptone-yeast extract agar medium (Beringer 1974) tubes for 24–48 h at 26 °C, and colonies were suspended in 2 mL of distilled water. The suspensions were then centrifuged twice at 3000 r/min for 15 min. The pellet was suspended in 0.5 mL of sterile distilled water, and then genomic DNA was extracted by the heat-shock method (Guerrouj et al. 2013). The suspension was incubated overnight at -20 °C, followed immediately by incubation at 100 °C for 10 min. Rep-PCR (repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction) with ERIC primers ERIC1 and ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAACG-3' and 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAAC-3') (Versalovic et al. 1991) was used for DNA amplification. The DNA template was denatured for 5 min at 95 °C, and PCR was carried out for 35 cycles (94 °C for 30 s, 52 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min), with a final elongation step at 72 °C for 7 min. PCR products were analyzed by horizontal electrophoresis in 2% agarose gels in 1x Tris-borate-EDTA (TBE) buffer at 55 V for 4 h. Gels were stained with ethidium bromide. The profiles were photographed under UV light (Fisher Scientific System Photo Print).

Comparative analysis of electrophoretic ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR) patterns was performed with Statistica 13 software by using UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages).

#### Amplification and sequencing of 16S rDNA genes

The 16S rDNA of 25 isolates, selected by referring to the groups formed by the ERIC-PCR analysis was partially sequenced (930 bp). The strains' 16S rDNA fragments were amplified with the 2 opposing primers fd1 and rd1 (5-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3' and 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al. 1991). Cycling conditions were as follows: 5 min at 95 °C for denaturation and PCR was carried out for 30 cycles (94 °C for 30 s, 57,3 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min 30 s) with a final elongation step at 72 °C for 7 min. Amplification products were checked by horizontal electrophoresis in 1% agarose gels in TBE buffer at 70 V for 1 h. Gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV light.

Amplification products were purified with the Qiagen PCR product purification system and subjected to cycle sequencing using the same primers as for PCR amplification, with ABI Prism dye chemistry. The products were analyzed with a 3130xl automatic sequencer at the sequencing facilities of National Centre for Scientific and

Technical Research (CNRST) in Rabat (Morocco). The obtained sequences were compared with those from GenBank using the BLASTN program (Altschul et al. 1990). The obtained sequences were used to retrieve those of related species from the GenBank database. Sequences were aligned using ClustalX software (Thompson et al. 1997). Distances calculated according to Kimura's 2-parameter model (Kimura 1980) were used to infer phylogenetic trees with the neighbor-joining analysis (Saitou and Nei 1987) with MEGA 6 software (Tamura et al. 2013).

#### *nodC* amplification

The primers pair *nodCFn* (5'-AGGTGGTYGAYGACGGTTC-3' (251–269)) and *nodCI* (5'-CGYGACAGCCANTCKCTATTG-3' (1160–1181)) (Laguerre et al. 2001) was used to detect nodulation genes according to the following program: 5 min at 95 °C for denaturation, and PCR was carried out for 30 cycles (94 °C for 30 s, 57,6 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min), with a final elongation step at 72 °C for 7 min. Amplification products were checked by horizontal electrophoresis in 1% agarose gels in TBE buffer at 70 V for 1 h. Gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV light. The reference strain *Rhizobium leguminosarum* (ORS639) was used as positive control.

#### Plant inoculation tests and statistical analysis

Seeds of *S. muricatus* were scarified as previously described. The germinated seeds were transferred to pots (250 mL) containing sterile soil (autoclaved twice at 120 °C for 1 h). Inoculation was performed using the method of Vincent (1970). All nodulation tests were performed in triplicate, and noninoculated plants were included as control; an assay containing KNO<sub>3</sub> (0.5 g/L) was used as a positive control. The nodulation assay was made too on hydroponic conditions. Plants were grown in sterile glass tubes containing nitrogen-free plant nutritive solution (Bertrand 1997) and were inoculated with 1 mL of bacterial suspension at 10<sup>9</sup> cells/mL of each isolate. Plants were grown under a constant temperature of 23 °C and a photoperiod of 16 h (light) : 8 h (dark) and were watered with nitrogen-free nutrient solution (Bertrand 1997). Effectiveness of the inoculation was estimated by dry mass comparison with uninoculated control plants. The inoculation efficiency (*E*) of each isolate was calculated using the following formula:

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

where *I* is the inoculated isolates, *C* is the uninoculated control, and *N* is the nitrogen-fertilized plants (Ferreira and Marques 1992).

The terms ineffective (I), medium (ME), and highly (HE) effective strains were adopted when *E* was <25, 25–74, or ≥75, respectively.

**Table 2.** Physicochemical characteristics of sites studied.

Site	pH	Conductivity (mmhos/cm)	Total calcareous (%)	Assimilable phosphorus (ppm)	Total nitrogen (%)	Organic matter (%)
El-Mactaa	7.70	0.5	4.5	36	1.58	2.0
El-Maleh	7.95	0.1	4.9	28	1.79	1.9
Kristel	7.49	0.3	4.5	23	1.29	1.8
Messerghin	7.60	0.3	4.3	49	1.08	1.5
Nedroma	8.10	0.3	4.6	35	1.37	1.8
Sidi Boudjnene	8.20	0.2	4.7	38	1.23	1.6

### Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using XLSTAT pro software (version 2016.02.28815). One-way analysis of variance (ANOVA) (strain effect on growth dry mass) was conducted, and the threshold used to determine the probability of significance was  $p \leq 0.05$ . Fisher's test was used for homogeneous group determination.

### Production of equivalent indole acetic acid (IAA)

Equivalent IAA production was tested on Winogradsky medium (Holt et al. 1994) supplemented with tryptophan (5 g/L). The medium was inoculated with 100  $\mu$ L of bacterial cultures at approximately  $10^8$  CFU/mL and incubated at 30 °C for 96 h. The colorimetric assay was performed according to the method of Loper and Schroth (1986). The cultures were centrifuged at 5000 rpm for 20 min. One millilitre of the supernatant was added to 2 mL of Salkowski reagent (50 mL of 35% perchloric acid and 1 mL of 0.5 mol/L FeCl<sub>3</sub>) and 200  $\mu$ L of orthophosphoric acid. The optical density was measured at 530 nm after 30 min of incubation. Concentrations of equivalent IAA were determined using a calibration curve obtained in an interval of 0 to  $10^{-3}$  mol/L IAA (Fluka).

### Phosphate solubilization determination

The phosphate-solubilizing capacity was tested by the method described by Nautiyal (1999). A 10  $\mu$ L volume ( $10^8$  CFU/mL) of each bacterial culture was deposited in a spot on the surface of Pikovskaya agar medium (Pikovskaya 1948). After plates were incubated at 30 °C for 7 days, a transparent halo appeared around the colonies having the ability to solubilize the phosphates. The results were assessed and evaluated by measuring the diameter of halos around colonies (total diameter was calculated by subtracting colony diameter) to estimate the intensity of the Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> solubilization.

## Results and discussion

### Nodule prospection, trapping assay, and soil physicochemical analysis

All the sampled plants of *S. muricatus* harbored root nodules in natura. They had elongated-indeterminate or bifurcate nodules (Sprent et al. 2013). For all sites, nodulation rates were important, with the exception of the site of El Mactaa, in which the majority of nodules were not pink but greyish green and they were considered as senescent (Matamoros et al. 1999).

For the trapping test, after 6 weeks of plant growth, pink indeterminate nodules appeared on plant roots, indicating that there are rhizobia compatible with *S. muricatus* in El Mactaa soil.

The physicochemical analysis of the 6 studied soils (Table 2) showed that the majority of soils were alkaline, considered as nonsaline to slightly saline. They were poor in calcareous and showed low available phosphorus and organic matter levels. Their nitrogen content is medium to rich. Nitrogen is the important element affecting nodulation, as its presence in large quantities in soil negatively affects the nodulation process. According to Calvet and Villemin (1986), nitrogen level is considered medium if it varies between 1‰ and 1.5‰ in the soil sample and rich if it varies between 1.5‰ and 2.5‰.

### Bacterial isolation

A total of 48 strains were isolated (Table 1) from nodules of *S. muricatus* collected in natura; only 3 isolates were obtained by trapping test. The nodules obtained from in vitro (trapping) test gave low bacterial recovery on YMA; colonies aspect was whitish on Congo red. The isolates had a heterogeneous growth. Colonies appeared after 3–7 days and some were nearly colorless or white, others were “marbled” (milky curdled type) or circular with regular contour, convex, and produced extracellular mucous. Microscopic examination showed that all isolates were Gram-negative coccobacilli, as described by Vincent (1970) and Jordan (1984).

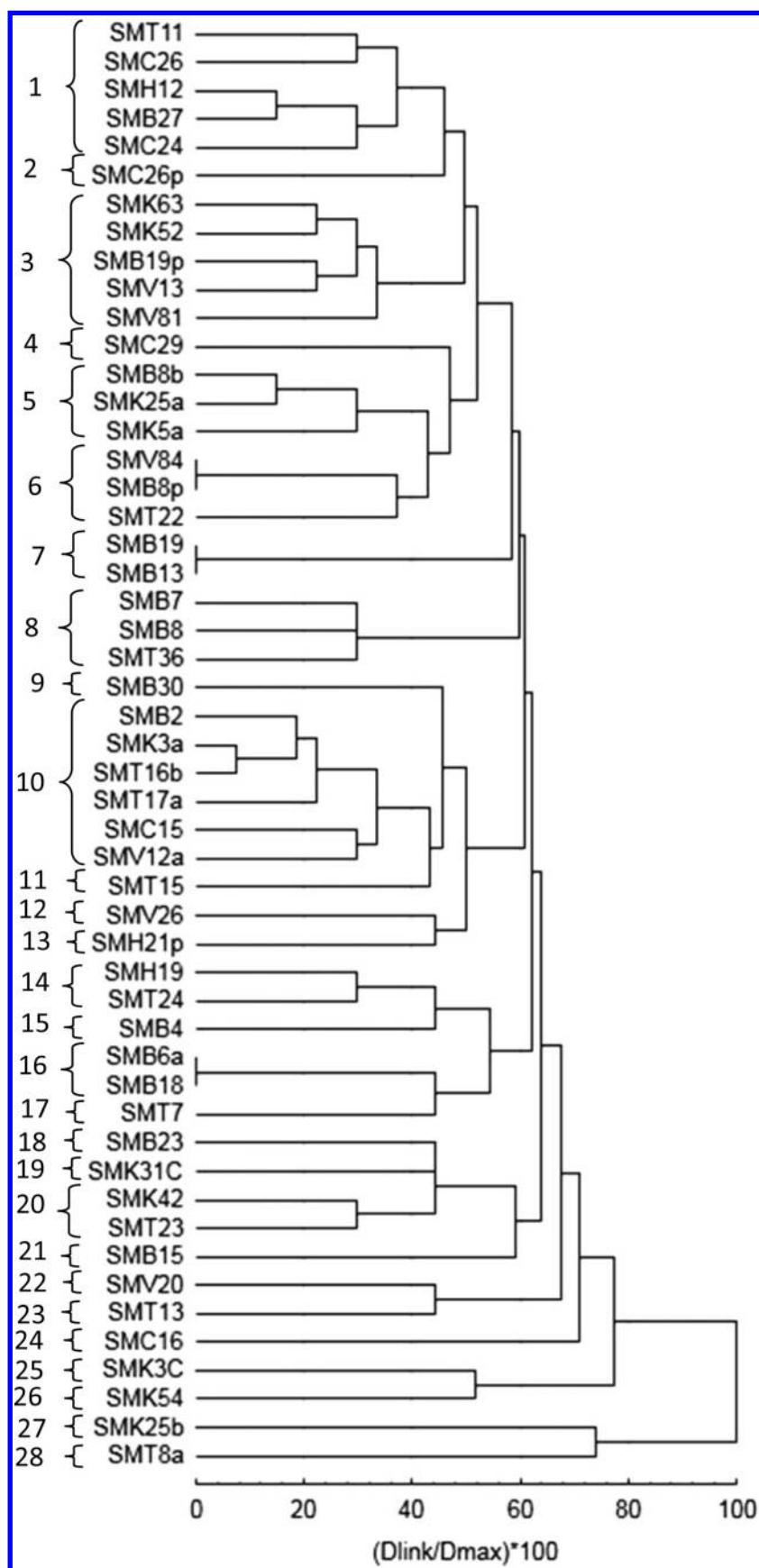
### rep-PCR fingerprinting

The overall diversity of isolates was first determined by ERIC-PCR DNA fingerprinting. Cluster analysis grouped strains by electrophoretic ERIC-PCR similarity and resulted in the dendrogram shown in Fig. 1.

At 60% similarity, isolates grouped into 28 clusters, containing strains from either the same or different sites of sampling, which highlights the great diversity of bacterial species colonizing *S. muricatus* nodules.

This technique is considered as a powerful tool for microbial ecology and evolution studies and is known to be highly discriminating (Ishii and Sadowsky 2009). It has been extensively used to cluster bacteria at subspecies or strain level (de Bruijn 1992) and has enabled identification of genetic diversity at the intraspecies level (Laguerre et al. 1997).

**Fig. 1.** Dendrogram, created by the unweighted pair group method using average linkages (UPGMA), showing clustering of ERIC-PCR fingerprints of the isolates of root nodules of *Scorpiurus muricatus*.



Twenty-five isolates were then selected following the results of the rep-PCR. Some representative strains were randomly chosen from clusters, and retained for 16S rDNA sequencing.

#### Sequencing of 16S rDNA genes

The results of sequencing analysis are shown in a phylogenetic tree (Fig. 2). Based on the comparison of sequences obtained by BLAST, the isolates were affiliated with 4 genera (*Rhizobium*, *Starkeya*, *Phyllobacterium*, and *Pseudomonas*). However, the construction of a phylogenetic tree by the neighbor-joining method permitted grouping of the isolates into 7 clusters.

The 1st cluster was close to *Rhizobium vignae* and constituted 5 strains isolated from different regions: El Mactaa (SMC15, SMC16), Sidi Boudjnene (SMB 23), Nedroma (SMT22), and Kristel (SMK3a). The species *R. vignae* is described as a symbiotic partner of different wild legumes, such as *Astragalus dahuricus*, *Astragalus oxyglottis* (Zhao et al. 2008), *Vigna radiata* (Zhang et al. 2006), and *Desmodium microphyllum* (Gu et al. 2007).

The 2nd cluster comprised 1 strain (SMK31C) isolated from Kristel and it was close to *Rhizobium nepotum*. This species was isolated from tumors on various plant species in Hungary (Puławska et al. 2012).

The 3rd cluster grouped 3 isolates (SMT15, SMH12, SMH21p) and was close to *Rhizobium radiobacter*. This is in agreement with the results reported by Muresu et al. (2008), who detected *Agrobacterium* in nodules of *S. muricatus* grown in Sardinia. *Agrobacterium* was reclassified into the genus *Rhizobium* (Young et al. 2001) and was the first to be reported and best studied endophytes of legume nodules (Peix et al. 2015; Velázquez et al. 2013). *Agrobacterium* species were found in nodules of herbaceous legumes, such as *Melilotus dentatus*, *Crotalaria pallid*, *Trifolium fragiferum*, *Hedysarum spinosissimum*, and *Glycine max* (Wang et al. 2006; Kan et al. 2007; Muresu et al. 2008).

The 4th group was close to the species *R. leguminosarum*, and it included 5 strains: 2 strains from Sidi Boudjnene (SMB30, SMB2), 1 strain from El Mactaa (SMC24), 1 strain from Nedroma (SMT17a), and 1 strain from Messerghin (SMV12a). Several authors have shown that *R. leguminosarum* bv. *viciae* could be isolated from nodules of genera *Pisum*, *Vicia*, *Lens*, and *Lathyrus* (Laguerre et al. 2003; Depret and Laguerre 2008).

The 5th group included 3 strains (SMT8a, SMK54 and SMT13). The strain SMT8a was close to *Phyllobacterium ifriqiense*, while strains SMK54 and SMT13 were close to *Phyllobacterium endophyticum*. The genus *Phyllobacterium* includes strains inducing infective nodules on *Trifolium pretense* and *Lupinus albus* roots (Sturz et al. 1997; Valverde et al. 2005) and *Dalbergia louvelli* (Rasolomampianina et al. 2005). Species of this genus were reported as endophytes in nodules of *Agryrolobium*, *Astragalus*, *Calycotome*, and *Lathyrus* in Tunisia (Zakhia et al. 2006), and *Oxytropis* and *Glycyrrhiza* in China (Lei et al. 2008; Li et al. 2012). *Phyllobacterium ifriqiense* was isolated for the first time in

southern Tunisia from root nodules of *Lathyrus numidicus* and *Astragalus algerianus* (Mantelin et al. 2006). *Phyllobacterium endophyticum* was isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* but was not able to produce nodules (Flores-Félix et al. 2013).

The 6th group of strains was affiliated with *Starkeya* sp. and strains were far from the known species of *Starkeya novella* and *S. korensis*. *Starkeya novella* had been isolated from nodules of *Retama raetam* in a semi-arid zone of Tunisia (Zakhia et al. 2006).

The last group included strains Smb18, SMT36, and SMC29 and grouped with the genus *Pseudomonas*. Shiraishi et al. (2010) reported that some species of *Pseudomonas* could induce nodules on legumes. Species of this genus were described as legume nodule endophytes in several species of *Hedysarum* (Benhizia et al. 2004), *Medicago truncatula*, and *Hedysarum carnosum* in Tunisia (Zakhia et al. 2006). The species *P. fluorescens* was found in nodules of *Sphaerophysa salsula* in China (Deng et al. 2011).

Few studies have been done on nodular bacteria of *S. muricatus*. Muresu et al. (2008) reported, after direct sequencing of nodules content, the presence of bacteria belonging to the genera *Mesorhizobium*, *Bacillus*, and *Thiobacillus*, and on the basis of PCR-RFLP analysis, the rhizobial isolates from *Scorpiurus* were grouped with the *Mesorhizobium loti* in Sardinia (Safronova et al. 2004). So, it could be assumed that the isolated strains from western Algeria were more diverse than what has been reported in the literature.

However, in this study, comparison between ERIC-PCR clustering and partial 16S rDNA did not reflect intraspecies genetic diversity, as reported by Laguerre et al. (1997), i.e., *R. leguminosarum* grouped with *Rhizobium radiobacter* and *R. vignae*. Among the 48 isolates, we found 25 strains belonging to 8 different bacterial species. Some species could be very diverse, whereas others may not be. As reported by Laguerre et al. (1997), rep-PCR using ERIC, REP, or BOX A1R primers could not be used as a tool for taxonomic analysis.

#### *nodC* amplification

We were unable to amplify the *nodC* gene for the majority of strains by using primer pair *nodCF*-*nodCI*. Only SMT8a and reference strain ORS639 presented an amplification product of 930 bp. The absence of amplification product was probably due to the fact that symbiotic bacteria have dissimilar *nod* genes and it doesn't exist universal primers (Laguerre et al. 2001). Many studies indicated that the *nodABC* genes are present in the majority of characterized rhizobia (Cooper 2007), but exceptions do exist, as was reported by Liu et al. (2014), who demonstrated that the strain *Rhizobium vignae* CCBAU 05176 possesses just a single encoding gene *nod* factor: *nodT*. In addition, Giraud et al. (2007) reported the absence of *nod* genes in some rhizobia, as described for the association between *Bradyrhizobium* and *Aeschynomene*. In that work, many of the isolated strains were shown not

**Fig. 2.** Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence (>900 nt) analysis of new and reference strains. Neighbor-joining method integrating Kimura-2 distance was used. Data are bootstrap values issued from 1000 repetitions.



to be rhizobia, so it would be expected not to find *nod* genes. In fact, the lack of nodulation phenotype could be related to the absence of *nod* genes and could support the fact that these bacteria are accompanying flora in *S. muricatus* nodules. Indeed, Muresu et al. (2008) indicated the presence of bacteria belonging to the genera *Bacillus* and *Thiobacillus* in addition to *Mesorhizobium* within the nodules of *S. muricatus*.

#### Production of equivalent IAA

IAA could be considered as the main plant-growth-promoting trait for screening endophytic bacteria (Etesami et al. 2015). Seventy-eight percent of tested strains produce equivalent IAA (Table 3). The strains SMB19p, SMV81, and SMB23 produce high amounts of IAA (23, 61, and 135 µg/mL, respectively). Ghosh and Basu (2006) showed that a *Rhizobium* sp. isolated from *Phaseolus mungo* was able to produce 138 µg/mL IAA. The bacteria isolated from root nodules of *Vigna trilobata* could produce 92.6 µg/mL IAA (Kumar and Ram 2012). It was also reported that some strains of alfalfa symbiont, *Sinorhizobium meliloti*, produced 20 µg/mL IAA (Williams and Signer 1990), whereas strains of *R. leguminosarum* produced 2.0 µg/mL IAA (Beltra et al. 1980). So, nodule endophytic bacteria could produce different levels of IAA.

According to Hunter (1989), Patten and Glick (2002), and Fedorova et al. (2005), IAA production by nodular bacteria could be involved in other plant hormones production, in several steps of symbiotic relationship, and in nodule development.

#### Phosphate solubilization determination

The ability of the strains to solubilize inorganic phosphate was tested on Pikovskaya solid medium, and we found that only strains SMB27 and SMBV18 had this ability. These strains developed clear halos around the colonies after 7 days of incubation. These halos had diameters of 18.3 and 20.7 mm for SMB27 (*Rhizobium radiobacter*) and SMV81 (*Rhizobium vignae*), respectively. However, Gupta et al. (1994) showed that some strains have the ability to solubilize the phosphorus in liquid medium, although they do not produce visible halo on plates. The ability to solubilize Pi is an important trait in plant-growth-promoting bacteria for increasing plant yields (Rodríguez et al. 2006).

The species belonging to genera *Rhizobium* and *Pseudomonas* are considered as the most efficient phosphate solubilizers (Dudeja 2016). But in this study, just the strains belonging to the genus *Rhizobium* are in agreement with this observation. Actually, not all *Pseudomonas* strains have good phosphate-solubilizing ability, and there are a lot of other soil bacteria reported as more efficient in phosphate solubilization, such as *Bacillus* and *Enterobacter* (Jain and Kichi 2014).

#### Plant inoculation tests

Although some strains were identified as *Rhizobium* and *Phyllobacterium* by sequencing of the 16S rRNA gene

(Table 1), the nodulation tests on *S. muricatus* were negative for all the tested strains on autoclaved soil and under hydroponic conditions. Values of shoot dry mass were used to calculate the index of effectiveness. The results showed that more than half of the assayed isolates were effective in growth promotion. Results also showed that strain SMT23 had the highest index of effectiveness ( $E = 278\%$ ) (Table 3). Statistical analysis of the dry mass showed a significant difference ( $p = 0.0005$ ) between the different treatments. The highest value was obtained by inoculation with strain SMT23. However, it appears that the growth improvement of the plants is not corroborated with the amount of IAA produced by the strains.

In fact, inoculation with strains SMB19p, SMV81, and SMB23 did not show a significant difference either with the positive control or the negative control, suggesting that strain SMT23 should have other beneficial activities that promote the growth of the plant. Muresu et al. (2008) failed to recover rhizobia from the nodules of *S. muricatus* and isolated strains belonging to the genera *Bacillus* and *Thiobacillus*. However, using direct 16S rRNA PCR from nodules they were able to demonstrate that strains belonging to the genus *Mesorhizobium* exist within the nodules but were in a nonculturable state. This confirms the coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with various endophytic bacterial. An abundance of these bacterial endophytes within perfectly healthy plants suggests that other beneficial interactions may be operative. Endophytic bacteria have several beneficial effects on host plants, such as plant growth promotion and increased resistance against plant pathogens and parasites. They may offer more benefits and are able to interact with the host in variable environmental conditions as well (Bacon and White 2000; Coutinho et al. 2015). They are not recognized by the plant as pathogens. They enhance growth of the plant by increasing the acquisition of essential nutrients that involve nitrogen, phosphorus, and iron or by modulation of hormone levels synthesizing auxin, cytokinin, or gibberellins (Chaturvedi et al. 2016). Furthermore, some endophytes can lower levels of the phytohormone ethylene by synthesizing the aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase that cleaves the compound ACC, the immediate precursor of ethylene in all higher plants. Indirect promotion occurs by production of antagonistic substances against bacterial or fungal pathogens (Glick 2015; Saini et al. 2015).

Endophytic bacteria are found in legume roots as well as in nodules and have multiple functions (George et al. 2013; Kumar et al. 2013). Palaniappan et al. (2010) have shown the ability of endophytic strains to enhance plant growth of *Lespedeza* sp. grown in South Korea, and Sturz et al. (1997) reported also that some bacteria unable to nodulate their host plant could stimulate plant growth. However, there are few studies about symbiotic microorganisms associated with *S. muricatus*. Safronova et al.

**Table 3.** Strain efficiency, and their traits promoting plant growth.

Strain	Shoot dry mass (g)*	Effectiveness index (E) (%)†	IAA production (µg/mL)‡	Phosphate solubilization — halo diameter (mm)‡
SMT7	0.111000n	/	6.0	-
SMC16	0.113667mn	/	9.0	-
SMT8a	0.125333lmn	/	-	-
SMK63	0.125500lmn	/	2.5	-
SMH19	0.128567klmn	/	5.8	-
SMB19p	0.128567klmn	/	23.0	-
SMB19	0.130000jklmn	/	4.5	-
SMB13	0.130333ijklmn	/	3.1	-
SMT24	0.133833hijklmn	/	ND	-
SMC15	0.136000ghijklmn	/	ND	-
SMT16b	0.136333ghijklmn	/	-	-
SMK25b	0.143500ghijklmn	/	6.6	-
SMB30	0.144033ghijklmn	/	-	-
SMV26	0.146333fghijklmn	/	4.5	-
SMT17a	0.148800fghijklmn	/	2.6	-
SMT13	0.150000fghijklmn	/	6.0	-
SMK5a	0.150333fghijklmn	/	6.3	-
SMB7	0.151900efghijklmn	/	ND	-
SMK52	0.153000efghijklmn	/	6.6	-
SMV13	0.155500efghijklmn	/	5.0	-
SMT22	0.164000efghijklmn	6 (I)	5.0	-
SMB8b	0.171000defghijklmn	22 (I)	ND	-
SMK25a	0.171333defghijklmn	22.66 (I)	3.8	-
SMB2	0.172667defghijklmn	24 (I)	6.2	-
SMC26	0.177286defghijklmn	34.572 (ME)	ND	-
SMK31C	0.177400defghijklmn	34.8 (ME)	ND	-
SMB15	0.178150defghijklmn	36.3 (ME)	ND	-
SMH21p	0.185333cddefghijklmn	50.666 (ME)	6.3	-
SMC29	0.186033cddefghijklmn	52.066 (ME)	3.0	-
SMK3a	0.188000cddefghijklmn	56 (ME)	-	-
SMK3C	0.188333cddefghijklmn	56.666 (ME)	5.0	-
SMV81	0.195000cddefghijklmn	70 (ME)	61.0	20.7
SMT15	0.195667cddefghijklm	0.71334 (ME)	6.1	-
SMC24	0.197500cddefghijklm	75 (HE)	-	-
SMB18	0.197833cddefghijklm	75.666 (HE)	ND	-
SMB6a	0.200467cddefghijkl	80.934 (HE)	ND	-
SMV84	0.207300bcddefghijkl	94.6 (HE)	3.6	-
SMB8p	0.207667bcddefghijkl	95.334 (HE)	ND	-
SMB8	0.208100bcddefghij	96.2 (HE)	ND	-
SMB27	0.214333bcddefghi	108.66 (HE)	-	18.3
SMK54	0.215000abcddefgh	110 (HE)	1.8	-
SMB23	0.217333abcddefgh	114.666 (HE)	135.0	-
SMV12a	0.219333abcddefg	118.666 (HE)	-	-
SMV20	0.228667abcdef	137.334 (HE)	2.0	-
SMB4	0.235067abcde	150.134 (HE)	-	-
SMK42	0.250000abcd	180 (HE)	4.5	-
SMT11	0.251667abcd	183.334 (HE)	2.5	-
SMH12	0.266000abc	212 (HE)	2.6	-
SMC26p	0.286000ab	252 (HE)	ND	-
SMT36	0.288000ab	256 (HE)	ND	-
SMT23	0.299000a	278 (HE)	3.1	-
Uninoculated control -	0.160000efghijklmn	/		
Uninoculated control +	0.210000bcddefghijk	/		

\*Values followed by the same lowercase letter are not significantly different.

†/, no improvement; I, ineffective; ME, medium effective; HE, highly effective.

‡-, negative; ND, not done.

(2004) were the only researchers who showed that 7 isolated strains from root nodules of *S. muricatus* were able to nodulate their plant host (*S. muricatus*) as well as *Lotus cytisoides*, *L. ornithopodioides*, and *Ornithopus compressus*.

Several reports confirmed the colonization of nodules by various bacteria unable to form nodules or fix N<sub>2</sub> (Sprent 2009). According to Mhamdi et al. (2005), their presence in nodules could be explained either by a mixed infection with rhizobia or by the acquisition of a symbiotic plasmid that might be highly unstable and lost during the isolation and preservation processes.

## Conclusion

In this work, we assessed the diversity of 51 bacteria isolated from *S. muricatus* root nodules. They were isolated from 6 different regions of western Algeria. The analysis of diversity by ERIC-PCR allowed the grouping of the isolates into 28 different clusters. The 16S rDNA gene was partially sequenced for some representative strains from each cluster as well as other strains randomly selected. The phylogenetic analysis permitted the identification of different bacterial species that colonize *S. muricatus* nodules. They were closely related to *Rhizobium vignae*, *R. leguminosarum*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium nepotum*, *Phyllobacterium ifriquensis*, *Phyllobacterium endophyticum*, *Starkeya* sp., and *Pseudomonas* sp. These results demonstrate that *S. muricatus* nodule bacteria are very diverse. Our results showed the ability of some strains to produce significant amounts of IAA and that they could be good plant-growth-promoting rhizobacteria because they improved significantly the growth of inoculated plants even though no nodules were formed. The nodulation gene (*nodC*) was positively detected only in a single strain.

Although 9 strains were phylogenetically affiliated with *R. leguminosarum* and *R. vignae* none of them nodulated their plant host. *Scorpiurus muricatus* was well nodulated in natura; however, as was observed by Muresu et al. (2008), this symbiotic interaction did not work in vitro. They also failed to isolate strains able to renodulate this legume species, although they demonstrated the presence of rhizobia and other endophytes, such as *Bacillus* and *Thiobacillus*, inside the nodules. We could suggest that some biotic or abiotic factors that are present in soil are indispensable for nodulation establishment in this legume species.

## References

- Abbate, V., Maugeri, G., Cristaudo, A., and Gresta, F. 2010. *Scorpiurus muricatus* L. subsp. *subvillosum* (L.) Thell., a potential forage legume species for a Mediterranean environment: a review. *Grass Forage Sci.* **65**: 2–10. doi:[10.1111/j.1365-2494.2009.00722.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2009.00722.x).
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410. doi:[10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2). PMID:[2231712](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1622669/).
- Anne, P. 1945. Le dosage rapide du carbone organique dans les sols. *Ann. Agron.* **5**(2): 161–172.
- Aubert, G. 1978. Méthode d'analyse des sols. CRDP, Marseille.
- Bacon, C.W., and White, J. 2000. *Microbial endophytes*. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Bala, A., Murphy, P., and Giller, K.E. 2001. Genetic diversity of rhizobia from natural populations varies with the soil dilution sampled. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 841–843. doi:[10.1016/S0038-0717\(00\)00221-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00221-2).
- Belfra, R., Diaz, F., and Fraile, G. 1980. The formation of growth substances by *Rhizobium* species. *Zentralbl. Bakteriol., Parasitenkd., Infektionskrankh. Hyg., Abt.* **135**: 617–622.
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., and Squartini, A. 2004. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**(4): 462–468. doi:[10.1078/0723202041438527](https://doi.org/10.1078/0723202041438527). PMID:[15368852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15368852/).
- Bensalem, K., Abdelguerfi, A., and Abdelguerfi-Berrekaia, R. 1990. Relations du genre *Scorpiurus* L. avec certains facteurs du milieu en Algérie. *Fourrages*, **124**: 407–419.
- Beringer, J.E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, **84**: 188–198. doi:[10.1099/00221287-84-1-188](https://doi.org/10.1099/00221287-84-1-188).
- Berrada, H., and Fikri-Benbrahim, K. 2014. Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. *Br. Microbiol. Res. J.* **4**(6): 616–639. doi:[10.9734/BMRJ/2014/5635](https://doi.org/10.9734/BMRJ/2014/5635).
- Bertrand, H. 1997. Stimulation de l'absorption minérale et de la croissance du Colza inoculé avec des bactéries isolées de son rhizoplan. Université Claude Bernard Lyon, Lyon I: 99.
- Callot, G., and Dupuis, M. 1980. Le calcaire actif des sols et sa signification. *Bull. Afes*, **17**–26.
- Calvet, G., and Villemin, P. 1986. Interprétation des analyses de terre, IPAS, SADEF-SCPA, Aspac le Bas, France.
- Chaturvedi, H., Singh, V., and Gupta, G. 2016. Potential of bacterial endophytes as plant growth promoting factors. *J. Plant Pathol. Microbiol.* **7**: 376. doi:[10.4172/2157-7471.1000376](https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000376).
- Cooper, J.E. 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 1355–1365. doi:[10.1111/j.1365-2672.2007.03366.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03366.x). PMID:[17953546](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17953546/).
- Coutinho, B.G., Licastro, D., Mendonça-Previato, L., Câmara, M., and Venturi, V. 2015. Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **28**: 10–21. doi:[10.1094/MPMI-07-14-0225-R](https://doi.org/10.1094/MPMI-07-14-0225-R). PMID:[25494355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25494355/).
- de Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(7): 2180–2187. PMID:[1637156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1637156/).
- Deng, Z.S., Zhao, L.F., Kong, Z.Y., Yang, W.Q., Lindström, K., Wang, E.T., and Wei, G.H. 2011. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsola* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiol. Ecol.* **76**: 463–475. doi:[10.1111/j.1574-6941.2011.01063.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01063.x). PMID:[21303396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21303396/).
- Depret, G., and Laguerre, G. 2008. Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations nodulating pea. *New Phytol.* **179**: 224–235. doi:[10.1111/j.1469-8137.2008.02430.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02430.x). PMID:[18373650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18373650/).
- Di Giorgio, G., Graziano, D., Ruisi, P., Amato, G., and Giambalvo, D. 2009. Pheno-morphological and agronomic diversity among *Scorpiurus muricatus* (Fabaceae) natural populations collected in Sicily. *J. Agric. Sci.* **147**: 411–422. doi:[10.1017/S0021859609008661](https://doi.org/10.1017/S0021859609008661).
- Diouf, D., Samba-Mbaye, R., Lesueur, D., Ba, A.T., Dreyfus, B., de Lajudie, P., and Neyra, M. 2007. Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. *Microb. Ecol.* **54**(3): 553–566. doi:[10.1007/s00248-007-9243-0](https://doi.org/10.1007/s00248-007-9243-0). PMID:[17406772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406772/).

- Drouineau, G. 1942. Dosage rapide du calcaire actif des sols. Nouvelles données sur la répartition et la nature des fractions calcaires. Ann. Agron. **12**: 441–450.
- Dudeja, S.S. 2016. Beneficial effects and molecular diversity of endophytic bacteria in legume and non legumes. In Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity. Vol. 1. Edited by D.P. Singh, H.B. Singh, and R. Prabha. Springer, New Delhi. pp. 245–256. doi:[10.1007/978-81-322-2647-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_14).
- Ehrman, T., and Cocks, P.S. 1990. Ecogeography of annual legumes in Syria: distribution patterns. J. Appl. Ecol. **27**: 578–591. doi:[10.2307/2404303](https://doi.org/10.2307/2404303).
- Etesami, H., Alikhani, H.A., and Hosseini, H.M. 2015. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. MethodsX, **2**: 72–78. doi:[10.1016/j.mex.2015.02.008](https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.02.008). PMID:[26150974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26150974/).
- Fedorova, E., Redondo, F.J., Koshiba, T., Pueyo, J.J., de Felipe, M.R., and Lucas, M.M. 2005. Aldehyde oxidase (AO) in the root nodules of *Lupinus albus* and *Medicago truncatula*: identification of AO in meristematic and infection zones. Mol. Plant-Microbe Interact. **18**: 405–413. doi:[10.1094/MPMI-18-0405](https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0405). PMID:[15915639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15915639/).
- Ferreira, E.M., and Marques, J.F. 1992. Selection of Portuguese *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifoli* strains for production of legume inoculants. Plant Soil, **147**: 151–158. doi:[10.1007/BF00009381](https://doi.org/10.1007/BF00009381).
- Flores-Félix, J.-D., Carro, L., Velázquez, E., Valverde, Á., Cerda-Castillo, E., García-Fraile, P., and Rivas, R. 2013. *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **63**: 821–826. doi:[10.1099/ijsl.0.038497-0](https://doi.org/10.1099/ijsl.0.038497-0). PMID:[22611197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22611197/).
- George, P., Gupta, A., Gopal, M., Thomas, L., and Thomas, G.V. 2013. Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and *Enterobacter* sp. RNF 267 isolated from the rhizosphere of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). World J. Microbiol. Biotechnol. **29**: 109–117. PMID:[22948479](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22948479/).
- Ghosh, S., and Basu, P.S. 2006. Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. Microbiol. Res. **161**: 362–366. doi:[10.1016/j.micres.2006.01.001](https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.01.001). PMID:[16473504](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16473504/).
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.C., et al. 2007. Legumes symbioses: absence of *Nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. Science, **316**(5829): 1307–1312. doi:[10.1126/science.1139548](https://doi.org/10.1126/science.1139548). PMID:[17540897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17540897/).
- Glick, B.R. 2015. Beneficial plant-bacterial interactions. Springer, Cham, Switzerland. doi:[10.1007/978-3-319-13921-0](https://doi.org/10.1007/978-3-319-13921-0).
- Graham, P.H., and Vance, C.P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiol. **131**(3): 872–877. doi:[10.1104/pp.017004](https://doi.org/10.1104/pp.017004). PMID:[12644639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12644639/).
- Gu, J., Wang, E.T., and Chen, W.X. 2007. Genetic diversity of rhizobia associated with *Desmodium* species grown in China. Lett. Appl. Microbiol. **44**: 286–292. doi:[10.1111/j.1472-765X.2006.02071.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02071.x). PMID:[17309506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17309506/).
- Guerrouj, K., Pérez-Valera, E., Chahboune, R., Abdelmoumen, H., Bedmar, E.J., and El Idrissi, M.M. 2013. Identification of the rhizobial symbiont of *Astragalus glombiformis* in eastern Morocco as *Mesorhizobium camelthorni*. Antonie van Leeuwenhoek, **104**(2): 187–198. doi:[10.1007/s10482-013-9936-y](https://doi.org/10.1007/s10482-013-9936-y). PMID:[23673873](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23673873/).
- Gupta, R., Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R.C., and Saxena, R.K. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol. **40**: 255–260. doi:[10.2323/jgam.40.255](https://doi.org/10.2323/jgam.40.255).
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A.M., Moulin, L., Chen, W.M., Elliott, G.N., Bontemps, C., et al. 2011. Legume-nodulating Betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. Mol. Plan-Microbe Interact. **24**(11): 1276–1288. doi:[10.1094/MPMI-06-11-0172](https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0172). PMID:[21830951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21830951/).
- Holliday, P. 1989. A dictionary of plant pathology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. Bergy's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, Md., USA. pp. 518–537.
- Hunter, W.J. 1989. Indole-3-acetic acid production by bacteroids from soybean root nodules. Physiol. Plant. **76**: 31–36. doi:[10.1111/j.1399-3054.1989.tb05448.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb05448.x).
- Ishii, S., and Sadowsky, M.J. 2009. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. Environ. Microbiol. **11**(4): 733–740. doi:[10.1111/j.1462-2920.2008.01856.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01856.x). PMID:[19207574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19207574/).
- Jain, P., and Kichi, D.S. 2014. Phosphate solubilizing microorganism (psm): an ecofriendly biofertilizer and pollution manager. J. Dyn. Agric. Res. **1**: 23–28.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. Nature, **444**(7117): 323–329. doi:[10.1038/nature05286](https://doi.org/10.1038/nature05286). PMID:[17108957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17108957/).
- Jordan, D.C. 1984. International committee on systematic bacteriology subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*: minutes of the meeting, 11 August 1982, Boston, Massachusetts. Int. J. Syst. Bacteriol. **34**: 248–248. doi:[10.1099/00207713-34-2-248](https://doi.org/10.1099/00207713-34-2-248).
- Kan, F.L., Chen, Z.Y., Wang, E.T., Tian, C.F., Sui, X.H., and Chen, W.X. 2007. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. Arch. Microbiol. **188**: 103–115. doi:[10.1007/s00203-007-0211-3](https://doi.org/10.1007/s00203-007-0211-3). PMID:[17541555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17541555/).
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. **16**: 111–120. doi:[10.1007/BF01731581](https://doi.org/10.1007/BF01731581). PMID:[7463489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7463489/).
- Kjeldahl, J. 1883. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. Z. Anal. Chem. **22**: 366–382.
- Kumar, R.P., and Ram, M.R. 2012. Production of indole acetic acid by *Rhizobium* isolates from *Vigna trilobata* (L) Verdc. Afr. J. Microbiol. Res. **6**: 5536–5541. doi:[10.5897/AJMR11.105](https://doi.org/10.5897/AJMR11.105).
- Kumar, V., Pathak, D.V., Dudeja, S.S., Saini, R., Narula, S., and Anand, R.C. 2013. Legume nodule endophytes more diverse than endophytes from roots of legumes or non-legumes in soils of Haryana, India. J. Microbiol. Biotechnol. Res. **3**(3): 83–92.
- Laguerre, G., van Berkum, P., Amarger, N., and Prévost, D. 1997. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. Appl. Environ. Microbiol. **63**(12): 4748–4758. PMID:[9406393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9406393/).
- Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., and Amarger, N. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. Microbiology, **147**: 981–993. doi:[10.1099/00221287-147-4-981](https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981). PMID:[11283294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11283294/).
- Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M.-R., and Amarger, N. 2003. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 2276–2283. doi:[10.1128/AEM.69.4.2276-2283.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2276-2283.2003). PMID:[12676710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12676710/).
- Lei, X., Wang, E.T., Chen, W.F., Sui, X.H., and Chen, W.X. 2008. Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. Arch. Microbiol. **190**: 657–671. doi:[10.1007/s00203-008-0418-y](https://doi.org/10.1007/s00203-008-0418-y). PMID:[18704366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18704366/).
- Li, J.H., Wang, E.T., Chen, W.F., and Chen, W.X. 2008. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. Soil Biol. Biochem. **40**: 238–246. doi:[10.1016/j.soilbio.2007.08.014](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.014).
- Li, L., Sinkko, H., Montonen, L., Wei, G., Lindström, K., and

- Räsänen, L.A. 2012. Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China. *FEMS Microbiol. Ecol.* **79**(1): 46–68. doi:[10.1111/j.1574-6941.2011.01198.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01198.x). PMID:[22066910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22066910/).
- Licitra, G., Carpino, S., Schadt, I., Avondo, M., and Barresi, S. 1997. Forage quality of native pastures in a Mediterranean area. *Anim. Feed Sci. Technol.* **69**: 315–328. doi:[10.1016/S0377-8401\(97\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00060-6).
- Liu, Y., Yi, Z., and Zeng, R. 2014. Draft genome sequence of a symbiotic bacterium, *Rhizobium vignae* CCBAU 05176<sup>T</sup>. *Genome Announc.* **2**(4): e00657-14. doi:[10.1128/genomeA.00657-14](https://doi.org/10.1128/genomeA.00657-14). PMID:[25081255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25081255/).
- Loi, A., Nutt, B.J., McRobb, R., and Ewing, M.A. 2000. Potential new alternative annual pasture legumes for Australian Mediterranean farming system. In *Legumes for Mediterranean forage crops, pastures and alternative uses*. Edited by L. Sulas. CIHEAM, Zaragoza. pp. 51–54.
- Loper, J.E., and Schroth, M.N. 1986. Influence of bacterial sources of indole-3 acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, **76**: 386–389. doi:[10.1094/Phyto-76-386](https://doi.org/10.1094/Phyto-76-386).
- Mantelin, S., Saux, M.F., Zakhia, F., Béna, G., Bonneau, S., Jeder, H., et al. 2006. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 827–839. PMID:[16585703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16585703/).
- Matamoros, M.A., Baird, L.M., Escuredo, P.R., Dalton, D.A., Minchin, F.R., Iturbe-Ormaetxe, I., et al. 1999. Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol.* **121**: 97–112. PMID:[10482665](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10482665/).
- Mhamdi, R., Mrabet, M., Laguerre, G., Tiwari, R., and Aouani, M.E. 2005. Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium*-like strains. *Can. J. Microbiol.* **51**: 105–111. doi:[10.1139/w04-120](https://doi.org/10.1139/w04-120). PMID:[16091768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16091768/).
- M'Hammed-Bouzina, M., Abdelguerfi-Laouar, M., Abdelguerfi, A., and Guittouneau, G. 2005. Autoécologie et distribution du complexe d'espèces *Scorpiurus muricatus* (*S. sulcatus*-*S. subvillosum*) en Algérie. *Acta Bot. Gallica*, **152**(1): 11–23. doi:[10.1080/12538078.2005.10515451](https://doi.org/10.1080/12538078.2005.10515451).
- Mousavi, S.A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., et al. 2014. Phylogeny of the *Rhizobium*-*Allorhizobium*-*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **37**(3): 208–215. doi:[10.1016/j.syapm.2013.12.007](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007). PMID:[24581678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24581678/).
- Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., and Lindström, K. 2015. Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**(2): 84–90. PMID:[25595870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25595870/).
- Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., et al. 2008. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**: 383–400. doi:[10.1111/j.1574-6941.2007.00424.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00424.x). PMID:[18194345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18194345/).
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 265–270. doi:[10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x). PMID:[9919677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9919677/).
- Nedraoui, D., and Bédran, S. 2008. La désertification dans les steppes algériennes: causes, impacts et actions de lutte. *Revue Vertigo*, **8**(1).
- Olsen, S.R., Cole, C.V., and Watanabe, F.S. 1954. Estimation of available phosphorous in soils by extraction with sodium bicarbonate. *Cir. U.S. Dep. Agr.*, No. 939, pp. 1–19.
- Ouzzane, A., and Abdelguerfi, A. 1989. Etude du système racinaire en minirhizotrons chez quatre légumineuses spontanées d'intérêt pastoral et fourrager. *Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach*, **13**(2): 568–580.
- Palaniappan, P., Chauhan, P.S., Saravanan, V.S., Anandham, R., and Sa, T. 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biol. Fertil. Soils*, **46**: 807–816. doi:[10.1007/s00374-010-0485-5](https://doi.org/10.1007/s00374-010-0485-5).
- Patten, C.L., and Glick, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3795–3801. doi:[10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002). PMID:[12147474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12147474/).
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E., and Bedmar, E.J. 2015. Bacterial associations with legumes. *Crit. Rev. Plant Sci.* **34**(1–3): 17–42. doi:[10.1080/07352689.2014.897899](https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899).
- Pikovskaya, R.E. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, **17**: 362–370.
- Puławska, J., Willems, A., De Meyer, S.E., and Süle, S. 2012. *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. *Syst. Appl. Microbiol.* **35**: 215–220. doi:[10.1016/j.syapm.2012.03.001](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.03.001). PMID:[22463808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22463808/).
- Rasolomampianina, R., Bailly, X., Fetiarison, R., Rabevohitra, R., Béna, G., Ramaroson, L., et al. 2005. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to alpha- and beta-Proteobacteria. *Mol. Ecol.* **14**: 4135–4146. doi:[10.1111/j.1365-294X.2005.02730.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02730.x). PMID:[16262864](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16262864/).
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., and Bashan, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil*, **287**: 15–21. doi:[10.1007/s11104-006-9056-9](https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9).
- Safranova, V.I., Piluzza, G., Belimov, A.A., and Bullitta, S. 2004. Phenotypic and genotypic analysis of rhizobia isolated from pasture legumes native of Sardinia and Asinara Island. *Antonie van Leeuwenhoek*, **85**: 115–127. doi:[10.1023/B:ANTO.0000020278.58236.77](https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020278.58236.77). PMID:[15031655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15031655/).
- Saini, R., Dudeja, S.S., Giri, R., and Kumar, V. 2015. Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivated in Northern India. *J. Basic Microbiol.* **55**: 74–81. doi:[10.1002/jobm.201300173](https://doi.org/10.1002/jobm.201300173). PMID:[25590871](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25590871/).
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**(4): 406–425. PMID:[3447015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3447015/).
- Schulz, B., and Boyle, C. 2006. What are endophytes? In *Microbial root endophytes*. Vol. 9. Edited by B.J.E. Schulz, C.J.C. Boyle, and T.N. Sieber. Springer, Berlin, Germany. pp. 1–13. doi:[10.1007/3-540-33526-9\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_1).
- Sebbane, N., Sahnoune, M., Zakhia, F., Willems, A., Benallaoua, S., and de Lajudie, P. 2006. Phenotypical and genotypical characteristics of root-nodulating bacteria isolated from annual *Medicago* spp. in Soummam Valley (Algeria). *Appl. Microbiol.* **42**: 235–241. doi:[10.1111/j.1472-765x.2005.01846.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2005.01846.x).
- Shiraishi, A., Matsushita, N., and Hougetsu, T. 2010. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Syst. Appl. Microbiol.* **33**(5): 269–274. doi:[10.1016/j.syapm.2010.04.005](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.04.005). PMID:[20542651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20542651/).
- Sprent, J.I. 2009. Legume nodulation: a global perspective. Wiley Blackwell, Oxford, UK. doi:[10.1002/9781444316384](https://doi.org/10.1002/9781444316384).
- Sprent, J.I., Ardley, J.K., and James, E.K. 2013. From north to south: a latitudinal look at legume nodulation processes. *S Afr. J. Bot.* **89**: 31–41. doi:[10.1016/j.sajb.2013.06.011](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.06.011).
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., and Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* **67**: 257–268. doi:[10.1021/np030397v](https://doi.org/10.1021/np030397v). PMID:[15198706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15198706/).
- Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G., and Nowak, J. 1997. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on

- host growth. *Biol. Fertil. Soils*, **25**: 13–19. doi:[10.1007/s003740050273](https://doi.org/10.1007/s003740050273).
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725–2729. doi:[10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197). PMID:[24132122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132122/).
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876–4882. doi:[10.1093/nar/25.24.4876](https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876). PMID:[9396791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9396791/).
- Turner, T.R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., et al. 2013. Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *ISME J.* **7**(12): 2248–2258. doi:[10.1038/ismej.2013.119](https://doi.org/10.1038/ismej.2013.119). PMID:[23864127](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23864127/).
- Valverde, A., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Vizcaíno, N., Rivas, R., Mateos, P.F., et al. 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1985–1989. doi:[10.1099/ijsm.0.63551-0](https://doi.org/10.1099/ijsm.0.63551-0). PMID:[16166699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16166699/).
- Velázquez, E., Martínez-Hidalgo, P., Carro, L., Alonso, P., Peix, A., Trujillo, M., and Martínez-Molina, E. 2013. Nodular endophytes: an untapped diversity. In *Beneficial plant-microbial interactions: ecology and applications*. Edited by M.B.R. González and J. González-López. CRC Press, Boca Raton, Fla., USA.
- Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res.* **19**: 6823–6831. doi:[10.1093/nar/19.24.6823](https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823). PMID:[1762913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1762913/).
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In *International biological programme handbook No. 15*. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, UK. pp. 73–97.
- Voisin, A.S., Guéguen, J., Huyghe, C., Jeuffroy, M.H., Magrini, M.B., Meynard, J.M., et al. 2013. Légumineuses dans l'Europe du XXI<sup>e</sup> siècle : Quelle place dans les systèmes agricoles et alimentaires actuels et futurs? Quels nouveaux défis pour la recherche? *Innovations Agronomiques*, **30**: 283–312.
- Wang, D., Yang, S., Tang, F., and Zhu, H. 2012. Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cell. Microbiol.* **14**(3): 334–342. doi:[10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x). PMID:[22168434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22168434/).
- Wang, L.L., Wang, E.T., Liu, J., Li, Y., and Chen, W.X. 2006. Endophytic occupation of root nodules and roots of *Melilotus dentatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Microb. Ecol.* **52**: 436–443. doi:[10.1007/s00248-006-9116-y](https://doi.org/10.1007/s00248-006-9116-y). PMID:[16897296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16897296/).
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697–703. doi:[10.1128/jb.173.2.697-703.1991](https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991). PMID:[1987160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1987160/).
- Williams, M.N.V., and Signer, E.R. 1990. Metabolism of tryptophan and tryptophan analogs by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **92**: 1009–1013. doi:[10.1104/pp.92.4.1009](https://doi.org/10.1104/pp.92.4.1009). PMID:[16667364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16667364/).
- Yahiaoui-Younsi, A., Abdelguerfi, A., and Bouazza, L. 2000. Etude de la floraison de trois espèces du genre *Scorpiurus* avec les conditions du milieu d'origine. *Cahiers options Méditerranéennes*, **45**: 245–248.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., and Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola*, and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 89–103. doi:[10.1099/00207713-51-1-89](https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-89).
- Younsi, A. 1991. Etude du comportement de populations spontanées de différentes espèces de légumineuses fourragères et pastorales. Thèse Ing. Agro. INA. El Harrach.
- Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., and de Lajudie, P. 2006. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH*-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microb. Ecol.* **51**: 375–393. doi:[10.1007/s00248-006-9025-0](https://doi.org/10.1007/s00248-006-9025-0). PMID:[16598639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16598639/).
- Zgadzaj, R., James, E.K., Kelly, S., Kawaharada, Y., de Jonge, N., Jensen, D.B., et al. 2015. A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. *PLoS Genet.* **11**(6): e1005280. doi:[10.1371/journal.pgen.1005280](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005280). PMID:[26042417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26042417/).
- Zhang, Y.F., Wang, F.Q., and Chen, W.X. 2006. Numerical taxonomy and 16S rDNA PCR-RFLP analysis of rhizobial strains isolated from root nodules of cowpea and mung bean grown in different regions of China. *Weishengwu Xuebao*, **46**: 861–868. [In Chinese.] PMID:[17302144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17302144/).
- Zhao, C.T., Wang, E.T., Chen, W.F., and Chen, W.X. 2008. Diverse genomic species and evidences of symbiotic gene lateral transfer detected among the rhizobia associated with *Astragalus* species grown in the temperate regions of China. *FEMS Microbiol. Lett.* **286**: 263–273. doi:[10.1111/j.1574-6968.2008.01282.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01282.x). PMID:[18657113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18657113/).

## Résumé

Un total de 51 bactéries nodulaires et 22 bactéries racinaires sont isolées à partir des nodules et des racines de *Scorpiurus muricatus*, provenant de 6 régions de l'ouest de l'Algérie. La diversité des souches a été évaluée par rep-PCR qui a permis de grouper les isolats nodulaires en 9 groupes et les isolats racinaires en 7 groupes différents. Le séquençage partiel du gène codant pour l'ARNr 16S et l'analyse par BLAST ont révélé que les nodules racinaires de *S. muricatus* sont colonisés par les espèces proches de *Rhizobium vignae*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium leguminosarum*, *Phyllobacterium ifriqiense*, *Phyllobacterium endophyticum*, *Starkeyasp.* et *Pseudomonas* sp. Toutefois, aucune de ces souches n'est capable de former un nodule sur sa plante hôte même si *nodC* était présent dans une souche unique (SMT8a). Les isolats racinaires sont proches de: *Xanthomonastheicola*, *Phyllobacterium ifriqiense*, *Microbacterium maritimum*, *Bacillus simplex*, *Rhizobium nepotum*, *Achromobacter* et *Pseudomonas*. Le test d'inoculation a révélé une grande amélioration de la croissance des plants inoculés comparativement au contrôle non inoculé. Une quantité significative d'acide indolacétique est produite par certaines souches mais seules deux souches pouvaient solubiliser le phosphate. Dans cette étude, on a décrit pour la première fois la diversité des bactéries isolées à partir des nodules et des racines de *S. muricatus* croissant dans différentes régions de l'ouest de l'Algérie et démontre leur utilité potentielle dans la promotion de la croissance des plantes.

### Mots-clés:

Diversité; Bactéries nodulaires; Bactéries racinaires; Rep-PCR; Séquençage; ADNr16S; *nodC*; Test de nodulation; *Scorpiurus muricatus*; Ouest de l'Algérie.