



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2022

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :
Debabeche Djamila Et Rezazgui Afaf

Le : 28-06-2022

Recherche et identification des bactéries symbiotiques des légumineuses (*Retama*) de l'Algérie

Jury :

Mme. Boukharouba Khadidja	Pr	Mohamed Khider - Biskra	Président
Mme. Baba Arbi Souad	MCB	Mohamed Khider - Biskra	Rapporteur
Mr. Benkadour bachir	MAA	Mohamed Khider - Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour effectuer ce travail.

Nous tenons à exprimer nos remerciements et nos profondes gratitude à notre encadreur madame BABA ARBI SOUAD d'avoir accepté l'encadrement, de diriger ce travail, et pour son aide très précieuse.

Nous exprimons tous nos remerciements à l'ensemble des membres de notre jury qui nous ont fait l'honneur de juger ce mémoire.

À tous les enseignants qui ont contribué à notre formation universitaire.

En fin, un grand merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À ma raison d'être, mes chers parents :

*A la lumière de mon cœur et l'éclairage de mes yeux, à la source de la
tendresse, à ma mère Djouama Samia ♥*

*A la personne qu'il me pousse vers l'avant et qu'il me donne l'espoir mon père
Debabeche Ali ♥*

*A mes frères : Madani, Ishek, Ahmed ♥ Je n'oublierai pas ma belle-sœur Fatom
Charif, Je les remercie pour leur soutien et leur amour, et je leur souhaite du
succès dans leur vie.*

*A toute ma famille surtout Nesrine Et Meriam, mes tantes, mes oncles et leurs
fammes, mes cousins et ma chère grand-mère aicha ♥ Je les remercie vivement
pour leur soutien tout au long de mon parcours académique*

A mes très chères amies : Amel et Afaf ♥ A tous ceux qui me sont chères.

Debabeche Djamila

Dédicace

Je dédie ce travail à Mes très chers parents, mon père REZAZGUI AHMED et ma mère HAIMER FATIMA qui m'ont beaucoup soutenu, que je ne se serai jamais de remercier, Leur amour, leur soutien et leurs encouragements, qui ont été et resteront mes meilleurs atouts pour le futur.

Puisse Dieu me les garder.

Je n'oublierai pas mes frères : MOUHEMED et ISMAIL et ISLAM

Et mes sœurs : DALAL et HADJER et SOUHILA

Chez les quels j'avais trouvé aide, conseils et réconfort.

A les enfants de mes frères HADIL et LINA et RAHAF et MOUSA et TAIM AL ILLAH et HAMOUDA et TAJ EDIN et IHAB et wassim et ahmed et anas

A mes très chères amies DJAMILA et FERIAL

Toutes et tous qu'ils trouvent en ce mémoire, ma profonde gratitude et mon éternelle reconnaissance.

REZAZGUI AFAF

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Table des matières	
Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction	1

Partie 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : GENERALITE

1 Les légumineuses	2
1.1 Description générale du genre <i>Retama</i>	2
1.2 Intérêt du <i>Retama</i>	3
1.2.1 Intérêt pharmacologique	4
1.2.2 Intérêt industriel et économique.....	4
2 Les bactéries nodulants les légumineuses (BNL)	4
2.1 Les rhizobia.....	4
2.1.1 Caractères généraux	4
2.1.1.1 Caractéristiques morphologiques	4
2.1.1.2 Caractéristiques biochimiques et nutritionnelles.....	5
a. Source de carbone	5
b. Source d'azote.....	5
2.1.2 Taxonomie des <i>rhizobia</i>	5
3 La symbiose légumineuse- <i>rhizobia</i>	6
4 Intérêts de la symbiose <i>rhizobia</i> -légumineuses	7

Partie 2 : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 2. MATERIEL ET METHODES

1 Caractères symbiotiques	9
1.1 Test de nodulation	9
1.1.1 Authentification des isolats.....	9

1.1.2	Préparation des Jarres de léonard	9
1.1.3	Préparation du mélange : Sable –Vermiculite	10
1.1.4	Stérilisation des graines	11
1.1.5	Germination des graines	11
1.1.6	Inoculation des Jarres	11
1.2	Test de nodulation croisé	11
1.2.1	Isolement et conditions culturelles	12
1.2.2	Authentification des isolats :.....	12
2	Caractérisation génomique :	12
2.1	Isolation des plasmides et électrophorèse sur gel d'agarose :	12
2.2	Amplification par PCR et digestion par restriction.	13
2.3	Séquençage de l'ADN nodC et nifH.....	14
Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION		
1	Caractéristiques morphologiques, et culturelles des isolats.....	15
2	Caractérisation symbiotique.....	17
2.1	Test de nodulation	17
2.2	Le test de nodulation croisé	18
3	Caractérisation génotypique.....	21
3.1	Phylogénie des gènes symbiotiques nodC.....	21
3.2	Phylogénie des gènes symbiotiques nifH	22
Conclusion.....		23
Bibliographie.....		25
Annexes.....		32
Résumé.....		36

Liste des Tableaux

Tableau 1: Gamme d'hotes des souches de <i>Retama</i>	19
---	----

Listes des Figures

Figure 1: <i>Retama sphaerocarpa</i> (a), <i>Retama monosperma</i> (b), <i>Retama raetam</i> (c).....	3
Figure 2: Classification phylogénétique des rhizobia basée sur le séquençage ARNr 16s	6
Figure 3: Différents types de gènes nod	7
Figure 4: Assemblage de jarre de léonard	10
Figure 5: Morphologie des cellules bactériennes de <i>Rhizobium meliloti</i> sous microscope après 4 jours d'incubation à 25°C.....	16
Figure 6: Nodule apparus sur la plante hôte <i>Retama sphaerocarpa</i>	17
Figure 7: Teste de nodulation avec différentes plantes légumineuses.	20

Liste des Abréviations

BNL : Bactéries nodulant les Légumineuses.

Nod: Le gène de nodulation

YMA: Yeast-Mannitol-Agar

YMB: Yeast Extrat mannitol Brouth

TY: Yeast Extract-Tryptone

Gène *Nif* : Gène de fixation de l'azote atmosphérique

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne de polymérisation)

ATP : Adénosine Triphosphate

N₂ : Azote moléculaire

Pb : Paires de base

NH₄⁺ : Ammonium

pSym : Plasmide symbiotique

ADN : Acide désoxyribonucléique

UV : ultraviolet

Introduction

Introduction

En Algérie, la production des légumineuses fourragères et alimentaires constitue, en plus des céréales les challenges majeurs de l'agriculture. Les légumineuses occupent une place importante tant au niveau économique qu'au niveau écologique. Elles constituent une source d'alimentation pour l'homme et de fourrage pour les animaux. Les plantes de cette famille sont capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote atmosphérique avec des bactéries du sol appelées BNL ou « Bactéries Nodulant les Légumineuses ». Ces bactéries induisent sur la racine ou la tige de la plante hôte la formation d'un organe spécialisé appelé nodule. À l'intérieur des nodules, la bactérie subit des transformations et fixe l'azote moléculaire de l'atmosphère en le convertissant en ammonium, directement assimilable par la plante. C'est la fixation biologique de l'azote, se prend par les systèmes légumineuse- rhizobia (Frédéric, 2004).

La symbiose légumineuse-rhizobia constitue un procédé précieux permettant d'introduire de l'azote combiné dans des sols, pour les enrichir en azote et améliorer leurs fertilités, réduisant ainsi l'utilisation des engrais chimiques et autres intrants agricole le responsable de la dégradation des sols et de l'environnement (Dekak 2010)

Les légumineuses arbustives du genre *Retama* appartiennent à la tribu des *Genisteeae* indigènes du bassin méditerranéen (Algérie, Maroc, Tunisie, Espagne, etc.).

Le pouvoir symbiotique des *rhizobia* associés à *Retama* adapté aux conditions arides dans le bassin méditerranéen est efficace pour reconstituer la biodiversité caractéristique ainsi que les propriétés physiques et biologiques des sols (AHNIA Hadjira, 2019).

Les bactéries nodulant les légumineuses (BNL) comprennent notamment les espèces du genre *Bradyrhizobium* sont des bactéries du sol, à Gram négatif, et qui ont un intérêt scientifique et agronomique profonde due à leur capacité d'établir une symbiose fixatrice d'azote (N₂) avec les légumineuses, c'est une relation d'importance majeure pour l'entretien de la fertilité du sol (Saoudi.M, 2008).

Alors quels sont les plus importants travaux réalisés dans Algérie sur ce sujet ? Et quels sont les espèces qu'ont été trouvés et leurs caractères ?

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 Généralités

Chapitre 1 Généralités

1 Les légumineuses

Les plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les *Rhizobia* appartiennent toutes à la superfamille des *Fabaceae* (Selami, 2015) anciennement appelées légumineuses.

Classées parmi les Angiospermes, Eudicotylédones à gousses, c'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales (Tourene, 2018), constituent une immense famille de plantes dont le seul caractère commun ayant un ovaire libre, constitué par un seul carpelle qui donne un fruit appelé gousse ou légume (Iskounen, 2012).

De nombreux taxons de la famille des légumineuses sont capables de former des associations symbiotiques avec des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique tel que la famille des *Bradyrhizobiaceae*. La proportion de ces taxons varie d'une sous-famille à l'autre, elle est de 90% pour les *Mimosoideae*, 20% pour les *Caesalpinoideae* et 97% pour les *Papilionoideae* (Oubraham, 2015).

1.1 Description générale du genre *Retama*

Retama est un arbuste ou arbrisseau d'un à quatre mètres, portant de longs rameaux « joncailles » dépourvus ou avec peu de feuilles dans le but de s'adapter au milieu désertique où l'eau est rare. Adapté dans l'environnement chaud et supporte la salinité (Shalaby, 1972).

Les fruits sont étroite gousse de moins de 2cm, acuminées, avec une extrémité aigue, portant une à deux graines (Quezel et Santa, 1962). Les graines contiennent de la cytosine, un alcaloïde toxique. Les tiges sont rigides et leurs parois externes sont épaisses et l'épiderme est recouvert d'une épaisse cuticule (Shalaby, 1972). Les fleurs sont en grappe de couleur blanche ou jaune selon les espèces (Shalaby, 1972). Les racines sont profondes et touchent en permanence les couches humides du sol. Elles peuvent accéder dix mètres (Zohary M., 1962).

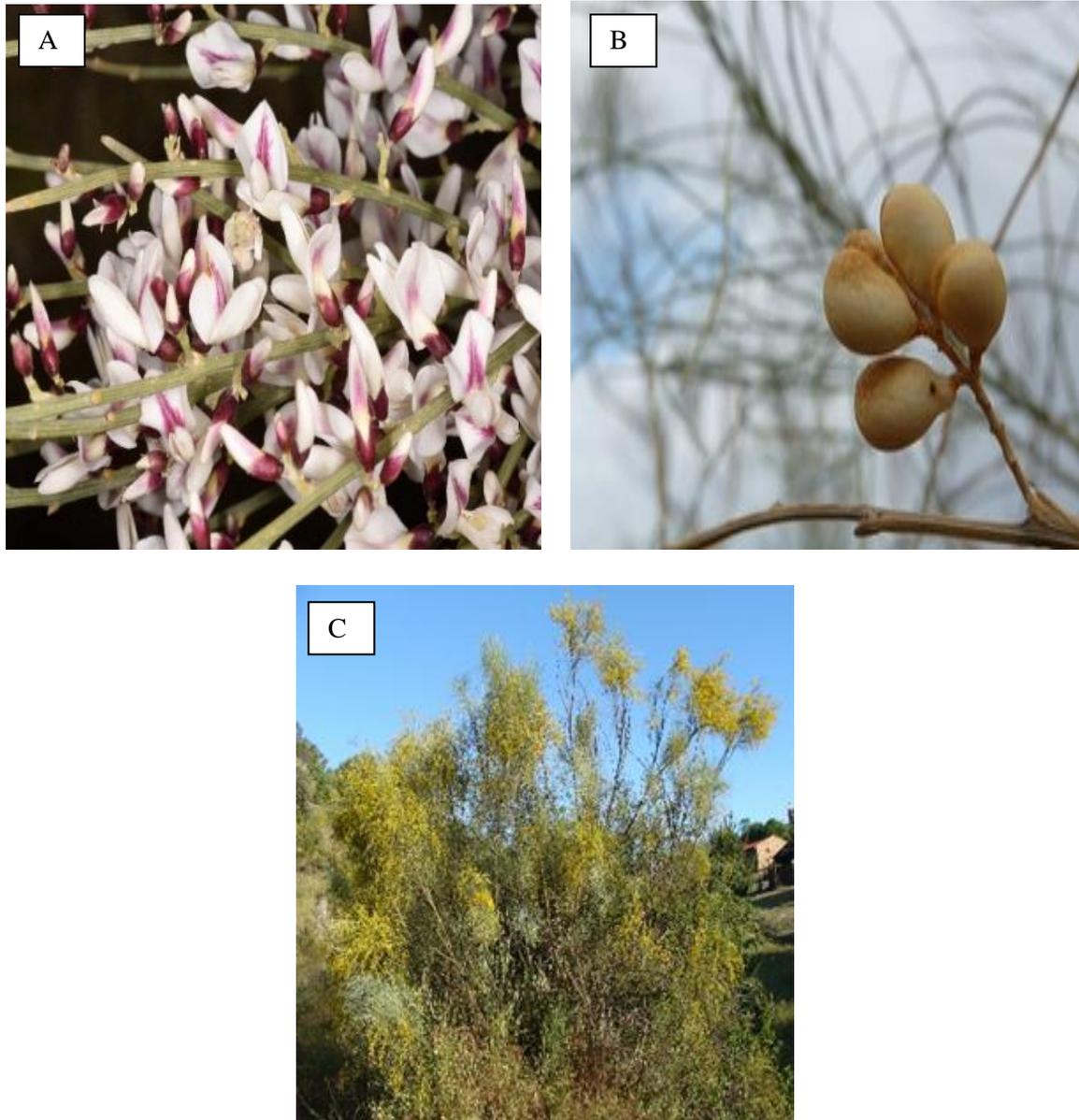


Figure 1: a. *Retama sphaerocarpa* ; b. *Retama monosperma* ; c. *Retama raetam*
(Aouadj et SaidiSief ,2015).

La Figure 01 montre : les fleurs de *Retama sphaerocarpa* (a) ; les fruites de *Retama monosperma* (b) ; l'arbuste de *Retama raetam* (c). (Aouadj et SaidiSief ,2015)

1.2 Intérêt du *Retama*

Le genre *Retama* regroupe des espèces très intéressantes, du point de vu biochimique, moléculaire et écologique.

1.2.1 Intérêt pharmacologique

Retama a été répertorié comme étant plante médicinale des régions arides. En médecine traditionnelle, elle est utilisée dans le traitement de plusieurs maladies comme l'eczéma, pour les soins en cas de morsures de serpents. Ce pouvoir pharmacologique des rétames est dû à la présence de certains Alcaloïdes. (El Hamrouni A, 2001)

1.2.2 Intérêt industriel et économique

Les *Rétamas* sont considéré comme un excellent fourrage, de plus leur bois est utilisé en chauffage. Ils sont riches en fibre, dont la longueur moyenne atteint 1,93 mm (Bahi, 1991), ils pourraient donc être valorisés dans l'industrie papetière. Ils sont aussi des plantes ornementales en raison de leurs multiples fleurs odorantes.

2 Les bactéries nodulants les légumineuses (BNL)

2.1 Les *rhizobia*

Les *rhizobia* sont des bactéries du sol capable d'induire des nodules sur les racines ou les tiges de légumineuses et assurer la fixation de l'azote atmosphérique (N₂) à l'intérieur de ces organes (Menadi et Boumaza, 2016). Ces bactéries ont la particularité de posséder les gènes permettant la synthèse d'un complexe enzymatique nitrogénase / hydrogénase qui permet cette fixation d'azote (Sakrouhi, 2017).

2.1.1 Caractères généraux

2.1.1.1 Caractéristiques morphologiques

Les *rhizobia* sont des bactéries à Gram négatif, strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 µm de largeur et de 1,2 à 3 µm de longueur et non sporulant.

Phylogénétiquement, ils appartiennent à la subdivision d'alpha et bêta - Proteobacteria. Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Aouadj et Saidi Sief, 2015).

Les *rhizobia* vivant dans les régions arides et semi-arides, ont la capacité de résister aux différentes conditions de stress existantes dans ces régions. Afin de tolérer des hautes températures, des hautes concentrations de sel, le manque d'eau, ces *rhizobia* ont développé des stratégies qui font d'eux des bons candidats pour être utilisés en symbiose avec les acacias ou avec d'autres plantes capables de résister à ces conditions extrêmes afin de rétablir le couvert végétal et lutter contre la désertification dans ces régions (Sakrouhi, 2017).

2.1.1.2 Caractéristiques biochimiques et nutritionnelles

a. Source de carbone

Les *rhizobia* possèdent des métabolismes capables de dégrader plusieurs sources de carbone parmi les sucres suivants : D-ribose, D-xylose, D-mannose, D-galactose, D-arabinose, L-arabinose, et d'autres sucres notamment D-maltose, D-cellobiose, lactose (Jarvis *et al.*, 1997).

b. Source d'azote

Les *rhizobia* utilisent NH_4^+ comme source d'azote, ils peuvent également utiliser les acides aminés comme source d'azote. Néanmoins cette utilisation varie selon les espèces (Jordan, 1984).

2.1.2 Taxonomie des *rhizobia*

La taxonomie des *rhizobia* est continuellement en changement. Selon le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2007), les *rhizobia* appartiennent au domaine des *Eubacteria*, au phylum des *Proteobacteria* et à la classe des Alpha et bêta.

D'après Weir (2016), les *rhizobia* sont répartis en 13 genres et plus de 98 espèces. Parmi les α -*Proteobacteria*, on distingue plusieurs genres entre autres : *Rhizobium* (Frank, 1889), *Ensifer* plus communément appelé *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001), *Phyllobacterium* (Valverde *et al.*, 2005), *Ochrobactrum* (Trujillo *et al.*, 2005), *Devosia* (Rivas *et al.*, 2002), *Shinella* (Lin *et al.*, 2008) et *Microvirga* (Ardley *et al.*, 2012).

Les β -*Proteobacteria* beaucoup plus rares en symbiose, on retrouve le genre *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001) et *Cupriavidus* (anciennement *Ralstonia*) (Chen *et al.*, 2001).

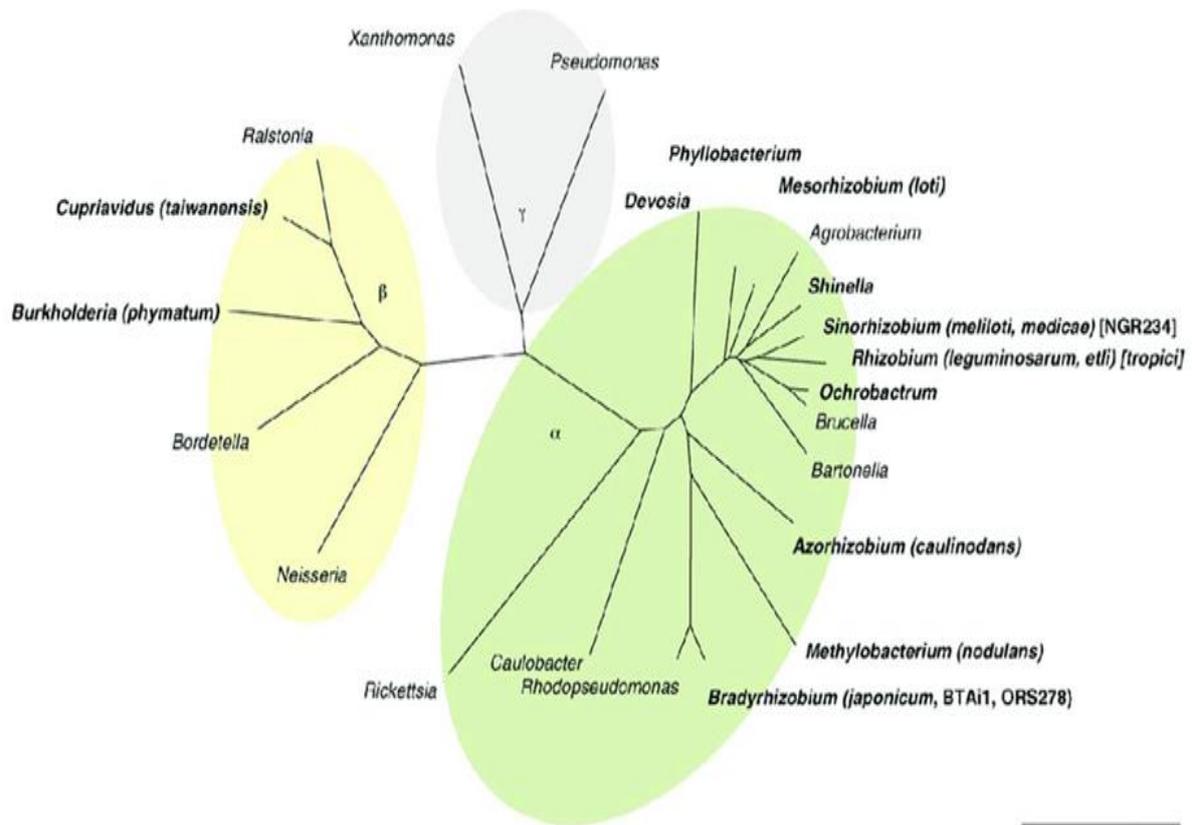


Figure 2 : Classification phylogénétique des rhizobia basée sur le séquençage ARNr 16s (Masson Boivin et *al.*, 2009).

3 La symbiose légumineuse-rhizobia

La symbiose est la forma la plus ancienne des interactions plante-microorganismes, elle agit sur les deux partenaires : la plante hôte et la bactérie. Cette évolution influe donc de façon concomitante sur la plante qui fabrique de nouveaux tissus pour abriter les micro-organismes et acquière de nouvelles capacités métaboliques (fixation d'azote) et sur la bactérie où des récepteurs spécifiques évoluent permettant une reconnaissance et un attachement spécifique à la plante (Boukhatem, 2013).

La légghémoglobine, permet aux *rhizobia* de maintenir un taux faible mais constant d'oxygène dans le nodule. Elle permet ainsi d'éviter l'inactivation de la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène tout en assurant l'apport d'O₂ indispensable à ces bactéries aérobies .Elle

est synthétisée par la plante-hôte (globine) et par le bactéroïde (hème) lié étroitement à la globine (Salmi, 2019).

Des gènes de nodulation issus d'études génétiques et moléculaires de chaperons bactériens ont été identifiés et caractérisés dont l'expression est indispensable au déroulement de l'infection et de la nodulation, et au contrôle de la spécificité d'hôte (Dénarié et *al.*, 1992 ; van Rhijn et Vanderleyden, 1995). Ces gènes (*nod*, *nol*, et *noe*) sont généralement localisés sur des plasmides symbiotiques (*pSym*) à proximité des gènes *nif*, (Hynes et *al.*, 1986 ; Martinez-Romero et *al.*, 1990),

Les gènes de nodulation incluent des gènes communs et des gènes spécifiques de l'hôte à infecter (gènes *hsn*) (Broughto et *al.*, 2000 ; Spink, 2000). En 2000, au total 13 gènes de nodulation étaient déjà connus. Il s'agit des opérons *nod ABCIJ*, *nod FEL*, *nod MNT*, du *nod O* et du *nod D* (Perret et *al.*, 2000).

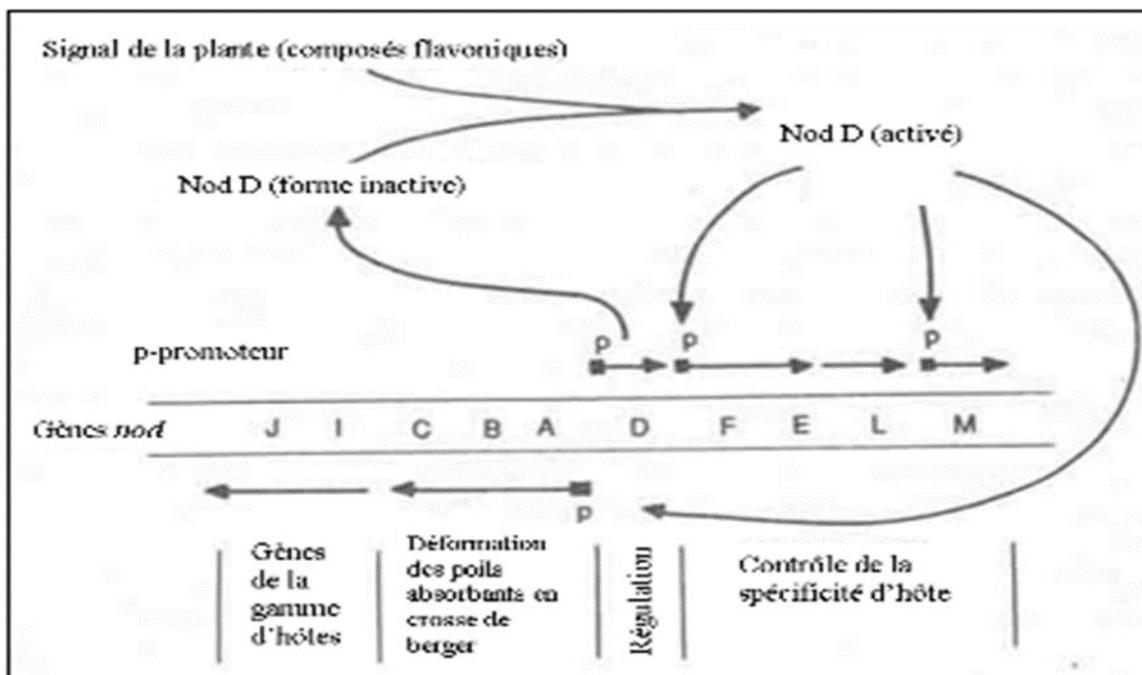


Figure 3 : Différents types de gènes *nod* (Kouakou 2011)

4 Intérêts de la symbiose rhizobia-légumineuses

Cette symbiose présente de nombreux avantages pour les légumineuses. En effet, celle-ci leur permet d'avoir une bonne croissance sur des sols carencés en azote. A titre d'exemple,

le Pois d'Angole (*Cajanuscajan*) qui est cultivé sous les tropiques incluant les régions semi-arides peut satisfaire jusqu'à 96% de ses besoins azotés par le biais de celle-ci (Kumar Rao et al., 1986). De ce fait, cette symbiose est indubitablement le facteur majeur à l'origine du grand succès de la famille des Légumineuses parmi les végétaux (Noel, 2009).

A l'opposé, la plante subvient aux besoins énergétiques de la bactérie au cours de cette symbiose en fournissant des substances carbonées résultant de la photosynthèse. Elle lui offre également un micro environnement très particulier et nécessaire à la fixation de l'azote.

Par ailleurs, l'augmentation au niveau du sol de la population des *rhizobia* spécifiques à la légumineuse hôte après culture, la symbiose fournirait un cadre de reproduction bénéfique qui favoriserait l'évolution des espèces bactériennes (Noel, 2009).

Parie II

Partie expérimentale

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

Chapitre 2 Matériel et méthodes

1 Caractères symbiotiques

1.1 Test de nodulation

Les isolats ont été obtenus à partir de nodules stérilisés en surface de plantes *Retama sphaerocarpa* poussant dans les sols algériens et cultivés sur Yeast Mannitol Agar (YMA) à 28°C. Toutes les cultures pures ont été testées pour leur capacité à établir une symbiose efficace avec *R. sphaerocarpa* dans des conditions contrôlées (Ahnia H et al., 2018).

1.1.1 Authentification des isolats

La technique des jarres de Leonard selon la méthode de Vincent (1970) est utilisée pour évaluer l'aptitude des isolats à former des nodules sur les racines de la plante hôte. Ce test est réalisé en conditions bactériologiquement contrôlées, mettant en place les deux partenaires « plante-bactérie ».

Selon Ahnia H et al (2018) Le comportement symbiotique des souches à tester dans des bocaux Leonard stériles remplis de vermiculite contenant la solution de Jensen. (Voir annexe 02).

Des suspensions de culture des isolats (2 ml, 10^8 – 10^9 cellules mL^{-1}) ont été ajoutées aux semis de la légumineuse à tester (âgés de 2 à 5 jours) dans les bocaux Leonard, et les plantes ont été cultivées en serre (25 °C) pendant un minimum de 3 et un maximum de 8 semaines. Après, les plantes ont été examinées pour la présence de nodules, leur nombre, leur taille et leur aspect, ainsi que pour l'aspect et le poids de la partie aérienne. Les tests ont été exécutés en triple et comparés avec des témoins négatifs (plantes non inoculées) et positifs (plantes inoculées avec des symbiotes apparentés) .(Senanayake et al 1987 ; Sanginga et al ., 1989 ; Ahnia H et al 2014; Ahnia H et al 2018).

1.1.2 Préparation des Jarres de léonard

Des bouteilles d'eau minérales en plastique sont choisies et coupées horizontalement en deux parties. Ces jarres sont lavées avec un détergent courant, puis désinfectées sous la hotte à flux laminaire par un trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium puis dans l'éthanol 95°. La partie supérieure de chaque jarre est remplie d'un mélange de sable et

vermiculite humidifié avec la solution nutritive de Fährus (Annexe 02) et préalablement stérilisé à l'autoclave, la partie inférieure du dispositif est remplie de solution nutritive.

Les deux parties de la jarre sont reliées par un cordon de compresse, les bouchons percés à l'aide d'une pince et les cordons sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes (Dekak, 2018 ; Vincent, 1970).

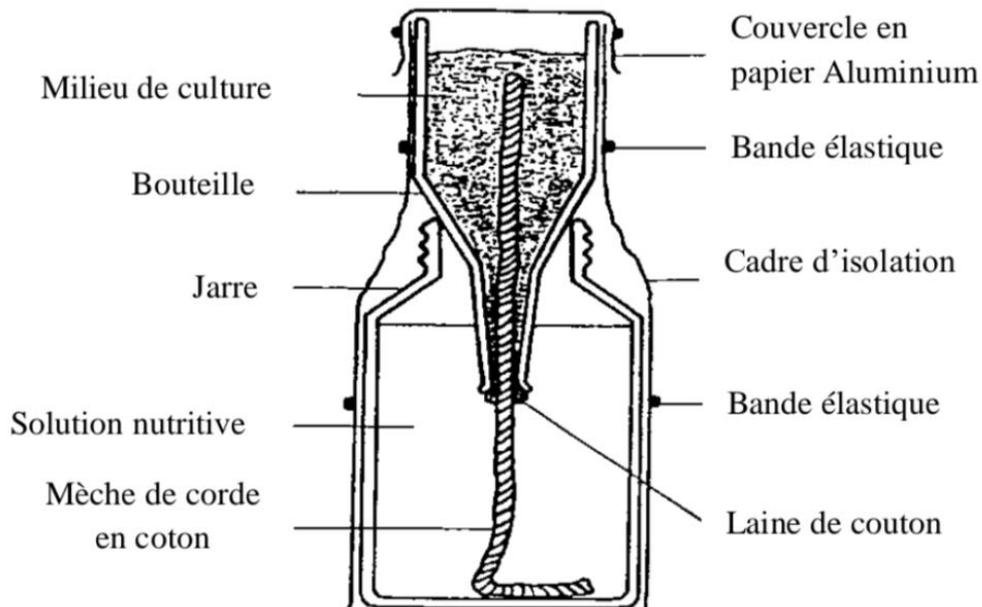


Figure 4 : Assemblage de jarre de léonard (Vincent, 1970)

1.1.3 Préparation du mélange : Sable –Vermiculite

Un sable de rivière est lavé jusqu'à ce que l'eau devienne claire, puis rincé 2 à 3 fois à l'eau distillée. D'autre part la vermiculite est lavée au moins 10 fois puis séchée à l'air libre enfin moulue dans un mixeur de cuisine.

Le sable est mélangé avec la vermiculite au 1/3, puis humidifier le mélange avec la solution nutritive de Fahraeus ,stériliser le tout à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

La partie supérieure des jarres est remplir par le mélange alors que la partie inférieure contient la solution nutritive de Fahraeus. Donc le cordon de compresse lié aux deux parties permet d'humidifier le mélange avec la solution nutritive (Rabah Chabbi, 2010 ; Noureddine et al 2021).

1.1.4 Stérilisation des graines

Avant de stériliser les graines, il faut d'abord les sélectionner, elles doivent être intactes, propres et de la même taille. Stériliser selon Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) comme suit :

- Dans un bécher stérile, placez les graines avec de l'éthanol à 95% pendant 5 à 10 secondes.
- Transférer immédiatement les graines dans de l'acide sulfurique concentré pendant 3 minutes.
- Rincer les graines 10 fois avec de l'eau distillée stérile et laisser gonfler les graines pendant 1 heure après le dernier rinçage.

1.1.5 Germination des graines

Après stérilisation des graines, elles sont mises en germination sur boîtes de TYA (Beringer, 1974) à l'obscurité total (enveloppées avec du papier aluminium) à température ambiante pendant 3 à 7 jours, jusqu'à apparition des racelles (Dekak, 2018).

1.1.6 Inoculation des Jarres

Après le germination des graines, on sème 2 à 3 graines par jarre, les semis sont prélevés grâce à l'anse de platine immergée dans l'éthanol puis flambée et refroidie et les plantée dans le mélange sable –vermiculite. (Dekak, 2018).

Les jarres sont ensuite inoculés avec 2ml de la suspension bactérienne cultivée sur bouillon YMB de 24 heures à 30°C. La partie supérieure des jarres est couverte avec du plastique noir pour éviter toute exposition des racines à la lumière. Enfin, les jarres sont couvertes du papier aluminium pendant les premières 24 heures d'inoculation et placées dans une chambre de culture. (Abdelnaby M et al., 2015)

L'irrigation des jarres s'effectue aseptiquement à chaque fois que le niveau de la solution nutritive a diminuée , pour éviter une sécheresse du sable. Après quatre semaines de croissance, les plantes ont été examinées pour la nodulation. Tous les isolats qui n'ont pas formé de nodules ont été négligés. (Abdelnaby M et al., 2015)

1.2 Test de nodulation croisé

Ce test permet de vérifier si une bactérie isolée d'une espèce de légumineuse donnée peut induire la formation des nodosités chez d'autres espèces de légumineuses.

1.2.1 Isolement et conditions culturelles

Les isolats étudiés sont préalablement isolés à partir des plantes de *Retama raetam* et de *Retama sphaerocarpa* poussant dans sept sites géographiques du nord-est de l'Algérie. Les rhizobies ont été isolées à partir des nodules sur une gélose à l'extrait de levure et au mannitol (YMA) (annexe 03), selon le protocole standard décrit par Vincent. Les souches ont été cultivées sur YMA à 28 °C, maintenues à 4 °C et dans du glycérol à 20% (p/v) à 80 °C pour le stockage à long terme. (Boulila *et al.*, 2009).

1.2.2 Authentification des isolats

Selon Boulila *et al.* (2009) Tous les isolats ont été inoculés sur les semences des deux espèces *Retama raetam* et *Retama sphaerocarpa* pour confirmer leur capacité former des nodules avec leur hôte d'origine et tester nodulation croisée.

Les graines ont été prélevées sur les plantes utilisées pour l'échantillonnage des nodules, scarifiées et stérilisées en surface dans de l'acide sulfurique à 96% pendant 2 h, rincées plusieurs fois dans de l'eau stérile, humidifiées dans de l'eau stérilisée pendant la nuit et placées sur de la vermiculite stérilisée à 20°C à germer. Chaque semis a ensuite été transféré dans un flacon de 250 ml rempli de milieu de Jensen liquide et placé dans une chambre de croissance à 22°C le jour et 20°C la nuit avec une photopériode de 14 à 10 h et une humidité de 60 % le jour et 66 % la nuit. Des semis âgés de deux jours ont été inoculés avec 1 ml de suspension de *rhizobia* (10^9 cellules ml⁻¹) en triple exemplaire.

Trois traitements non inoculés ont été inclus comme contrôle. L'apparence des nodules a été enregistrée périodiquement (Boulila *et al.*, 2009 ; Abdelnaby M *et al.*, 2015; Bakhoum *et al.* 2015).

2 Caractérisation génomique

2.1 Isolation des plasmides et électrophorèse sur gel d'agarose

L'ADN plasmidique a été isolé à partir de colonies uniques par une légère modification de la méthode d'Eckhardt. Les cellules ont d'abord été mises en suspension dans 1 ml de milieu TY jusqu'à une absorbance à 600 nm d'environ 0,4 (108 cellules/ml), puis sédimentées par centrifugation (4 000 x g, 5 min) et lavées une fois dans du Sarkosyl à 0,1 % (pt/vol) (Scott D. B *et* Ronson C. W, 1982; Corich V *et al.*, 2001).

Des lysats cellulaires bruts ont ensuite été préparés comme décrit, et l'ADN a été séparé par électrophorèse (45 V pendant 1 h, puis 180 V pendant 3 h). Puis (180 V pendant 3 h) dans un gel d'agarose vertical à 0,7 % (pt/vol) (100 x 140 x 3 mm) (Barry scott et Clive w. Ronson, 1982).

Les gels ont été colorés pendant 15 minutes au bromure d'éthidium (1, ug/ml), lavés à l'eau distillée, et photographiés sur un transilluminateur UV (Chopin et P. Langella,1982)

Pour déterminer les sites d'initiation de la transcription, des amorces oligonucléotidiques complémentaires d'une séquence codante de chaque gène ont été synthétisées. La séquence d'amorce pour *nodA* est 5'-TAGCTTCCACTGCAC-3' et la séquence d'amorce pour *nodH* est 5"GCAGCGTGGAATGGG-3' (Mulligan et Sharon Long ,1989).

2.2 Amplification par PCR et digestion par restriction

Environ 930 pb du gène *nodC* de 1300 pb ont été amplifiés en utilisant les amorces directes *nodCF*, *nodCFu*, *nodCF2*, *nodCF4* ou *nodCFn*, et l'amorce inverse *nodCI*. Ces amorces ont été conçues en comparant les séquences *nodC* (Laguerre et *al.*, 2001).

Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR d'environ 780 pb du gène *nifH* de 890 pb ont été conçues en comparant les séquences *nifH* (Laguerre et *al.* ,2001).

Les conditions de croissance cellulaire et la préparation de l'ADN cible ont été décrites précédemment (Laguerre et *al.*, 1997). L'ADN *nodC* a été amplifié à partir de 5⁻¹⁰ µl de suspension cellulaire lysée mélangée à tous les réactifs PCR : tampon de réaction de polymérisation (Gibco-BRL) ; 2±5 mM MgCl₂ ; 200 µM (chacun) dATP, dCTP, dTTP, dGTP ; 0±4-0±8 µM (chacun) d'amorces *nodC* ; 0±04 U d'ADN polymérase Taq (Gibco-BRL) µl⁻¹. L'amplification de l'ADN a été réalisée en utilisant un profil de température standard comprenant une température d'hybridation de 55°C (Laguerre et *al.*, 1994). La procédure d'amplification des fragments *nifH* était similaire, sauf que les réactions ont été réalisées avec 1±5 mM MgCl₂, 20 µM (chacun) dNTP et 0±1 µM (chacun) d'amorces *nifH* et que la température de recuit a été portée à 57 °C. Pour quelques souches, de multiples bandes *nodC* ont été obtenues. Dans ces cas, un petit morceau d'agarose contenant la bande de la taille attendue a été aspiré à l'aide d'une aiguille hypodermique et utilisé comme matrice dans une nouvelle PCR. (Laguerre et *al.* , 2001).

L'analyse des motifs de restriction des produits PCR avec les endonucléases de restriction a été effectuée selon la méthode décrite précédemment (Laguerre *et al.*, 2001).

2.3 Séquençage de l'ADN *nodC* et *nifH*

Dans une première tentative, les produits PCR bruts de *nodC* ont été directement séquencés sur les deux brins en utilisant les amorces *nodCF* et *nodCI*. L'amorce moins dégénérée *nodCFn*, qui correspondait à la même séquence oligonucléotidique que *nodCF*, a été utilisée pour l'amplification par PCR et le séquençage des produits PCR bruts des souches PhD12 et H251 (Laguerre *et al.*, 2001).

Le séquençage de l'ADN *nodC* avec *nodCFn* et *nodCI* n'a été réalisé pour les souches H132 et Viking I qu'après purification des produits de PCR par précipitation à l'éthanol à 70 % en présence d'acétate d'ammonium 0,7 M ou (lorsque plusieurs produits de PCR ont été obtenus) extraction du fragment *nodC* des gels d'agarose à l'aide d'un kit d'extraction de gel QIAEX II (Qiagen) suivie d'une précipitation à l'éthanol acétate d'ammonium. (Laguerre *et al.*, 2001).

Les séquences des fragments *nifH* et du fragment *nodC* des souches R602sp, H152, ACCC 19665, USDA 2071 et OR191 ont été obtenues après le clonage des produits PCR en utilisant soit un kit de vecteur T pT7Blue (Novagen), un kit de vecteur pGEM-T (Promega) ou un kit de clonage TOPO TA (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Le résultat du clonage a été vérifié par amplification PCR en utilisant les amorces T7 et SP6 du plasmide vecteur selon la procédure décrite par Novagen. (Laguerre *et al.*, 2001).

Les produits PCR bruts ont été directement utilisés pour le séquençage avec les deux amorces T7 et SP6. Le séquençage des fragments *nifH* des souches GR-06 et GR-X8 a été effectué dans un séquenceur ABI 373 XL Stretch Sequencer (Perkin-Elmer Biosystems) en utilisant un kit ABI Prism BigDye Terminator et des amorces de séquençage basées sur le vecteur (amorces universelles et inverses M13). (Laguerre *et al.*, 2001).

A partir de toutes ces expériences, 450-750 nucléotides de chaque brin d'ADN ont été déterminés et une séquence de 808-935 pb de fragments *nodC* et une séquence de 736-783 pb du gène *nifH* ont été reconstituées pour chaque souche. Les analyses des sites de restriction des séquences ont été réalisées à l'aide du logiciel Bisance (Laguerre *et al.*, 2001).

Chapitre 3

Résultats et discussion

Chapitre 3 Résultats et discussion

1 Caractéristiques morphologiques, et culturelles des isolats

D'après les résultats de Ahnia H et al (2018) Les isolats du nodule racinaire de *Retama sphaerocarpa* dans le nord-est de l'Algérie, étaient des bâtonnets Gram-négatifs, non sporulés, ces bactéries sont à croissance extrêmement lente avec des temps de génération moyens >20 h dans le YMB (annexe 03). Les colonies non muqueuses (<2 mm) de couleur crème et de taille 1,5-2 mm ont mis au moins 10 jours à apparaître sur des plaques YMA incubées à 28 °C et ont produit une réaction alcaline sur le milieu YMA additionné de bleu de bromthymol, ce qui suggère que les isolats appartiennent au genre *Bradyrhizobium*.

C'est résultats sont similaire des caractères indiqués par Somasegaran et Hoben (1994) des *Rhizobia* à croissance lente. L'observation microscopique des isolats après la coloration de Gram, montre que les colonies sont des petites bâtonnets roses qui indique que les isolats sont des Gram négatif cela prouve que les isolats sont des *Rhizobia*.

Par ailleurs, Amrani S et al (2009) rapportent que ces résultats sont similaires, tous les isolats (des légumineuses du nord et le sud de l'Algérie) avaient la même morphologie de colonie et produisaient des colonies transparentes ou de couleur crème sur les plaques YMA. Ils étaient à croissance lente et présentaient un temps de génération des cultures de YMB à 28 °C compris entre 7,2 et 9,4 heures.

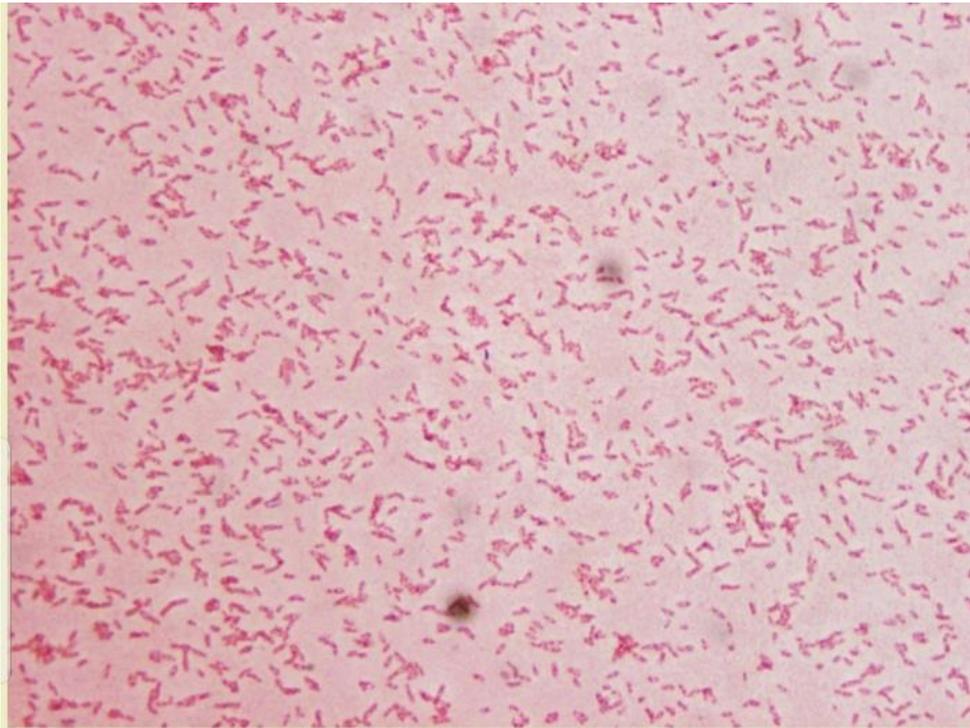


Figure 5 : Morphologie des cellules bactériennes de *Rhizobium meliloti* sous microscope après 4 jours d'incubation à 25°C. (Mukta Jhalani et Kristy Yuan, 2004)

La Figure 5 montre les cellules bactériennes de *Rhizobium meliloti* après 4 jours d'incubation à 25°C, les cellules sont à Gram négatif, forment des chaînes de cocci. (Mukta Jhalani et Kristy Yuan, 2004)

Selon les résultats obtenus par Boulila et *al* (2009), les isolats ont été collectés sur des plantes de *Retama raetam* et de *Retama sphaerocarpa* poussant dans sept sites géographiques du nord-est de l'Algérie. Se sont développés très lentement sur les plaques YMA, le temps d'apparition des colonies de 6 à 10 jours, suggérant qu'ils appartenaient au genre *Bradyrhizobium*. Les colonies avaient un diamètre de 1,5 à 2 mm, de couleur crème, et n'étaient pas muqueuses.

En outre, des résultats similaires sont obtenus par Chahboune et *al* (2011), les différentes espèces du genre *Bradyrhizobium* ont été isolées des nodules de *Retama monosperm* dans la région centre-ouest du Rif marocain, ils poussent sur la gélose de yeast extract-mannitol (YMA) après incubation pour 7 jours à 28 °C. Toutes les souches ils ont montré un taux de croissance lente et forme des colonies < de 1 mm non muqueuses.

De même, les résultats d'Abdelnaby et *al* (2015) rapportent que, les isolats (des nodules racinaires de légumineuses des différentes régions du Fezzan (Libye)) montrent des

caractéristiques similaires aux *rhizobiums* à croissance lente qui produisent de petites colonies crémeuses et brillantes (1 mm) après plus de 5 jours d'incubation.

Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus par Ahnia H *et al* (2014), tous les isolats collectés dans le nord-est de l'Algérie se développent lentement sur la gélose YMA, produisant des colonies non mucoïdes après 4 jours d'incubation.

En outre, des résultats identiques sont obtenus par Guerrouj *et al* (2013), les souches ont été isolées à partir de nodules de *Retama sphaerocarpa* et *Retama monosperm* dans les régions du Bouarfa (Maroc), ces derniers présentent une croissance abondante sur la gélose YMA après une incubation de 7 à 10 jours à 28 °C. Selon Vincent j. m. (1970). Toutes les souches de type *Bradyrhizobium* présentent un taux de croissance lent et forment des colonies mucoïdes.

2 Caractérisation symbiotique

2.1 Test de nodulation

Selon Ahnia H *et al* (2018), les isolats étudiés ont été capables de ré-noduler leurs plantes hôtes. Ces résultats montrent que l'apparition de nodules sur la plante hôte *Retama sphaerocarpa* a été obtenue après deux mois d'inoculation. Leur nombre varie de 10 à 22, leur taille est de 1 à 3 mm, de couleur brune et de forme allongée multilobée.



Figure 6 : Nodule apparus sur la plante hôte *R. sphaerocarpa*.

(Ahnia H, 2019).

La figure 06 montre l'apparition de nodules bruns, indiquant la fixation d'azote sur la plante de

Retama sphaerocarpa. (Ahnia H, 2019).

Ce résultat confirme ceux obtenus par Abdelnaby *et al* (2015), la majorité des isolats à croissance lente ont été capables de former une symbiose en culture pure lorsqu'ils ont été testés sur leur hôte et d'autres plantes de test.

En outre, ces résultats sont aussi similaires aux résultats obtenus par Mahdhi et Mars (2006), des isolats rhizobiens à croissance lente ont été purifiés à partir de nodules racinaires de *Retama raetam* collectés dans six zones géographiques différentes de Tunisie. Dont la plupart ont formé trois à six nodules par plantule.

De même, les résultats de Guerrouj *et al* (2013), ont montré que les tests de nodulation effectués ont révélé des nodules chez les plants de *Retama*, mais aucun nodule n'a été observé chez les plants de soja. Par conséquent, les souches incluses dans ce symbiovar nodulé *R. sphaerocarpa* et *R. monosperma*, mais ne pouvaient pas noduler *Glycine max*.

Par contre, le résultat obtenu par Zakhia *et al* (2006) montre que les tests de nodulation sur *Retama raetam* ont été négatifs avec toutes les souches testées ce qui signifie que ces dernières étaient des bactéries endophytes.

2.2 Le test de nodulation croisé

D'après les résultats de Boulila *et al* (2009) à partir de l'échantillonnage initial, de 180 nodules qui ont été collectés sur des plantes de *Retama raetam* et *Retama sphaerocarpa* poussant dans sept zones géographiques du nord-est de l'Algérie, 125 isolats ont pu être purifiés. Cependant, seulement 67 d'entre eux ont été capables de noduler de manière croisée les espèces de *Retama*. La couleur rouge-brun des nodules suggère que tous les isolats sont efficaces pour la fixation de N₂.

Les isolats à croissance rapide qui n'ont pas formé des nodules avec les plants de *Retama raetam* et *Retama sphaerocarpa* une fois ré-isolés n'étaient toujours pas capables de former des nodules.

Et outre les résultats de Ahnia H *et al* (2018), les trois souches de *Retama sphaerocarpa* ont été capables d'établir des symbioses efficaces avec d'autres arbustes, tels que *R. raetam*, *Lupinus micranthus*, *L. albus* et *Genista numidica*, mais pas avec *Lupinus sanguistifolius*.

Aucune symbiose n'a pu être établie avec le soja (*Glycine max*), alors qu'une symbiose inefficace (nodules blancs) a été établie avec le niébé (*Vigna unguiculus*).

Tableau 1: Gamme d'hotes des souches de *Retama*. (Ahinia H et al, 2018)

Plante hôte	RST89	RST88bis
<i>Retama sphaerocarpa</i>	+/+	+/+
<i>Retama raetam</i>	+/+	+/+
<i>Lupinus micranthus</i>	+/+	+/+
<i>Lupinus albus</i>	+/+	+/+
<i>Lupinus angustifolius</i>	–	–
<i>Genista numídica</i>	+/+	+/+
<i>Vigna unguiculata</i>	+/-	+/-
<i>Glycine max</i>	–	–

+/+, nodules efficaces (rouge) ; +/-, nodules inefficaces (blancs) ; -/-, pas de nodules.

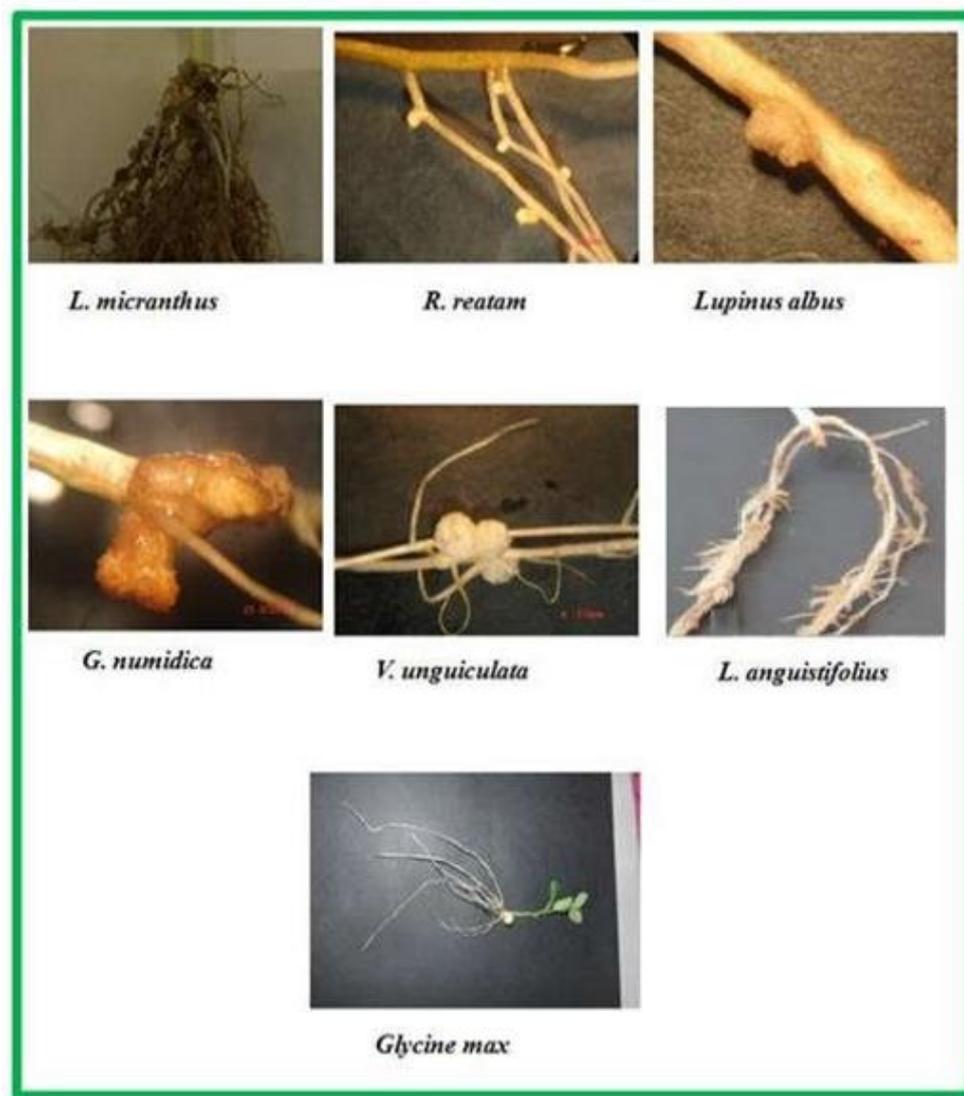


Figure 7 : Teste de nodulation avec différentes plantes légumineuses.

(Ahnia H ,2019)

La figure 07 montre les résultats de différentes plantes légumineuses (*Retama raetam*, *Lupinus micranthus*, *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius*, *Genista numídica*). (Ahnia

H ,2019)

C'est résultats sont similaire aux résultats obtenue par Noureddine et *al* (2021) montrant que la plupart des isolats rhizobiens à croissance lente sont capable de noduler leurs plants et d'autre plantes hôte.

En outre, des résultats identiques sont obtenus par Bakhoum et *al* (2014), dans l'expérience d'inoculation croisée, tous les isolats bactériens ont formé des nodules effectifs.

D'autre part, la spécificité d'hôte des isolats de *Bradyrhizobium* a été étudiée par des expériences d'inoculation croisée, les résultats obtenus montre qu'un nombre significatif des souches sont capables de noduler d'autre plante hôte (Ahnia H et al., 2014).

3 Caractérisation génotypique

3.1 Phylogénie des gènes symbiotiques *nodC*

Dans le travail de Boulila et al (2009) une analyse de séquence *nodC* ont également été réalisées pour 12 isolats représentants de la population algérienne de *Retama*. Toutes les souches ont fourni des séquences nucléotidiques très similaires à *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 23230 (*Desmodium*) et *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 Glycine (99,8% de similitude pour les deux gènes symbiotiques).

Une recherche Blast de similarité de séquence dans les bases de données avec chaque gène a conduit à des conclusions similaires.

Seules trois séquences *nodC* ont montré une grande similarité (98%) avec celles des isolats de *Retama* : elles correspondaient à deux souches chinoises de *Bradyrhizobium elkanii*, CCBAU 05041 et CCBAU 05065, provenant respectivement des espèces *Astragalus* et *Vicia*, et à la souche *Desmodium Bradyrhizobium sp.* Autrement, les séquences disponibles dans GenBank ont montré moins de 85% de similarité pour *nodC*, obtenue à partir d'un clone de bactérie du sol non cultivée, S14 C184, qui était étroitement liée à celles des isolats de *Retama* (97% de similarité) à *Bradyrhizobium sp. KO14* (*Desmodium*) et *Bradyrhizobium elkanii* CCBAU 05041 (*Astragalus*).

C'est résultats sont similaire aux ceux obtenues par Belhadi et al (2018), es valeurs de similarité de séquence du *nodC* pour les nouvelles souches de ce clade allaient de 99,65% à 100% avec *Rhizobium laguerreae* et *Rhizobium. leguminosarum sv. viciae* 3841.

D'après d'Ahnia et al (2018) dans le cas du gène symbiotique *nodC*, les souches de *Bradyrhizobium algeriense* sont regroupées avec *Bradyrhizobium. valentinum* LmjM3T, *Bradyrhizobium. retamae* Ro19T, et *Bradyrhizobium. icense* LMTR 13T. Toutes ces souches partagent un ancêtre commun avec *Bradyrhizobium. lablabi* CCBAU 23086T et *Bradyrhizobium. paxllaeri* LMTR 21T isolées en Chine à partir de nodules de *Lablab purpureus* et au Pérou à partir de *Phaseolus lunatus*, respectivement. Toutes les séquences *nodC* de *Bradyrhizobium. algeriense* (RST89T, RST91 et RST88bis) partageaient une similarité de 99.0% et semblaient faire partie du *symbiovar retamae* récemment décrit.

Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus par Alami et al (2021) où l'arbre phylogénétique basé sur les séquences *nodC*, indique une similarité de 96,9 à 98,47% avec *Bradyrhizobium valentinum* LmjM3T et de 96,73 à 98,26% avec *Bradyrhizobium algeriense* RST89T, et entre 95,64 et 97,17% avec *Bradyrhizobium retamae* Ro19T.

3.2 Phylogénie des gènes symbiotiques *nifH*

Selon Boulila et al (2009), une analyse des séquences *nifH* ont également été réalisées pour 12 isolats représentants de la population algérienne de *Retama*. Toutes les souches ont fourni des séquences nucléotidiques très similaires à *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 23230 (*Desmodium*) et *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (*Glycine*) (98,4% de similitude pour les deux gènes symbiotiques).

Une recherche Blast de similarité de séquence dans les bases de données avec chaque gène a conduit à des conclusions similaires.

Cependant, trois séquences *nifH* ont montré une grande similarité (96%) avec celles des isolats de *Retama*: elles correspondaient à deux souches chinoises de *B. elkanii*, CCBAU 05041 et CCBAU 05065, provenant respectivement des espèces *Astragalus* et *Vicia*, et à la souche *Desmodium Bradyrhizobium* sp. Autrement, les séquences disponibles dans GenBank ont montré moins de 92% de similarité pour *nifH*, obtenue à partir d'un clone de bactérie du sol non cultivée, S14 C184, qui était étroitement liée à celles des isolats de *Retama* (97% de similarité) à *Bradyrhizobium* sp. KO14 (*Desmodium*) et *Bradyrhizobium elkanii* CCBAU 05041 (*Astragalus*).

En outre, Alami et al (2021) des résultats identiques dont l'arbre phylogénétique basé sur les séquences *nifH* a également montré que les quatre isolats de *Retama sphaerocarpa* se sont regroupées avec *Bradyrhizobium valentinum* LmjM3T, *Bradyrhizobium algeriense* RST89T, et *Bradyrhizobium retamae* Ro19T, avec des valeurs de similarité allant de 95,87 à 100%.

Conclusion

Conclusion

Les travaux menés au cours de cette étude sur la symbiose entre les légumineuses du genre *Retama*, avec les bactéries symbiotiques et fixatrices d'azote *Rhizobia*, nous ont permis d'aborder la compréhension de la mise en place de cette association originale. Les espèces du genre *Retama* constituent un élément important à prendre en compte pour introduire l'azote combiné dans les sols pauvres et arides et joue un rôle crucial dans la fertilité où, peuvent se développer plusieurs espèces annuelles et d'autres espèces légumineuses.

Nous avons traité au cours de ce travail la caractérisation phénotypique et génotypique des souches isolées à partir de *R. retam* et *R. sphaerocarpa* de l'Algérie.

Après la réalisation de ce travail, on conclut que :

Les souches des *Rhizobia* nodulant *Retama* sont des *Rhizobia* à croissance lente. Ce comportement s'avert presque le même que celui du genre *Bradyrhizobium* et présente les caractères des colonies transparentes ou de couleur crème non muqueuse ou des colonies mucoïdes.

On peut déduire aussi que les *Rhizobia* nodulant *Retama* sont à forte capacité à infecter un large spectre des plantes légumineuses telles que *R. raetam*, *Lupinus micranthus*, *L. albus* et *Genista numidica*, *Vigna unguiculata*.

D'autre part, les études phylogénétiques de *Rhizobia* sont basées beaucoup plus sur le séquençage d'ADN 16S alors que peu de travaux ont étudié de gène de nodulation.

L'étude de la phylogénie des gènes symbiotiques *nodC* et *nifH* montre que toutes les souches ont fourni des séquences génétiques très similaires à *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 23230, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 et *Bradyrhizobium algeriense* (RST89T, RST91 et RST88bis).

La grande similarité entre les gènes symbiotiques des isolats de *Retama* indique qu'ils ont une faible spécificité d'hôte. Selon les travaux de recherche en question il se trouve qu'il y a une faible diversité génétique des gènes symbiotiques parmi les isolats de *Retama*. Ces travaux suggèrent également que ces souches ont nouvellement acquis

cette propriété, et par voie de conséquences, il faudra plus de temps pour obtenir ces gènes afin qu'ils puissent se développer et fassent une différence en eux.

Les résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives dans le domaine de recherche scientifique, dont on peut noter :

- L'étude de l'aptitude des souches à noduler d'autres légumineuses, surtout les espèces alimentaires sahariennes.
- Une étude plus large et approfondie sur les gènes nod autre que les *nodC*.

**Les références
Bibliographiques**

Les références bibliographiques

1. Abdelnaby, M., Elnesairy, N. N. B., Mohamed, S. H., & Alkhayali, Y. A. A. (2015). Symbiotic and phenotypic characteristics of rhizobia nodulating cowpea (*Vigna Unguiculata* L. Walp) grown in arid region of Libya (Fezzan). *J Environ Sci Eng*, 4, 227-239.
2. Ahnia, H. (2019). Etude polyphasique et génomique des bactéries isolées de nodules racinaires de *Retama sp* (Doctoral dissertation, Université de Béjaia-Abderrahmane Mira).
3. Ahnia, H., Boulila, F., Boulila, A., Boucheffa, K., Durán, D., Bourebaba, Y., ... & Rey, L. (2014). *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse Bradyrhizobium strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105(6), 1121-1129.
4. Ahnia, H., Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Palacios, J. M., Rey, L., ... & Imperial, J. (2018). *Bradyrhizobium algeriense* sp. nov., a novel species isolated from effective nodules of *Retama sphaerocarpa* from Northeastern Algeria. *Systematic and applied microbiology*, 41(4), 333-339.
5. Alami, S., Lamin, H., Bennis, M., Bouhnik, O., Lamrabet, M., El Hachimi, M. L., ... & El Idrissi, M. M. (2021). Characterization of *Retama sphaerocarpa* microsymbionts in Zaida lead mine tailings in the Moroccan middle Atlas. *Systematic and Applied Microbiology*, 44(3), 126207.
6. Amrani, S., Noureddine, N. E., Bhatnagar, T., Argandona, M., Nieto, J. J., & Vargas, C. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(1), 44-5
7. Aouadj R., Saidi Sief O.(2015). Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la légumineuse fourragère *Hedysarum pallidum Desf* poussant dans la région de Djebel Boutaleb (Setif). Mémoire de Master, Ecologie Microbienne. Université des Frères Mentouri Constantine, p. 6, 16
8. Ardley, J. K., Parker, M. A., De Meyer, S. E., Trengove, R. D., O'Hara, G. W., Reeve, W. G., Howieson, J. G. (2012). *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt_11), 2579-2588.

9. Bakhoum, N., Galiana, A., Le Roux, C., Kane, A., Duponnois, R., Ndoye, F., ... & Diouf, D. (2015). Phylogeny of nodulation genes and symbiotic diversity of *Acacia senegal* (L.) Willd. and *A. seyal* (Del.) Mesorhizobium strains from different regions of Senegal. *Microbial ecology*, 69(3), 641-651.
10. Belhadi, D., De Lajudie, P., Ramdani, N., Le Roux, C., Boulila, F., Tisseyre, P., ... & Laguerre, G. (2018). *Vicia faba* L. in the Bejaia region of Algeria is nodulated by *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, *Rhizobium laguerreae* and two new genospecies. *Systematic and applied microbiology*, 41(2), 122-130.
11. Boukhatem Z.F. (2013). Diversité Taxonomique et Symbiotique des rhizobia associés aux *Acacia* sp d'Algérie. Thèse de Doctorat, Microbiologie. Université d'Oran, p. 2.
12. Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velazquez, E., & Bedmar, E. J. (2011). *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 61(12), 2922–2927.
13. Charchar N. (2015). Optimisation des conditions de germination des graines d'*Acacia arabica* d'Algérie et isolement des Rhizobia à partir des nodosités racinaires. Mémoire de magister , Université Mohamed Boudiaf, Oran , 44p.
14. Chen, W. M., Laevens, S., Lee, T. M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., & Vandamme, P. (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1729-1735.
15. Chen, W. X., Yan, G. H., Li, J. L. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 392-397.
16. Chopin, A., & Langella, P. (1982). Analogies de profils plasmidiques chez les streptocoques du groupe N. *Le Lait*, 62(621-622), 705-719.
17. Dekak A. (2018). Caractérisation des isolats bactériens par des techniques phénotypiques et électrophorétiques isolés à partir des nodules de quelques espèces de légumineuses spontanées de la tribu des Ginesteae (Fabaceae). THESE de DOCTORAT EN SCIENCE, Université des Frères MENTOURI Constantine 1, PP.44-46.
18. Dupont, F., Guignard, J. L. (2015). *Botanique: les familles de plantes*. Elsevier Health Sciences.

19. El Hamrouni, A. (2001). Conservation des zones humides littorales et des écosystèmes côtiers du Cap-Bon. Rapport de diagnostic des sites. Partie relative à la flore et la végétation. Med Wet et Coast, République Tunisienne, 38p.
20. Farida, B., Géraldine, D., Abdelghani, B., Djellali, B., Said, B., Gisèle, L. (2009). Retama species growing in different ecological–climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the Bradyrhizobium genus. Systematic and Applied Microbiology, 32(4), 245-255.
21. Frank, B. (1889). Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 7, 332-346.
22. Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M. H., Abdelmoumen, H., Quiñones, M. A., Peix, A. (2013). Definition of a novel symbiovar (*sv. retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. Systematic and applied microbiology, 36(4), 218-223.
23. Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M.-H., Abdelmoumen, H P. Spaink.(2000). Root Nodulation and Infection Factors Produced By Rhizobial Bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 2000. 54:257–88
24. Iskounen T. (2012). Isolement et caractérisation de bactéries nodulant les légumineuses *Calycotome spinosa*. Mémoire d'Ingénieur, Génie Biologique. Université de Bejaia, p. 3, 17.
25. Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., & Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 47(3), 895-898.
26. Jordan D.C. (1984). International comitte on systématique bacteriology. Sub comitte on taxonomy of agrobactériem and *rhizobium*. *Syst-bacterial*, 34 Int; J.J, P24.
27. Jordan, D. C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 32(1), 136-139.
28. Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., & Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts The GenBank accession numbers for the

sequences reported in this paper are AF217261 through AF217272 for nodC and AF218126, AF275670 and AF275671 for nifH. *Microbiology*, 147(4), 981-993.

29. Lin, D. X., Wang, E. T., Tang, H., Han, T. X., He, Y. R., Guan, S. H., & Chen, W. X. (2008). *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(6), 1409-1413.
30. Mahdhi M., Mars M. (2006). Genotypic diversity of rhizobia isolated from *Retama raetam* in arid regions of Tunisia. *Annals of Microbiology*, 56 (4) 305-311.
31. Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. *Trends in microbiology*, 17(10), 458-466.
32. Menadi O., Boumaza A. (2016). Analyse du micro-symbiote isolé à partir des racines de la légumineuse *Trigonella gladiata* Stev. Mémoire de Master, Ecologie Microbienne. Université de Constantine, p. 7
33. Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411(6840), 948-950.
34. Mukta Jhalani and Kristy Yuan.(2004). "Enrichment and Isolation of Rhizobium." University of Maryland, BSCI 223H. April 30, 2004
35. Mulligan, J. T., & Long, S. R. (1989). A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics*, 122(1), 7-18.
36. Nawel, S. (2015). Etude des Associations Symbiotiques de *Retama monosperma*: Approches Morphologique, Anatomique et Ultrastructurale, Caractérisation moléculaire des Isolats (Doctoral dissertation, University of sciences and technology in Oran). p. 17.
37. Nouredine, N. E., Bendifallah, N., Tarek, H., Ouled Amrane, S., Sahki, R., & Amrani, S. (2021). Prévalence de la symbiose chez *Acacia raddiana* (A. tortilis subsp. raddiana) et spectre d'hôte des souches de Rhizobia associées. *Annales de la Recherche Forestière en Algérie*, 11(2), 42-53.
38. Oubraham S. (2015). Caractérisation phénotypique et étude de l'effet des antibiotiques et des métaux lourds sur la croissance des bactéries nodulant *Genista numidica*. Mémoire de Master, Environnement et Santé Publique. Université de Béjaia, p. 3

39. Quezel. P., S Santa. (1962) . nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1. p.462-541.CNRS.
40. Rabah Chabbi .(2010) . Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien) . Thèse de doctorat d'état, Université Mentouri Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, p. 44-45
41. Rivas, R., Velázquez, E., Willems, A., Vizcaíno, N., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., ... & Martínez-Molina, E. (2002). A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (Lf) Druce. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5217-5222.
42. Sakrouhi I. (2017). Caractérisation Physiologique et Taxonomique du rhizobium Nodulant *Acacia* Isolés des Dunes de Merzouga et Etude Transcriptomique d'une Souche Modèle de la Collection. Thèse de Doctorat, Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohamed V Rabat, pp. 15-16.
43. Sanginga, N., Mulongoy, K., Ayanaba, A. (1989). Effectivity of indigenous rhizobia for nodulation and early nitrogen fixation with *Leucaena leucocephala* grown in Nigerian soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(2), 231-235
44. Saoudi M. (2008). Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N. LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister, Biologie Végétale. Université Mentouri de Constantine, p. 25, 50.
45. Scott, D. B., Ronson, C. W. (1982). Identification and mobilization by cointegrate formation of a nodulation plasmid in *Rhizobium trifolii*. *Journal of Bacteriology*, 151(1), 36-43.
46. Selami N. (2019). Associations Symbiotiques. Polycopie Du Cours, Biotechnologies. Université d'Oran Mohamed Boudiaf, pp. 11, 14, 20.
47. Shalaby, A. F., Monayeri, M. O., Etman, M. N., El Habibi, A. M., Youcef, N. M., (1972). Gremination of some desert medicinal plant under different condition. *Desert. Inst. Bull., A.R. E.*, 22(2): 433-444.
48. Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (2012). *Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology*. Springer Science & Business Media.

49. Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 257-288.
50. Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., ... & Dreyfus, B. (2001). Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of bacteriology*, 183(1), 214-220.
51. Tourene M. (2018). Identification de bactéries associées au genre *Genista*. Mémoire de Master, Ecologie Microbienne. Université A. MIRA – Bejaia, pp. 9-11.
52. Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A. M., Rivas, R., Ludena, D., ... & Velázquez, E. (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Applied and environmental microbiology*, 71(3), 1318-1327.
53. Valverde, A., Velazquez, E., Fernandez-Santos, F., Vizcaíno, N., Rivas, R., Mateos, P. F., ... & Willems, A. (2005). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1985-1989.
54. van Rhijn, P., Vanderleyden, J. (1995). The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological reviews*, 59(1), 124-142.
55. Vincent, J.M. (1970) . A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria, A manual for the practical study for the root-nodule bacteria.
56. Whitman .W B. (2007). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology : Volume 3: The Firmicutes*. USA ,p 1449.
57. Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., & 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*. *Microbial ecology*, 51(3), 375-393.
58. Zohary, M.(1962). *Plant Life of Palestine: Israel and Jordan*. Book Ronald Press Co. New York USA 1962 262 pp.

Annexes

Annexes I: les articles utilisés dans le Partie expérimentale:

1. Abdelnaby, M., Elnesairy, N. N. B., Mohamed, S. H., & Alkhayali, Y. A. A. (2015). Symbiotic and phenotypic characteristics of *rhizobia* nodulating cowpea (*Vigna Unguiculata* L. Walp) grown in arid region of Libya (Fezzan). *J Environ Sci Eng*, 4, 227-239.
2. Ahnia, H., Boulila, F., Boulila, A., Boucheffa, K., Durán, D., Bourebaba, Y., Rey, L. (2014). *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105(6), 1121-1129.
3. Ahnia, H., Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Palacios, J. M., Rey, L., Imperial, J. (2018). *Bradyrhizobium algeriense* sp. nov., a novel species isolated from effective nodules of *Retama sphaerocarpa* from Northeastern Algeria. *Systematic and applied microbiology*, 41(4), 333-339..
4. Alami, S., Lamin, H., Bennis, M., Bouhnik, O., Lamrabet, M., El Hachimi, M. L., El Idrissi, M. M. (2021). Characterization of *Retama sphaerocarpa* microsymbionts in Zaida lead mine tailings in the Moroccan middle Atlas. *Systematic and Applied Microbiology*, 44(3), 126207.
5. Amrani, S., Noureddine, N. E., Bhatnagar, T., Argandona, M., Nieto, J. J., & Vargas, C. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of *rhizobia* associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(1), 44-51.
6. Bakhoun, N., Galiana, A., Le Roux, C., Kane, A., Duponnois, R., Ndoeye, F., ... & Diouf, D. (2015). Phylogeny of nodulation genes and symbiotic diversity of *Acacia senegal* (L.) Willd. and *A. seyal* (Del.) *Mesorhizobium* strains from different regions of Senegal. *Microbial ecology*, 69(3), 641-651.
7. Belhadi, D., De Lajudie, P., Ramdani, N., Le Roux, C., Boulila, F., Tisseyre, P., Laguerre, G. (2018). *Vicia faba* L. in the Bejaia region of Algeria is nodulated by *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, *Rhizobium laguerreae* and two new genospecies. *Systematic and applied microbiology*, 41(2), 122-130.

8. Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, 84(1), 188-198.
9. Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2011). *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(12), 2922-2927.
10. Chopin, A., & Langella, P. (1982). Analogies de profils plasmidiques chez les *streptocoques* du groupe N. *Le Lait*, 62(621-622), 705-719.
11. Corich, V., Giacomini, A., Carlot, M., Simon, R., Tichy, H. V., Squartini, A., & Nuti, M. P. (2001). Comparative strain typing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* natural populations. *Canadian journal of microbiology*, 47(6), 580-584.
12. Farida, B., Géraldine, D., Abdelghani, B., Djellali, B., Said, B., & Gisèle, L. (2009). Retama species growing in different ecological-climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of *rhizobia* that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(4), 245-255.
13. Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M. H., Abdelmoumen, H., Quiñones, M. A., Peix, A. (2013). Definition of a novel symbiovar (*sv. retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Systematic and applied microbiology*, 36(4), 218-223.
14. Laguerre, G., Allard, M. R., Revoy, F., & Amarger, N. (1994). Rapid identification of *rhizobia* by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, 60(1), 56-63
15. Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., & Amarger, N. (2001). Classification of *rhizobia* based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AF217261 through AF217272 for *nodC* and AF218126, AF275670 and AF275671 for *nifH*. *Microbiology*, 147(4), 981-993.
16. Mosbah, M., & Mars, M. (2006). Genotypic diversity of *rhizobia* isolated from *Retama raetam* in arid regions of Tunisia. *Annals of microbiology*, 56(4), 305-311.
17. Mulligan, J. T., & Long, S. R. (1989). A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics*, 122(1), 7-18.

18. Nouredine, N. E., Bendifallah, N., Tarek, H., Ouled Amrane, S., Sahki, R., & Amrani, S. (2021). Prévalence de la symbiose chez *Acacia raddiana* (*A. tortilis* subsp. *raddiana*) et spectre d'hôte des souches de *Rhizobia* associées. *Annales de la Recherche Forestière en Algérie*, 11(2), 42-53
19. Scott, D. B., Ronson, C. W. (1982). Identification and mobilization by cointegrate formation of a nodulation plasmid in *Rhizobium trifolii*. *Journal of Bacteriology*, 151(1), 36-43.
20. Senanayake, L., Knievel, D. P., Stevens, S. E. (1987). Nodulation and symbiotic nitrogen fixation of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Plant and soil*, 99(2), 435-439.
21. Sanginga, N., Mulongoy, K., Ayanaba, A. (1989). Effectivity of indigenous *rhizobia* for nodulation and early nitrogen fixation with *Leucaena leucocephala* grown in Nigerian soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(2), 231-235
22. Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., & 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*. *Microbial ecology*, 51(3), 375-393.

Annexes II

I. Milieu de culture et solution nutritive de base des légumineuses

1. Composition du milieu de Jensen (Somasegaran et Hoben, 1994)

CaHPO ₄	1g
K ₂ HPO ₄	0.2g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.2g
FeCl ₃	0.1
Eau distillée	1000 ml

2. Composition de la solution nutritive en g/l (Fähreus, 1957)

Ca Cl ₂	0.10 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.12g

KH₂PO₄..... 0.10g
 Na₂ HPO₄2H₂O..... 0.15g
 Citrate de fer 0.005g
 Micro éléments 1 m

Annexe III

Milieux de culture pour rhizobia

Milieu: YMB (Yest Mannitol Broth) (VINCENT, 1970).

Mannitol	10.00 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
MgSO ₄	0.20 g
NaCl	0.10 g
Extrait de levure	0.50 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6.8
Autoclavage	120° Pendant 20 minutes

Milieu: Yeast Mannitol Agar (YMA) (Vincent 1970)

YMB	1000ml
Agar	15 g
pH	6.8
Autoclavage	120° Pendant 20 minutes

ملخص

في هذه الدراسة، تناولنا العديد من اعمال البحث، بهدف التحقق من أهمية *rhizobia* للبقوليات العفوية *Retama* في الجزائر. أظهرت دراسة الصفات المظهرية أن غالبية العزلات تتكون من *rhizobia* بطيئة النمو، وكل هذه العزلات تنمو على Yeast Mannitol Agar (YMA) عند 28 درجة مئوية مع أوقات ما بين 7.2 و 20 ساعة. أظهر اختبار nodulation ان لعزلات *Retama raetam* و *Retama sphaerocarpa* قدرة قوية على إصابة النباتات الاصلية والنباتات الأخرى: (*Lupinus micranthus*, *L. albus* et *Genista numidica*, *Vigna unguiculata*) كما تُظهر دراسة خصائص التطور الوراثي للجينات التكافلية *nifh* و *n* أن جميع السلالات قدمت تسلسلات جينية متشابهة جدًا للأنواع التالية *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 23230 و *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 و *Bradyrhizobium algeriense* (RST89T, RST91 et RST88bis) الكلمات المفتاحية *Retama* , *Bradyrhizobium* , nodulation, *nodC* , *nifh*

Résumé

Dans cette étude, nous avons abordés plusieurs travaux de recherche, dans le but d'étudier l'importance des *rhizobia* symbiotiques des légumineuses spontanées *Retama* dans l'Algérie.

L'étude des caractères phénotypiques montre que la majorité des isolats sont des *rhizobia* à croissance lente, tous ces isolats poussent sur Yeast Mannitol Agar (YMA) à 28 °C avec des temps de génération compris entre 7,2 et 20 heures.

Le test de nodulation indique que, les isolats de *Retama sphaerocarpa* et *Retama raetam* ont montré une forte aptitude à infecter leur plantes hôtes et d'autres plantes (*Lupinus micranthus*, *L. albus* et *Genista numidica*, *Vigna unguiculata*).

L'étude de la phylogénie des gènes symbiotiques *nodC* et *nifh* montre que toutes les souches ont fourni des séquences génétiques très similaires à *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 23230, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 et *Bradyrhizobium algeriense* (RST89T, RST91 et RST88bis).

Mots clés : *Retama*, *Bradyrhizobium*, nodulation, *nodC*, *nifh*.

Abstract

In this study, we have approached several research work, with the aim of studying the importance of symbiotic rhizobia of spontaneous legumes *Retama* in Algeria.

The study of phenotypic characters shows that the majority of isolates are slow-growing *rhizobia*; all these isolates grow on Yeast Mannitol Agar (YMA) at 28 °C with generation times between 7.2 and 20 hours.

The nodulation test indicates that, the Isolates of *Retama sphaerocarpa* and *Retama raetam* showed a strong ability to infect their host plants and other plants (*Lupinus micranthus*, *L. albus* et *Genista numidica*, *Vigna unguiculata*).

The study of phylogeny of the symbiotic genes *nodC* and *nifh* shows that all the strains provided very similar genetic sequences to *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 23230, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 and *Bradyrhizobium Algerian* (RST89T, RST91 and RST88bis).

Keywords: *Retama*, *Bradyrhizobium*, nodulation, *nodC*, *nifh*.