

<i>INTRODUCTION</i> .....	1
<b>CHAPITRE I</b>	
<i>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</i> .....	3
1. Importance de l'azote et sources d'azote pour les végétaux.....	3
2. La symbiose fixatrice d'azote atmosphérique.....	3
2.1. Les partenaires symbiotiques.....	3
2.1.1. Les légumineuses.....	3
2.1.2. Les rhizobiums.....	4
2.2. Le dialogue moléculaire.....	4
3. L'inoculation.....	5
3.1. L'inoculation avec des rhizobiums .....	6
3.1. 1. La nécessité à apporter un inoculum.....	6
3.1. 2. Critères de sélection des rhizobiums symbiotiques.....	6
3.1. 3. Exemples d'essais d'inoculation au Sénégal.....	7
3.2. La double inoculation rhizobiums-champignons mycorrhiziens.....	8
3.3. Facteurs majeurs pouvant affecter le succès de l'inoculation.....	8
3.3.1. Le manque de compétitivité des souches introduites.....	8
3.3.2. L'influence des facteurs environnementaux.....	9
4. <i>Arachis hypogaea</i> L. : une légumineuse fixatrice d'azote moléculaire.....	9
4.1. Description.....	10
4.2. Ecologie .....	11
4.3. <i>Arachis hypogaea</i> L. en symbiose avec les rhizobiums.....	12
4.3.1. Les rhizobiums nodulant <i>A. hypogaea</i> L. et leur mode d'infection.....	12
4.3.2. Inoculation de <i>A. hypogaea</i> L. ....	13
<b>CHAPITRE II</b>	
<i>MATERIEL ET METHODES</i> .....	15
1. Les variétés d'arachide utilisées.....	15
2. Les souches de bactéries inoculées.....	15

3. Le champignon mycorhizien.....	15
4. Dispositif expérimental.....	15
5. Mise en place et suivi de l'expérimentation.....	15
5.1. Semis des graines.....	15
5.2. Préparation et inoculation avec des rhizobiums.....	15
5.3. Préparation et inoculation avec des mycorhizes.....	15
5.4. Epandage de l'engrais chimique.....	15
5.5. Suivi de l'expérimentation.....	17
6. Echantillonnage.....	17
7. Caractérisation génétique des rhizobiums contenus dans les nodosités.....	17
7.1. Traitement des nodosités.....	18
7.2. Extraction de l'ADN.....	19
7.3. Amplification de l'IGS par PCR.....	20
7.4. Contrôle du succès de l'amplification.....	20
7.5. Digestion des produits de l'amplification par RFLP.....	21
8. Isolement des souches de rhizobiums.....	21
9. Test de nodulation des souches isolées.....	22
<b>CHAPITRE III</b>	
<i>RESULTATS</i> .....	24
1. Caractérisation génétique des rhizobiums.....	24
1.1. Caractérisation des souches USDA 3187 et LMG 9283.....	24
1.2. Caractérisation des rhizobiums contenus dans les nodosités.....	25
1.2.1. Variété 55-437.....	25
1.2.2. Variété 69-101.....	27
1.2.3. Variété fleur 11.....	28
1.2.4. Suivi de la persistance des souches inoculées.....	29
2. Tests de nodulation des souches de rhizobiums.....	29
3. Effet de l'inoculation avec des rhizobiums et des mycorhizes sur la nodulation, la croissance et le rendement des variétés d'arachide 55-437, 69-101 et Fleur 11.....	29
3.1. Effet de l'inoculation sur la nodulation .....	29
3.2. Effet de l'inoculation sur la croissance .....	32

3.2.1. Effet de l'inoculation sur biomasse aérienne.....	32
3.2.2. Effet de l'inoculation sur la biomasse racinaire.....	34
3.3. Effet de l'inoculation sur le rendement en gousses.....	36
3.3.1. Effet de l'inoculation sur le nombre de gousses.....	36
3.3.2. Effet de l'inoculation sur les poids sec des gousses.....	38
<b>CHAPITRE IV</b>	
<i>DISCUSSION</i> .....	40
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>46</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>47</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>56</b>

---

*LISTE DES : ABREVIATIONS,  
FIGURES ET TABLEAUX*

---

**LISTE DES ABREVIATIONS**

A	: Adénine
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNr	: Acide désoxyribonucléique ribosomal
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomal
ATP	: Adénosine 5'-triphosphate
BET	: Bromure d'éthidium
BSA	: Bovine Serum Albumin
C	: Cytosine
dATP	: désoxyadénosine-triphosphate
dCTP	: désoxycytidine-triphosphate
dGTP	: désoxyguanidine-triphosphate
dNTP	: désoxynucléotide-triphosphate
dNTPs	: désoxynucléotide-triphosphate-synthétase
DO	: Densité Optique
dTTP	: désoxytimidine-triphosphates
EDT	: Ethylènediamine tétracétate
G	: Guanine
<i>Hae</i>	: <i>Haemophilus aegyptius</i>
IGS	: Inter Genic Spacer
IRD	: Institut de Recherche pour le Développement
ISRA	: Institut Sénégalais de Recherches Agricoles
Kb	: Kilobase ou Kilo-paire de bases
<i>Msp</i>	: <i>Moraxella species</i>
NPK	: Azote Phosphore Potassium
Pb	: Paire de bases
PCR	: Polymerase Chain Reaction
QSP	: Quantité Suffisante Pour
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	: rotations par minute
T	: Thymine
<i>Taq</i>	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris-Borate EDTA
UCAD	: Université Cheikh Anta Diop
UV	: Ultra Violet
YM	: Yeast Mannitol
YMA	: Yeast Mannitol Agar

**LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1 :</b>	Représentation schématique des interactions précoces entre la bactérie et la racine de la plante hôte-----	<b>5</b>
<b>Figure 2 :</b>	Aspects morphologiques de l'arachide ( <i>Arachis hypogaea</i> L) -----	<b>12</b>
<b>Figure 3 :</b>	Dispositif expérimental-----	<b>16</b>
<b>Figure 4 :</b>	Schéma montrant la position des amorces utilisées-----	<b>20</b>
<b>Figure 5 :</b>	Programme utilisé pour la PCR-----	<b>21</b>
<b>Figure 6 :</b>	Plants de <i>A. hypogaea</i> cultivés en tubes Gibson-----	<b>23</b>
<b>Figure 8a :</b>	Profils de restriction de l'IGS des souches USDA 3187 (US) et LMG 9283 (LMG) obtenus avec les enzymes <i>Hae</i> III (A) et <i>Msp</i> I (B)-----	<b>24</b>
<b>Figure 8b :</b>	Profils <i>Hae</i> III d'extraits d'ADN de nodosités de plants de la variété 55-437 inoculés avec des rhizobiums-----	<b>26</b>
<b>Figure 8c :</b>	Profils <i>Hae</i> III d'extraits d'ADN de nodosités de plants de la variété 55-437 non inoculés avec des rhizobiums-----	<b>26</b>
<b>Figure 8d :</b>	Profils <i>Msp</i> I d'extraits d'ADN de nodosités de plants de la variété 69-101 inoculés avec des rhizobiums-----	<b>27</b>
<b>Figure 8e :</b>	Profils de restriction avec l'enzyme <i>Hae</i> III des représentants de groupes de souches rencontrés-----	<b>27v</b>
<b>Figure 8f :</b>	Profils de restriction avec l'enzyme <i>Msp</i> I des représentants de groupes de souches identifiés -----	<b>27v</b>
<b>Figure 8g :</b>	Profils <i>Hae</i> III d'extraits d'ADN de nodosités de plants de la variété Fleur 11 inoculés avec des rhizobiums-----	<b>28</b>
<b>Figure 8h :</b>	Profils <i>Msp</i> I d'extraits d'ADN de nodosités de plants de la variété Fleur 11 non inoculés avec des rhizobiums-----	<b>29</b>

v = verso

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1a :</b>	Taux de présence des souches introduites et des souches natives dans les nodosités analysées-----	<b>26</b>
<b>Tableau 1b :</b>	Taux de présence des souches introduites et des souches natives dans les nodosités analysées-----	<b>27</b>
<b>Tableau 1c :</b>	Taux de présence des souches introduites et des souches natives dans les nodosités analysées-----	<b>28</b>

<b>Tableau 2a :</b>	Effet de l'inoculation sur le nombre de nodosités obtenues 30 jours après semis-----	<b>30</b>
<b>Tableau 2b :</b>	Effet de l'inoculation sur le nombre de nodosités obtenues 45 jours après semis-----	<b>31</b>
<b>Tableau 2c :</b>	Effet de l'inoculation sur le nombre de nodosités obtenues 60 jours après semis-----	<b>32</b>
<b>Tableau 3a :</b>	Effet de l'inoculation sur le poids sec des parties aériennes 30 jours après semis-----	<b>33</b>
<b>Tableau 3b :</b>	Effet de l'inoculation sur le poids sec des parties aériennes 45 jours après semis-----	<b>33</b>
<b>Tableau 3c :</b>	Effet de l'inoculation sur le poids sec des parties aériennes 60 jours après semis-----	<b>34</b>
<b>Tableau 4a :</b>	Effet de l'inoculation sur le poids sec des racines 30 jours après semis-- -----	<b>35</b>
<b>Tableau 4b :</b>	Effet de l'inoculation sur le poids sec des racines 45 jours après semis-- -----	<b>35</b>
<b>Tableau 4c :</b>	Effet de l'inoculation sur le poids sec des racines 60 jours après semis-- -----	<b>36</b>
<b>Tableau 5a :</b>	Effet de l'inoculation sur le nombre de gousses obtenues 45 jours après semis-----	<b>37</b>
<b>Tableau 5b :</b>	Effet de l'inoculation sur le nombre de gousses obtenues 60 jours après semis-----	<b>38</b>
<b>Tableau 6a :</b>	Effet de l'inoculation sur le poids sec des gousses (g) obtenues 45 jours après semis-----	<b>39</b>
<b>Tableau 6b :</b>	Effet de l'inoculation sur le poids sec des gousses (g) obtenues 60 jours après semis----.	<b>39</b>

<i>EMBRANCHEMENT</i>		Spermaphytes
<i>SOUS-EMBRANCHEMENT</i>		Angiospermes
<i>CLASSE</i>		Dicotylédones
<i>SOUS-CLASSE</i>		Dialypétales
<i>SERIE</i>		Caliciflores
<i>ORDRE</i>		Fabales
<i>FAMILLE</i>		Fabacées
<i>SOUS-FAMILLE</i>		Faboideae
<i>TRIBU</i>		Aeschynomeneae
<i>SOUS-TRIBU</i>		Stylosanthinae
<i>GENRE</i>		<i>Arachis</i>
<i>ESPECE</i>		<i>hypogaea</i>

---

# *INTRODUCTION*

---

## INTRODUCTION

*Arachis hypogaea* L. est originaire de l'Amérique tropicale (Giller et Silvestre, 1969). C'est une plante oléagineuse principalement cultivée pour ses graines pouvant à maturité et à sec produire jusqu'à 44-56 % de lipides et 22-30 % de protéines (Reddy *et al.*, 2003). Environ 80 % de la production mondiale d'arachide provient des pays en développement ; où les rendements sont de plus en plus faibles (Subrahmanyam *et al.*, 1992). L'arachide a été introduite au Sénégal pendant la période coloniale (Giller et Silvestre, 1969). Elle occupe actuellement une place très importante dans l'économie du pays et constitue l'un des premiers produits d'exportation.

La production d'arachide au Sénégal est passée d'un million de tonnes dans les années 1970-80 à moins de 500 000 tonnes dans les années 1980-90 (Freud *et al.*, 1997). La baisse des rendements de cette culture est liée au déficit hydrique mais aussi à la pauvreté des sols en éléments minéraux et organiques dont principalement, l'azote et le phosphore (Dhery et Dreyfus, 1991 ; Freud *et al.*, 1997). La pauvreté des sols en éléments minéraux est le fait de la forte pression humaine sur les ressources en terres arables. La jachère, qui jadis constituait le moyen traditionnel de restauration de la fertilité des sols, est devenue quasi inexistante. L'agriculture extensive et la pression de pâturage ont entraîné une rareté de la matière végétale, qui constituerait une source d'amendement organique. Les résidus de récoltes sont exportés et commercialisés sous forme de fanes ou très vite consommés par les animaux transhumants durant la saison sèche (Powel et Saleen, 1987). L'agriculture et l'élevage n'étant pas pratiqués par les mêmes acteurs, il se pose aussi un problème d'organisation pour l'utilisation optimisée de la fumure animale. Les engrais minéraux chimiques sont faiblement utilisés à cause de leur coût très onéreux et de la nécessité d'une répétition des épandages. Des chercheurs ont montré que dans les sols d'Afrique occidentale, le pourcentage d'azote prélevé de l'engrais par les plantes (FUE) varie de l'ordre de 23 % à 30 % (Sylla, 1996 ; Ndoye et Dreyfus, 1988). Ainsi une quantité importante des apports d'engrais est perdue et pourrait être entraînée dans la nappe phréatique et constituer ainsi un danger de pollution par exemple dans la zone maraîchère des Niayes au Sénégal.

Le bilan des sols en éléments minéraux devenant ainsi négatif (agriculture extensive à très faibles intrants sans recyclage des résidus de récolte), il devient urgent de développer des moyens qui soient accessibles aux producteurs et qui permettent d'augmenter la productivité des sols en minimisant les risques de nuisance dans le long terme. Dans ce cadre, le recours à

la technologie de l'inoculation avec des bactéries fixatrices d'azote et des champignons endomycorhiziens comme engrais biologique peut être préconisé.

La fixation biologique de l'azote (FBA) est réalisée par des bactéries du sol dont les rhizobiums qui entrent en symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses, à l'exception du genre *Parasponia*. Elle permet aux légumineuses d'assimiler l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) pour la nutrition azotée et contribue à plus de 100 millions de tonnes par an dans l'approvisionnement mondial en azote (Graham, 1998). L'azote atmosphérique ainsi fixé, peut par minéralisation des résidus végétaux, améliorer la teneur en azote du sol pour les plantes non-fixatrices de N<sub>2</sub>.

Les endomycorhizes sont des symbioses entre les champignons mycorhiziens arbusculaires et les racines de la plupart des plantes. Elles permettent à la plante une meilleure absorption en eau et en éléments nutritifs disponibles dont le phosphore qui est un élément peu mobile dans le sol (Jakobsen *et al.*, 1992).

L'arachide est une légumineuse fixatrice d'azote atmosphérique pouvant s'associer à des champignons endomycorhiziens. La forme d'association tripartite légumineuse-rhizobium-champignon, crée une synergie des deux microsymbiotes qui permet d'améliorer l'approvisionnement et les échanges nutritionnels. Il est possible d'améliorer le fonctionnement de ces symbioses en apportant aux plantes cultivées une quantité importante de ces microorganismes sélectionnés. C'est la technique de l'inoculation. Le problème de l'inoculation de l'arachide au Sénégal est surtout lié à la présence de rhizobiums natifs qui peuvent être très compétitifs pour former et occuper les nodosités (Ndiaye, 1986).

Notre étude est basée sur les deux hypothèses suivantes :

- un inoculum de rhizobiums à très large compétitivité et à très grande efficacité pourrait aider à remplacer les souches indigènes (Montañez, 2000) ;
- l'inoculation de l'arachide peut bien s'avérer efficace, dans les sols infectés par des souches de rhizobiums inefficaces dans la fixation de N<sub>2</sub> (Castro *et al.*, 1999).

Elle s'inscrit dans la recherche des voies et moyens d'une utilisation efficace de l'inoculation pour améliorer la croissance et la productivité de l'arachide

Elle a pour objectifs spécifiques :

- i.) d'évaluer la compétitivité de deux souches de rhizobiums introduites pour servir d'inoculum à des plants de trois variétés d'arachide cultivées sur du sol non aseptisé en présence ou en absence de champignon mycorhizien ;
- ii.) de mettre en évidence l'effectivité de ces inoculums de rhizobiums sur les trois variétés d'arachide en présence ou en absence de champignon mycorhizien.

---

*REVUE BIBLIOGRAPHIQUE*

---

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Importance de l'azote et sources d'azote pour les végétaux

L'azote est l'un des éléments nutritifs majeurs pour les organismes végétaux et animaux. Il intervient principalement dans l'élaboration des biomolécules comme les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle (Epstein, 1972) qui sont très importantes pour la vie. Hageman (1984) et Layzell (1990) ont montré que l'azote est essentiel à la synthèse des enzymes de la photosynthèse et favorise l'utilisation des hydrates de carbone. Chez les végétaux, l'azote stimule le développement et l'activité des racines, favorisant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Stenvenson, 1986). Trois sources d'azote peuvent être utilisées par les végétaux : l'azote du sol, l'azote apporté sous forme d'engrais et l'azote atmosphérique ( $N_2$ ). L'azote du sol de même que l'azote issu des engrais, peut être directement utilisé par la plante. En revanche, l'azote atmosphérique nécessite d'être transformé sous une forme assimilable. La fixation de l'azote atmosphérique se fait par plusieurs mécanismes. Le mécanisme le plus important et le plus connu est la fixation biologique par des micro-organismes libres ou vivant en symbiose avec certaines plantes comme les légumineuses (Heynes, 1986).

### 2. La symbiose fixatrice d'azote atmosphérique

Les bactéries fixatrices d'azote vivent en symbiose avec des plantes. Les symbioses rhizobium-légumineuses ont été les mieux étudiées. Il est connu que dans ces symbioses, la plante hôte appartient à la famille des *Leguminosae*, à l'exception du genre *Parasponia* appartenant à la famille des *Ulmaceae* (Allen et Allen, 1981) et les bactéries, à l'état de bactéroïdes, fixent l'azote dans un organe différencié de la plante appelé nodosité. Les nodosités formées au niveau des racines ou parfois au niveau des tiges (Dreyfus *et al.*, 1988) sont le siège des échanges entre les deux partenaires symbiotiques. La bactérie y réalise la réduction de l'azote moléculaire atmosphérique ( $N_2$ ) en ammoniac ( $NH_3$ ). L'énergie nécessaire à cette réaction est fournie sous forme de composés carbonés par la plante.

#### 2.1. Les partenaires symbiotiques

##### 2.1.1. Les légumineuses

Les légumineuses sont constituées par des plantes herbacées et des plantes ligneuses. Elles comprennent trois sous familles : les Papilionacées (Fabacées), les Mimosacées et les Caesalpiniacées. À peu près 20 % d'entre elles ont été testées pour évaluer leur aptitude à

former des nodosités. Le pourcentage des espèces capables d'entrer en symbiose et de former des nodosités est élevé chez les Papilionacées (97%) et beaucoup plus faible chez les Caesalpiniacées (23%), les Mimosacées occupant une position intermédiaire (90%) (Sutherland et Sprent, 1993).

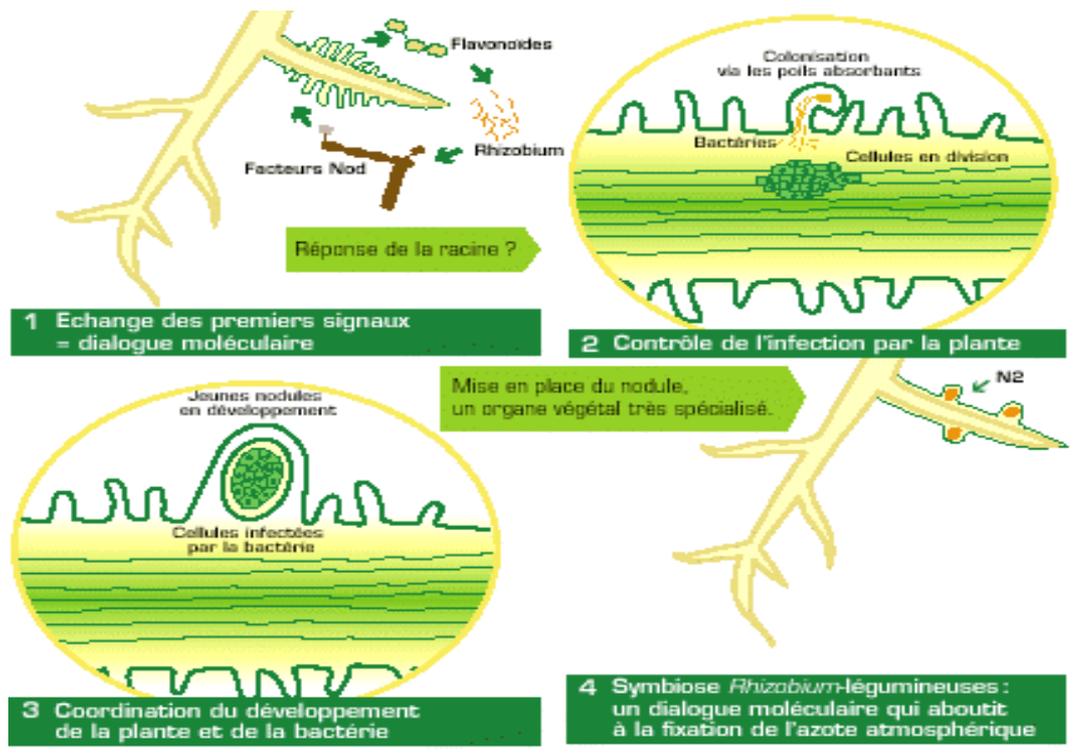
### 2.1.2. Les rhizobiums

Plusieurs études de caractérisation taxonomique, basées sur des approches phénotypiques et génotypiques, ont révélé une extrême diversité des rhizobiums (Prin *et al.*, 1993). Ces études ont conduit à la définition de plusieurs taxa. Les rhizobiums sont ainsi classés en 49 espèces appartenant principalement à 12 genres. La subdivision des alpha proteobacteria regroupe à elle seule 8 genres : *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Blastobacter* et *Devosia* (Willems, 2003). Deux genres, *Burkholderia* et *Ralstonia* sont décrits comme appartenant à la sous-classe des beta proteobacteria (Willems, 2003). Récemment, des bactéries appartenant à la subdivision des gamma proteobacteria ont été isolées et classées en genre *Hedysarum* (Benhizia *et al.*, 2004). D'autres bactéries apparentées aux alpha proteobacteria ont également été décrites et classées en genre *Ochrobactrum* (Ngom *et al.*, 2004 ; Trujillo *et al.*, 2005).

## 2.2. Le dialogue moléculaire

L'étape précoce de l'association symbiotique est contrôlée par des échanges de signaux entre les deux partenaires. Des degrés variables de spécificités d'hôte sont souvent observés dans cette relation entre légumineuse et rhizobium (de Lajudie, 2004). En effet, en présence de rhizobia dans la rhizosphère, les racines de la plante hôte excrètent des composés phénoliques généralement de type flavonoïdes. Ces composés agissent comme inducteur des gènes nod bactériens impliqués dans la nodulation. L'induction a lieu par l'intermédiaire de protéines régulatrices Nod D qui sont des activateurs transcriptionnels des gènes nod (Peters et Verma, 1990 ; Fischer *et al.*, 1992). En réponse, la bactérie synthétise et sécrète, sous le contrôle des gènes nod, des molécules lipochitoooligosaccharidiques. Ces molécules appelées facteurs Nod, déclenchent le programme de nodulation de la plante hôte et permettent l'infection bactérienne (cf. figure 1). Celle-ci a lieu le plus souvent par l'intermédiaire d'un cordon d'infection qui progresse vers la base du poil absorbant pour atteindre les cellules du cortex racinaire, où il se ramifie (Turgeon et Bauer, 1985 ; Truchet *et al.*, 1985). Parallèlement à cette infection bactérienne, des cellules corticales se différencient et se divisent activement pour former le primordium nodulaire qui va accueillir les bactéries ayant

progressé jusqu'au cortex racinaire. A ce stade, les bactéries différenciées en bactériodes, sont libérées dans les cellules. Elles sont alors capables de réduire l'azote atmosphérique en ammoniac directement assimilable par la plante (Denarie, *et al.*, 1992 ; Smits *et al.*, 1992). Lorsque l'azote n'est pas un facteur limitant, chacun des deux partenaires peut se développer indépendamment de l'autre (Jordan, 1984). Le schéma ci-après décrit les interactions précoces de cette relation conduisant à la formation de nodosités capables de fixer l'azote N<sub>2</sub>.



**Figure 1** : Représentation schématique des interactions précoces entre la bactérie et la racine de la plante hôte ; Source : « <http://www.crdp-toulouse.fr> »

Dans certains cas, l'infection ne fait pas intervenir les poils absorbants et la pénétration des bactéries se fait par *crack entry*, soit au niveau d'une zone de faiblesse de l'épiderme des racines latérales (Ndoye *et al.*, 1994 ; Boogerd et van Rossum, 1997) ; soit à la jonction de deux cellules épidermiques latérales (infection intercellulaire) (Boogerd et van Rossum, 1997).

### **3. L'inoculation**

On désigne par inoculum, une préparation sous forme liquide, semi liquide ou solide contenant la bactérie ou le champignon sélectionné et destinée à être introduite dans la rhizosphère. L'inoculation qui consiste à apporter un inoculum à la plante, est pratiquée en agriculture depuis de nombreuses années (Samba *et al.*, 2004).

#### **3.1. L'inoculation avec des rhizobiums**

L'inoculation permet de fournir un nombre suffisant de rhizobiums efficaces pour induire rapidement la colonisation de la rhizosphère par laquelle, la nodulation s'effectue après la germination (Bogino *et al.*, 2006). La nécessité d'apporter un inoculum n'est cependant pas généralisée à tous les types de sols. Elle devient inutile quand le sol est très pourvu en azote ou lorsque des rhizobiums spécifiques à la légumineuse et efficaces dans la fixation de N<sub>2</sub> sont déjà présents (Hegde, 1982).

##### **3.1. 1. La nécessité à apporter un inoculum**

L'efficacité de l'activité des rhizobiums dans les nodosités formées varie considérablement avec la souche utilisée (Dommergue *et al.*, 1999 ; de Lajudie, 2004). Dans beaucoup de sols pauvres en azote, les nodosités formées ne sont pas adéquates soit par le nombre, soit par la qualité. Dans ces sols, il est possible d'améliorer la fixation biologique de l'azote en apportant à la plante une culture de rhizobiums sélectionnés. Cette technique est presque toujours nécessaire lorsque des cultivars ou variétés de légumineuses sont nouvellement introduits dans une région (khurana *et al.*, 1998). L'inoculation peut s'avérer aussi efficace, dans les sols infectés par des souches de rhizobiums inefficaces dans la fixation de N<sub>2</sub> (Castro *et al.*, 1999). Un inoculum de rhizobium à très large compétitivité et à très grande efficacité pourrait aider à remplacer ces souches indigènes. Leur sélection nécessite cependant le respect d'un certain nombre de critères (Montañez, 2000).

##### **3.1. 2. Critères de sélection des rhizobiums symbiotiques**

Pour infecter la plante hôte et pour fixer N<sub>2</sub> *in planta*, la bactérie symbiotique doit entretenir avec son partenaire végétal des relations de compatibilité satisfaisantes et, pour subsister dans le sol, elle doit présenter une grande capacité d'adaptation à certaines contraintes liées à cet environnement. La recherche de cette double propriété est l'objectif des travaux de sélection des souches performantes destinées à l'inoculation (Dommergues *et al.*,

1999). La bactérie à introduire doit non seulement avoir l'aptitude à survivre et à coloniser la rhizosphère mais gagnerait aussi beaucoup dans sa capacité à migrer dans le sol (Khurana *et al.*, 1998) pour pouvoir atteindre les sites de fixation les plus reculés sur la racine. La réponse à l'inoculation des légumineuses dépend aussi largement du nombre de rhizobiums déjà établis dans le sol, de la disponibilité en azote du sol mais aussi de la quantité d'azote nécessaire à la culture (Singleton *et al.*, 1992). Pour être couronnée de succès, la souche destinée à l'inoculation doit être capable de supplanter les rhizobiums natifs du sol en ce qui concerne la formation de nodosités et doit surtout fixer l'azote efficacement pour satisfaire les besoins de la plante. La capacité de persistance d'une souche d'une saison à l'autre, rendant inutile la répétition saisonnière de l'inoculation, est un avantage supplémentaire (Nambiar, 1985). De ce fait, une bonne maîtrise des variations d'ordres génétiques et structurels affectant les populations de rhizobiums dans le sol et des facteurs influençant ces variations pourrait amener à mieux sélectionner les souches destinées à l'inoculation (Sanginga, 1994).

### 3.1. 3. Exemples d'essais d'inoculation au Sénégal

Au Sénégal, plusieurs systèmes symbiotiques fixateurs d'azote ont montré leur efficacité à résoudre certains problèmes écologiques et agronomiques. Nous pouvons citer le cas de la zone à vocation maraîchère des Niayes, située tout le long de la côte de Dakar à Saint Louis, qui était menacée de recouvrement et de stérilisation par l'avancée des dunes vives du littoral Nord-Ouest. Elle a été protégée par des plantations de Filaos (*Casuarina equisetifolia*) inoculées avec *Fankia* sur une bande de 100 à 1000 m de large le long du littoral (Andéké-Lengui et Dommergues, 1983). Un autre exemple est celui de la légumineuse à nodosités de tige *Sesbania rostrata* qui, utilisée comme engrais vert dans les rizières en association avec sa bactérie symbiotique *Azorhizobium caulinodans*, permet d'augmenter les rendements en riz de façon très significative (Ndoye *et al.*, 1996). De nombreux programmes de reboisement et d'agroforesterie au Sénégal ont également fait appel à des légumineuses nodulées comme *Faidherbia albida* (Gueye et Ndoye, 2000), *Pterocarpus erinaceus* et *Pterocarpus lucens* (Sylla *et al.*, 2002), *Leucaena leucocephala* et *Acacia mangium* (Diouf *et al.*, 2003), *Gliricidia sepium* (Thiao, 2005), *Acacia nilotica* (Sarr *et al.*, 2005), *Acacia senegal* (Faye *et al.*, 2006). Les récents travaux d'inoculation effectués par Krasova-Wade *et al.* (2006) sur *Vigna unguiculata*, avec comme substrat du sol sablo argileux provenant de Bambey, ont également mis en évidence l'existence d'une souche indigène (ORS 3260) nodulant cette espèce et qui serait adaptée à la sécheresse.

### **3.2. La double inoculation rhizobiums-champignons mycorhiziens**

Les endomycorhizes sont des symbioses entre les champignons mycorhiziens arbusculaires et les racines de la plupart des plantes. Elles peuvent améliorer la structure du sol (Miller et Jastrow, 2000) et la nutrition des plantes en phosphore (Jakobsen *et al.*, 1992) et en eau (Smith et Read, 1997). Par ailleurs, Duponnois *et al.* (2000) ont montré que chez *A. holosericea* qui constitue un réservoir de nématodes, la présence de champignons mycorhiziens dans la rhizosphère inhibe l'infection des racines par les nématodes.

La présence simultanée des rhizobiums et des champignons mycorhiziens sur une même plante fixatrice d'azote donne naissance à une symbiose multipartite. Cette dernière, si elle est bien établie, est capable d'améliorer significativement la croissance et la fixation de N<sub>2</sub> de la plante hôte (Koide, 1991 ; Lekberg et Koide, 2005). La présence des mycorhizes améliore non seulement l'absorption des phosphores (P) mais aussi celle des oligo-éléments comme Cu et Zn, l'activité photosynthétique, la nutrition hydrique, et l'équilibre hormonal des légumineuses (Hayman, 1986). Il est établi qu'une bonne nodulation et un taux élevé de fixation de N<sub>2</sub> requièrent une quantité importante en P (Giller, 2001). Augmenter la disponibilité en P du sol peut alors amener à augmenter la nodulation et par conséquent l'accumulation de N. C'est ainsi que des effets additifs et parfois synergiques dans la performance des légumineuses sont souvent observés en présence de rhizobia et de champignons mycorhiziens arbusculaires (Goss et de Varennes, 2002). Des travaux effectués au Sénégal sur la double inoculation ont montré des effets positifs des mycorhizes sur la nodulation des rhizobiums associés à des légumineuses comme : *Calliandra calothyrsus* (Lesueur *et al.*, 2001), *Acacia tortilis* (André *et al.*, 2003), *Acacia crassicarpa* (Lesueur et Duponnois, 2005), *Acacia auriculiformis* et *A. mangium* (Diouf *et al.*, 2005). Il est cependant important de signaler que le succès de l'inoculation est souvent influencé par plusieurs facteurs d'ordre biotiques comme abiotiques, exerçant tous un contrôle sur la fixation de N<sub>2</sub>.

### **3.3. Facteurs majeurs pouvant affecter le succès de l'inoculation**

#### **3.3.1. Le manque de compétitivité des souches introduites**

De nos jours, les techniques de sélection ont permis de mettre sur le marché de nombreuses souches (de rhizobiums et de champignons) utilisables pour améliorer les relations symbiotiques avec les légumineuses. Cependant, en ce qui concerne les souches introduites, l'efficacité sur les légumineuses tropicales est très contestée (Dakora, 1985 ; Wanje, 1989). Certaines, semblent très efficaces alors que de nombreuses souches introduites

se sont montrées moins compétitives que les souches locales. Il faut signaler qu'une grande aptitude à la compétition des souches inoculées par rapport aux rhizobiums natifs est un caractère aussi important que celui de l'efficacité dans la symbiose fixatrice d'azote elle-même (Triplet, 1990). Cette compétition fait généralement référence à la compétitivité entre les souches de rhizobiums pour la formation de nodosités ; et ceci depuis le moment où ces souches sont présentes dans un même environnement jusqu'au moment où elles se retrouvent au sein des nodosités (Simon *et al.*, 1996). Les souches importées sont plus facilement détruites par les microorganismes parasites. Plus adaptées à leur environnement, les souches locales occupent plus facilement les sites de nodulation. Les souches locales semblent aussi plus adaptées aux conditions de pauvreté des sols tropicaux en éléments nutritifs alors que les souches importées peuvent avoir des difficultés pour exprimer leur potentiel de fixation de l'azote (Dakora, 1985).

### **3.3.2. L'influence des facteurs environnementaux**

En plus de la compétitivité des rhizobiums introduits pour la formation de nodosités et leur efficacité dans la fixation de l'azote, ils doivent aussi faire face à une série de facteurs édaphiques, chimiques et biophysiques exerçant un contrôle dans la fixation de N<sub>2</sub>.

Parmi ces facteurs environnementaux, nous pouvons citer la température, l'humidité, l'acidité ainsi que plusieurs composantes chimiques du sol comme l'azote, le phosphore, le calcium et la teneur en molybdène (Montañez *et al.*, 1995 ; Toro, 1996). Il est ainsi difficile d'isoler les effets de tous ces facteurs du succès ou de l'échec de l'inoculation, de leurs influences dans la symbiose et la fixation de l'azote atmosphérique. La survie et le fonctionnement effectif des populations de rhizobiums inoculées sont souvent réduits par les facteurs environnementaux (Zahran, 1999). Le mode cultural tel que l'intensité et la fréquence des labours peut aussi influencer indirectement la fixation biologique de l'azote (Van Kessel et Hartley, 2000).

## **4. *Arachis hypogaea* L. : une légumineuse fixatrice d'azote moléculaire**

Il existe plusieurs variétés d'arachide. Celles commercialisées peuvent être réparties en deux ou parfois trois groupes botaniques : Virginia (pour les variétés à port rampant à érigé, à cycle végétatif compris entre 120 et 140 jours et à graines présentant une dormance), Spanish et Valencia (regroupant les variétés à port érigé, à cycle végétatif court compris entre 90 et 110 jours ainsi qu'à graines sans ou avec faible dormance). Cependant, tous les représentants du genre *Arachis* présentent des caractères communs.

#### 4.1. Description (figure 2)

- L'appareil aérien

L'arachide est une légumineuse herbacée annuelle à port dressé ou rampant suivant les variétés. La tige principale, issue du bourgeon terminal de l'épicotyle, est toujours érigée. Les ramifications qui sont d'un nombre variable peuvent être ascendantes ou courir sur une partie de leur longueur sur le sol pour les formes rampantes. Elles sont de section anguleuse dans le jeune âge et deviennent cylindriques en vieillissant, la moelle centrale disparaît avec le temps laissant place à des tiges âgées creuses. Les tiges peuvent être de 20 à 70 cm de long suivant les variétés et les conditions de culture. Leur couleur varie du vert clair au vert foncé.

Les feuilles de l'arachide sont pennées et possèdent deux paires de folioles. Ces folioles, de forme ovale et de couleur verte plus ou moins foncée ou plus ou moins jaunes selon les variétés, sont portées par un pétiole de 4 à 9 cm de long. A la base de ce pétiole, se trouvent deux stipules longues de 2 à 3 cm, soudées partiellement au pétiole et engainant la tige.

- L'appareil racinaire

Le système racinaire chez *A. hypogaea* est puissant. Il est constitué par une racine primaire pivotante qui s'enfonce verticalement dans le sol jusqu'à plus de 1 m de profondeur, et des racines latérales qui prennent naissance à diverses hauteurs sur ce pivot et se ramifient abondamment pour constituer un chevelu dense. Contrairement à la partie aérienne de la plante, les racines présentent des formations ligneuses. Les racines de l'arachide portent comme beaucoup de légumineuses des nodosités dues à l'association symbiotique de la plante avec des bactéries fixatrices d'azote. Les premières nodosités apparaissent environ 3 semaines après la germination. Les racines ne comportent pas de poils absorbants. L'absorption de l'eau et des sels minéraux se fait surtout par le parenchyme cortical des radicelles.

- L'appareil reproducteur

L'inflorescence chez *A. hypogaea* apparaît à l'aisselle d'une feuille, d'un rameau ou plus rarement de la tige principale. Sur les tiges de l'arachide, se trouve une série de nœuds qui peuvent être soit végétatifs (ne donnent naissance qu'à des feuilles) ; soit reproducteurs (donnent naissance à des inflorescences) ; soit stériles (donnent naissance à une « inflorescence » qui ne se développe pas).

*Arachis hypogaea* possède deux catégories de fleurs (des fleurs aériennes et des fleurs souterraines) qui sont de types papilionacés et sont fertiles. Les fleurs aériennes sont en générale de couleur jaune d'or avec souvent des stries rosées à la base de l'étendard et la fécondation est en générale autogame. Après fécondation, la base de l'ovaire s'allonge pour donner naissance à un organe appelé gynophore, à l'extrémité duquel le fruit va se développer

après sa pénétration dans le sol. Le gynophore possède une structure de tige, mais développe dans sa partie souterraine des formations analogues à des poils absorbants qui lui confèrent une fonction de racine. Les fleurs souterraines apparaissent au début de la floraison aérienne et sont cléistogammes, c'est-à-dire qu'elles ne s'ouvrent pas et par conséquent l'autofécondation est rigoureusement assurée.

Les fruits de *A. hypogaea* sont des gousses ovoïdes ou cylindriques longues de 1 à 8 cm et large de 0,5 à 2 cm. Leurs poids varient de 1 à 2,5 g en moyenne. Elles comprennent une coque et des graines. Les gousses sont groupées à la base du pied pour les variétés à port érigé, ou réparties le long des rameaux pour les variétés rampantes (Berhaut, 1967 ; Giller et Silvestre, 1969 ; Claudel *et al.*, 2005 ; Hubert P. In <http://www.maep.gov.mg>).

#### 4.2. Écologie

- Conditions de température

L'arachide a de gros besoins en chaleur. Il lui faut une moyenne optimale qui varie de 28° à 35° durant son cycle végétatif. Ainsi, pour la germination, c'est aux alentours de 32°-34° et pour la floraison et la fructification 24°-33°.

- Conditions de luminosité

Au stade de germination, la lumière freine le développement des racines. Au stade de fructification, l'exposition des gynophores à la lumière retarde leur croissance et les fruits ne peuvent se développer qu'à l'obscurité.

- Conditions hydriques

Pour boucler son cycle végétatif, l'arachide a besoin d'une hauteur d'eau comprise entre 400 et 1200 mm. Afin de favoriser la maturation et la récolte, il est préférable que la dernière partie du cycle soit plus sèche.

- Conditions édaphiques

Il importe que la texture et la structure du sol concourent à réaliser un bon drainage et de bonnes conditions d'aération du sol, une pénétration facile des gynophores dans le sol et un arrachage aisé à la récolte. Les sols légers conviennent donc bien à l'arachide. Le pH optimal doit être compris entre 6,5 et 7,5 (Giller et Silvestre, 1969 ; Claudel *et al.*, 2005 ; <http://fr.wikipedia.org>; Hubert P. In <http://www.maep.gov.mg>).



**Figure 2 :** Aspects morphologiques de l'arachide (*Arachis hypogaea L.*)

Source : <http://fr.wikipedia.org>

### **4.3. *Arachis hypogaea L.* en symbiose avec les rhizobiums**

#### **4.3.1. Les rhizobiums nodulant *A. hypogaea L.* et leur mode d'infection**

Des souches de rhizobia à croissance rapide ont été isolées de nodosités d'arachide (Huang, 1990). Cependant, la plupart d'entre elles sont de croissance lente et appartiennent dans la taxonomie des rhizobiales au genre *Bradyrhizobium* (Yang *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré qu'il existe une énorme diversité phénotypique et génotypique de bradyrhizobiums capables de former des nodosités avec *A. hypogaea* (Van Rossum *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 1999 ; Taurian *et al.*, 2006). Ces rhizobiums infectent l'arachide par pénétration intercellulaire ou « crack entry » (Chandler, 1978). Ce mécanisme se déroule souvent au niveau d'une zone de faiblesse de la racine. Il a lieu principalement au niveau des sites d'émergence des racines latérales (Uheda, 2001). Cette pénétration intercellulaire se prolonge par une multiplication active des bactéries, aboutissant ainsi à la formation de zones intercellulaires d'infection (Chandler, 1978). Ces bactéries symbiotiques envahissent les premières cellules corticales voisines par digestion locale ou invagination des parois cellulaires. L'infection se poursuit par divisions successives des cellules corticales envahies

qui vont finalement former le tissu nodulaire. Ce dernier, à la différence de beaucoup d'autres légumineuses, est ainsi caractérisé par l'absence de cellules non envahies (Dommergues *et al.*, 1999). Dans leur relation symbiotique, aussi bien les cultivars d'arachide que les souches de bradyrhizobiums, diffèrent dans la capacité à former des nodosités et à fixer N<sub>2</sub> avec leurs différents partenaires (Chen *et al.*, 2003).

#### **4.3.2. Inoculation de *A. hypogaea* L.**

L'inoculation avec des rhizobiums performants est une technique prometteuse pour une meilleure productivité de l'arachide sur des sols pauvres en azote (Wanje, 1989). Cependant, les résultats obtenus n'ont pas toujours été encourageants dans des sols contenant déjà des rhizobiums capables de noduler cette plante. L'absence de réponse à l'inoculation de l'arachide sur ces types de sols est le plus souvent expliquée par une grande promiscuité aussi bien du micro que du macro symbionte. L'arachide est souvent nodulé par des rhizobiums qui s'associent avec beaucoup d'autres légumineuses tropicales (Allen et Allen, 1981 ; Wanje, 1989). Ces rhizobiums capables de former des nodosités avec l'arachide ne sont pas tous efficaces dans la fixation de N<sub>2</sub> (Castro *et al.*, 1999). En plus, ils colonisent largement la rhizosphère et infectent rapidement la plante ; empêchant ainsi aux souches efficaces introduites de s'associer avec l'arachide. Cette infectivité rapide encourage la plante à développer une immunité pour l'infection (Dunham et Baldwin, 1931). Les sites d'infection restent alors couverts par les nodosités formées par ces souches indigènes inefficaces dans la fixation de N<sub>2</sub> (Chen, 1941). C'est ainsi qu'en Argentine, l'inoculation des graines d'arachide avec une souche de *Bradyrhizobium* sp. USDA 3187 n'a eu aucun effet sur le rendement de l'arachide (Castro *et al.*, 1999). Récemment, Lekberg et Koide (2005) ont montré que l'inoculation en serre de l'arachide avec une souche de *Bradyrhizobium* MAR 1510 n'a pas d'effets significatifs sur le nombre de nodosités et la teneur en N. Le fait que l'apport de *Glomus intraradices* ait amélioré ces deux paramètres montre vraisemblablement pour eux que le déficit en phosphore était un facteur limitant la nodulation (Lekberg et Koide, 2005). Les résultats de sept années de recherches effectuées à l'ICRISAT (Institut International de Recherche sur les Cultures des zones Tropicales Semi- Arides) avaient pourtant ouvert des possibilités quant à l'inoculation de *A. hypogaea* (Nambiar, 1985). Ces expériences avaient montré qu'une culture liquide d'une souche efficace de *Rhizobium* NC 92, répandue en quantités suffisantes sur les graines, augmente le rendement de certains cultivars d'arachide. Des résultats positifs de l'inoculation sont également confirmés dans plusieurs travaux récents sur *A. hypogaea*. Lanier *et al.* (2005) ont montré que dans six de leurs sept expériences, des

réponses à l'inoculation sont observées sur le rendement de la plante ; mais précisent tout de même que le champ n'a pas subi une précédente culture d'arachide. Aussi en Inde, la co-inoculation d'une souche de *Thiobacillus sp.* (bactérie oxydative de sulfure) avec une souche de *Rhizobium sp.* TNAU14 a augmenté significativement le nombre et le poids sec des nodosités, de même que la biomasse de la plante (Anandham *et al.*, 2007). En Argentine, Bogino *et al.* (2006) ont montré également que la souche de *Bradyrhizobium C-145* était plus efficace dans l'amélioration du nombre de nodosités et du rendement en matière sèche de la plante. L'inoculation de l'arachide avec des souches de *Bradyrhizobium sp.* interviendrait même dans le renforcement des potentialités de défense de la plante en augmentant ses capacités de sécrétion de phytoalexine (Azpilicueta *et al.*, 2004).

Au Sénégal, peu d'études ont été réalisées sur l'inoculation de *A. hypogaea*. Pour les premiers essais, Jaubert (1951) avait noté dans la région de Louga une augmentation du rendement en gousses de 13%. Des résultats de ce genre sont rapportés dans la même région par les travaux de Ndiaye (1986). Ces travaux montrent une amélioration des paramètres de nodulation, d'activité fixatrice d'azote et de rendement en gousses suite à l'inoculation avec la souche de *rhizobium CB 756*. D'autres travaux seront entrepris par Dhery et Dreyfus (1991) suite à la confirmation par Dhery *et al.* (1987), de l'existence de carence en N des sols du bassin arachidier à travers des essais agronomiques menés en 1985 et 1986. Ces travaux réalisés au champ ont montrés que l'inoculation des semences par enrobage à sec avec des souches de rhizobiums sélectionnées S10 et N22V1 incluses dans l'alginate permet d'atteindre des rendements équivalents à ceux que l'on pourrait obtenir avec l'application d'urée (100 kg/ha) (Dhery et Dreyfus, 1991). L'inoculation avait aussi entraîné une élévation notable de la teneur en N total du sol. La réponse de la plante à l'apport d'urée montre également que l'arachide n'était pas capable de fixer suffisamment de N<sub>2</sub> pour couvrir ses besoins en N (Dhery et Dreyfus, 1991). Cependant, bien que ces souches introduites semblent avoir des potentialités fixatrices supérieures à celles des souches natives la compétitivité pour les souches natives est telle qu'il est difficile d'augmenter les rendements de manière très significative (Ndiaye, 1986).

---

*MATERIEL ET METHODES*

---

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

### 1. Les variétés d'arachide utilisées

Les semences des différentes variétés d'arachide utilisées nous ont été fournies par le Centre National de Recherches Agronomique (CNRA) de Bambey. Les variétés fleur 11, 55-437 et 69-101 habituellement cultivées dans le pays ont été retenues pour l'étude. Fleur 11 et 55-437 sont des variétés hâtives à cycle végétatif compris entre 90 et 100 jours. Elles sont cultivées principalement dans la zone Nord du Sénégal où la pluviométrie moyenne annuelle varie entre 400 et 600 mm. La variété 69-101 à cycle long (120 et 140 jours), est cultivée dans la zone Sud à pluviométrie moyenne annuelle variable entre 600 et 900 mm.

### 2. Les souches de bactéries inoculées

Deux souches de *Bradyrhizobium sp.* USDA 3187 et LMG 9283 sélectionnées pour leur efficacité à fixer l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) avec l'arachide ont été utilisées. La souche USDA 3187 a été isolée en Argentine de la plante hôte *Arachis hypogaea* L. (Castro *et al.*, 1999). La souche LMG 9283 a été collectionnée au laboratoire de microbiologie de Gand en Belgique.

### 3. Le champignon mycorhizien

Le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* [Schenk and Smith (DAOM 181602, Ottawa Agricultural Herbarium, Canada)] a été utilisé. Ce champignon a été isolé au Canada et est connu pour sa capacité à former une symbiose endomycorhizienne efficace avec diverses légumineuses.

### 4. Dispositif expérimental

L'expérimentation a été conduite de Juin à Septembre dans un dispositif randomisé en buses (figure 3). Un mélange de sol de Sangalkam (localité de la zone des Niayes) a été utilisé pour la culture des plants. Le prélèvement des sols a été effectué dans une station de recherche de l'ISRA (environ 30 km au Nord-Est de Dakar). Le sol n'a pas été stérilisé et présente les caractéristiques physico-chimiques suivantes : argiles 3,6 % ; limons 1,6 % ; limons fins 2,9 % ; sables fins 51 % ; sables grossiers 40,9 % ; matière organique 0,43 % ; carbone 0,25 % ; phosphore total 5,15 g par kg de sol ; azote total 0,21 % ; C/N = 11,9 ; pH H<sub>2</sub>O = 5,7. Les 6 traitements suivants ont été appliqués à chacune des trois variétés utilisées :

- Inoculation avec des rhizobiums seuls (mixte USDA 3187 et LMG 9283) = RH
- Inoculation avec le champignon mycorhizien seul (*Glomus intraradices*) = M
- Double inoculation avec des rhizobiums (mélange USDA 3187 et LMG 9283) et un champignon mycorhizien (*Glomus intraradices*) = RM
- Témoin non inoculé avec apport d’engrais NPK (20-10-10) à la dose de 150 kg/ha (dose recommandée) = E1
- Témoin non inoculé avec apport d’engrais NPK (20-10-10) à la dose de 300 kg/ha = E2
- Témoin non inoculé sans apport d’engrais = T

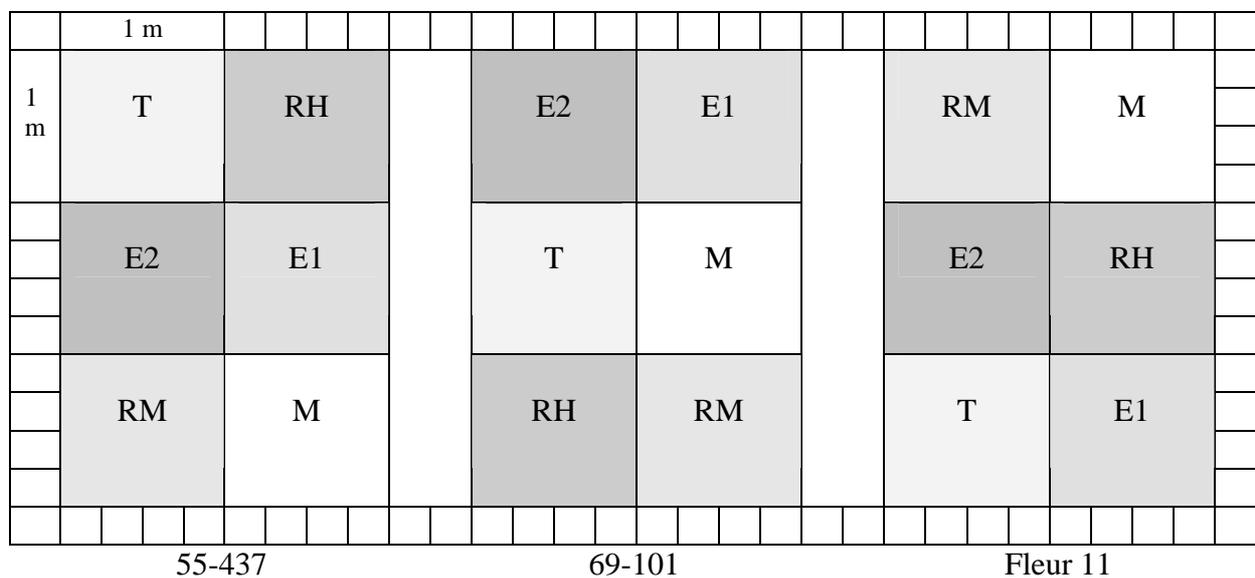


Figure 3 : Dispositif expérimental

## 5. Mise en place et suivi de l’expérimentation

### 5.1. Semis des graines

Les graines d’arachide ont été préalablement traitées au Granox (fongicide-insecticide). Elles ont été semées dans le sol légèrement humidifié à une profondeur d’environ 5 cm. Le semis a été effectué manuellement à raison de 2 graines par poquet avec un écartement de 30 cm.

### 5.2. Préparation et inoculation avec des rhizobiums

Les deux souches de *Bradyrhizobium sp.* (USDA 3187 et LMG 9283) ont préalablement été étalées sur boîtes de Pétri contenant le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970) (cf. Annexe) puis incubées dans une étuve à 28 °C. Au bout de 72 heures de culture, une colonie a été repiquée pour chaque souche dans un volume de 2 litres de milieu

de culture liquide YM (Vincent, 1970). Cette culture liquide a été incubée à une température de 28 °C sur une table d'agitation à rotation orbitale en chambre de culture. En phase exponentielle de croissance, la pureté de la culture a été vérifiée par contrôle au microscope optique. La densité des cellules bactériennes a été estimée par une mesure de la DO (Densité Optique) au spectrophotomètre à la longueur d'onde 600 nm. Une analyse génétique par PCR/RFLP appliquée à l'IGS 16S-23S de chacune des deux souches a été effectuée afin de déterminer les profils correspondants. Un mélange comprenant les deux souches de *Bradyrhizobium* USDA 3187 et LMG 9283 à proportions égales, a été réalisé avant l'inoculation en buses. Ce mélange des deux souches a été mis dans un flacon adapté à un répartiteur. L'inoculation a été effectuée au semis par apport direct de 10 ml du mélange sur les graines introduites dans chaque poquet. Une deuxième inoculation a été effectuée après la levée des jeunes plants (10<sup>ème</sup> jour après semis) par apport de 10 ml du mélange des deux souches introduit dans le sol juste au niveau du collet.

### **5.3. Préparation et inoculation avec des mycorhizes**

L'inoculum fongique (*Glomus intraradices*) a été produit à l'aide d'une plante piège, le maïs (*Zea mays*), cultivée dans des pots de capacité 1,5 kg. Du sable de plage pauvre en phosphore stérilisé à 120 °C pendant 2 heures a été utilisé comme substrat de culture. Les plants de maïs en culture ont été inoculés avec la souche de champignon *Glomus intraradices*. Les pots ont été régulièrement arrosés à la capacité au champ et ont reçu tous les 15 jours 100 ml de solution nutritive de Long Ashton (cf. Annexe). La récolte de l'inoculum fongique a été faite après 3 mois de culture. Cet inoculum est constitué de spores, d'hyphes et de fragments de racines de maïs infectées. Le champignon mycorhizien a été inoculé en buses avant semis des graines d'arachide en introduisant 10 g d'inoculum dans chaque poquet.

### **5.4. Epannage de l'engrais chimique**

L'apport d'engrais chimique a été réalisé au semis à raison de 15 g au mètre carré (m<sup>2</sup>) pour les traitements avec la dose habituelle et 30 g au m<sup>2</sup> pour les traitements avec la dose double. L'engrais a été répandu sous sa forme solide de façon homogène dans chacune des buses traitées.

### **5.5. Suivi de l'expérimentation**

Les plants ont été arrosés à l'eau de robinet tous les 2 jours de façon à atteindre la capacité au champ. Un sarclage a été effectué quelques jours après levée pour désherber et casser la croûte superficielle.

## 6. Echantillonnage

Les prélèvements ont été effectués à différents stades du développement végétatif de l'arachide en culture : au stade première floraison (30 jours après semis), au stade formation de gousses (45 jours après semis) et au stade début de maturation (60 jours après semis). Un prélèvement de 3 plants a été réalisé de façon à respecter le plus possible le même écartement qui doit séparer les différents plants restants. Au total 162 plants ont été collectés au cours des trois prélèvements effectués pour l'expérimentation. Chaque plant a été arraché du sol à l'aide d'un transplantoir puis étiqueté. Les nodosités ont été prélevées puis dénombrées avant d'être conservées à 4 °C dans des tubes avec du glycérol à 20 %. Les racines et les parties aériennes préalablement séparées à l'aide d'un sécateur ont été séchées à l'étuve à une température de 80 °C avant d'être pesées. Les poids secs des gousses et leur nombre ont été évalués pour chaque plant échantillonné au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> prélèvement. Les rendements en azote (N), phosphore (P) et potassium (K) des parties aériennes broyées ont été déterminés par analyse chimique. Les teneurs en NPK du sol en préculture et postculture ont été également évaluées. L'ensemble des données obtenues a été exploité par analyse de variance et comparaison des moyennes en utilisant le logiciel XLSTAT (info@xlstat.com).

## 7. Caractérisation génétique des rhizobiums contenus dans les nodosités

La caractérisation génétique des souches de rhizobiums a été réalisée à partir de l'ADN extrait directement des nodosités récoltées. Les rhizobiums ont été identifiés grâce à la technique de PCR/RFLP appliqué sur l'espace intergénique (IGS) 16S-23S de l'ADN ribosomal.

### 7.1. Traitement des nodosités

Les nodosités ont été lavées abondamment à l'eau distillée stérile et désinfectées superficiellement d'abord avec une solution d'hypochlorite de calcium saturé (70 %) pendant 3 min, puis avec de l'éthanol 96° pendant 1 à 2 min. Des rinçages ont été effectués avec de l'eau distillée stérile après chaque traitement. Chaque nodosité a été écrasée dans un volume de 150 µl de tampon TES/saccharose stérilisé. Le broyage a été effectué à l'aide de Poters plastiques (MERCK Eurolab, 60678.01, Strasbourg, France) préalablement désinfectés dans de l'alcool absolu. Cinquante microlitres de ce broyat auquel nous avons ajouté 25 µl de glycérol 60 % ont été conservés à -80 °C pour isoler ultérieurement les souches de rhizobiums présentes dans les nodosités. Les 100 µl de broyat restant ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN.

## 7.2. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN des nodosités a été réalisée à partir de 100 µl de broyats de nodosités suivant le protocole GES décrit par Krasova-Wade et Neyra (2007).

- La lyse des cellules

Aux 100 µl de broyat destinés à l'extraction, ont été ajoutés 10 µl de lysozyme (20 mg/ml). L'homogénéisât a été d'abord mélangé par un vortex puis mis à incubation à 37 °C à sec dans une étuve ou à l'humidité dans un Bain marie à 37 °C pendant 15 min. Au cours de cette phase, la lyse des polysaccharides membranaires permet la libération du contenu des cellules bactériennes.

- La dénaturation des protéines

A ce lysat, ont été ajoutés 250 µl de GES (Guanidine thiocyanate, EDTA, Sarcosyl). L'homogénéisât a été mélangé par le vortex et mis à incubation à 65 °C dans un bain marie pendant 15 min. Durant cette phase de dénaturation des protéines, l'intégralité des acides nucléiques reste très conservée. Pour éliminer les débris cellulaires, une centrifugation à 15.000 rpm a été effectuée pendant 15 min à 4 °C.

- La récupération de l'ADN

Le surnageant a été récupéré après centrifugation et additionné à 180 µl d'éthanol absolu refroidi. Le contenu des tubes a d'abord été mélangé doucement par des mouvements de va et vient puis laissé 3 min sur la paillasse avant d'être centrifugé à 15.000 rpm pendant 15 min. Cette étape a permis de précipiter l'ADN en le séparant du reste des polyphénols et polysaccharides. Le surnageant a été ensuite versé et, le culot contenant l'ADN lavé deux fois avec 500 µl de l'éthanol absolu refroidi par centrifugation à 15.000 rpm pendant 15 min à 4 °C. Le culot a été séché en laissant les tubes ouverts quelques minutes sur la paillasse. Le culot d'ADN obtenu a été dissout dans un volume de 50 à 200 µl de NaOH (8 mM). Le pH de l'extrait d'ADN a été ajusté à 7,5 (pH optimum pour la réaction d'amplification) avec 8 µl pour 50 µl d'extrait de l'HEPES (0,1 M).

- Le contrôle de l'extrait d'ADN

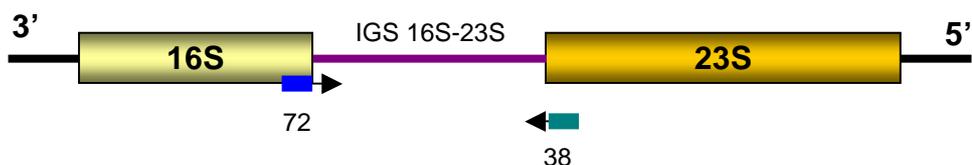
La quantité et la qualité de l'ADN extrait ont été contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % dans du TBE 1X (Tris - HCL 1,1 p/v ; Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 % p/v ; 2H<sub>2</sub>O ; acide borique 0,55 % p/v). Trois microlitres (3 µl) de l'extrait ont été prélevés et additionnés à 3 µl de bleu de charge (bleu de Bromophénol 0,025 %, glycérol 3 %, EDTA 1 mM). Le bleu de charge sert à maintenir l'échantillon au fond du puits ainsi qu'à visualiser le front de la

migration. Les mélanges ainsi obtenus ont été déposés dans les puits du gel et mis à migrer parallèlement avec un marqueur de poids moléculaire 1kb qui a servi d'échelle moléculaire. La migration a été réalisée dans une cuve à électrophorèse sous une tension électrique de 100 volts pendant 1 heure. Après migration, le gel a été coloré avec une solution de Bromure d'Ethidium (BET 1 µg/ml) pendant 25 à 30 min puis rincé à l'eau distillée pendant 15 à 20 min. Le gel a été par la suite visualisé et photographié sous lumière UV à l'aide d'un appareil Gel Doc (BIO RAD) connecté à un ordinateur. La mesure de la DO au spectrophotomètre (Pharmacia Biotech) dans la zone de longueurs d'ondes 200 à 340 nm a été parallèlement utilisée pour vérifier la pureté et la concentration des extraits d'ADN obtenus. Les échantillons d'ADN ont été conservés à -20 °C pour les analyses par PCR/RFLP.

### 7.3. Amplification de l'IGS par PCR

Une dilution de l'ADN a été effectuée au besoin avec de l'eau ultra pure stérile avant l'amplification par PCR de l'IGS. Cette dilution est parfois nécessaire pour éviter l'inhibition de l'activité de la Taq polymérase par les concentrations élevées en extraits d'ADN.

Pour chaque échantillon que nous avons traité, la PCR a été réalisée dans un microtube de 0,2 ml (tube PCR) contenant un volume réactionnel de 25 µl. Le mélange réactionnel présente la composition suivante : 1,25 µl de chacune des deux amorces (10 µM) FGPS 1490-72 et FGPL 132-38 ; des billes lyophilisées de « Taq Ready-To-Go » fabriquées par Amersham Pharmacia Biotech ; 10 à 50 ng d'ADN génomique utilisé comme matrice et de l'eau ultra pure (QSP). Chacune des billes lyophilisées contient 2,5 unité de Taq ADN polymérase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0 à température ambiante), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de chaque dNTP (dATP, dGTP, dTTP, et dCTP) et des stabilisateurs dont le BSA (Bovine Serum Albumin) pour une plus grande efficacité de la PCR. Un témoin négatif sans ADN a été inclus dans l'expérience pour servir de contrôle de la PCR. Les séquences nucléotidiques du couple d'amorces utilisé pour l'amplification de l'IGS sont définies ci-après : FGPS 1490-72 (Forward 5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3' Navarro *et al.*, 1992) ; FGPL 132-38 (Reverse 5'-CCGGGTTTCCCATTCGG-3' Ponsonnet et Nesme, 1994). La position des amorces et la région de l'ADN étudiée (IGS) sont représentées sur la figure ci-dessous :



**Figure 4** : Schéma montrant la position des amorces utilisées 72 (amorces FGPS 1490-72) ; 38 (amorces FGPL 132-38)

Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur Gene Amp® PCR System 2400 (Perkin Elmer). La figure ci-dessous montre l'évolution de la température au cours de l'amplification.

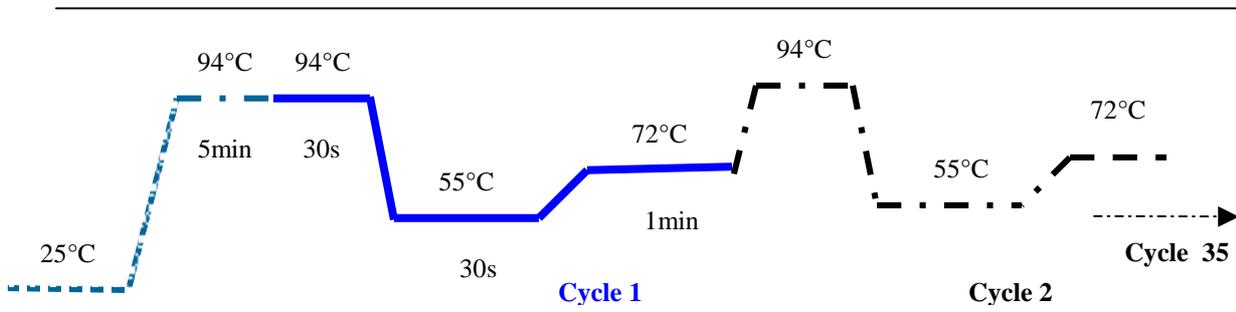


Figure 5 : Programme utilisé pour la PCR

Le programme d'amplification utilisé comprend plusieurs étapes (cf. fig. 5). La première dénaturation à 94 °C pendant 5 min est suivie d'un cycle d'amplification répété 35 fois et constitué : d'une dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, d'une hybridation des amorces à 55 °C pendant 30 secondes et d'une élongation à 72 °C pendant 1 min. Une étape à 72 °C pendant 7 min pour s'assurer que les fragments sont synthétisés au complet termine le processus de l'amplification. De cette manière, la quantité de matériel génétique obtenue est en théorie  $2^{35}$  fois plus importante que celle de départ.

#### 7.4. Contrôle du succès de l'amplification

Le succès de l'amplification a été contrôlé par électrophorèse sur gel d'agarose horizontal 1 % comme pour le contrôle de l'extrait d'ADN (cf. section 7.2.). Les échantillons ayant montré une bonne amplification ont été choisis pour être digérés avec des enzymes de restriction.

#### 7.5. Digestion des produits de l'amplification par RFLP

Suivant l'intensité des bandes obtenues par la PCR, des aliquotes de 8 à 10 µl d'amplifiât ont été digérés en utilisant les 2 enzymes *Msp* I et *Hae* III (Amersham Pharmacia Biotec) reconnaissant respectivement les sites de restriction spécifiques (5'-C/CGG-3') et (5'-GG/CC-3'). Le volume réactionnel de 20 µl présente la composition suivante : 8 à 10 µl de produit PCR, 1 µl d'enzyme de restriction (10 unités) pour 2 µl du tampon (10 X) de l'enzyme et 9 à 7 µl d'eau ultra pure stérile (QSP). Le mélange ainsi obtenu a été incubé pendant au minimum trois heures de temps dans une étuve à 37 °C. Au bout des 3 heures

d'incubation à 37 °C, la totalité du produit de digestion est mélangée avec 5 µl de bleu de charge et déposée sur gel horizontal (2,5 %) Métaphor<sup>®</sup> (FMC Bio Products, Rockland, Marine USA). La migration des fragments de restriction est réalisée suivant le protocole du contrôle de l'extrait d'ADN (section 7.2.), à une tension de 80 volts pendant 3 heures. Un marqueur de poids moléculaire 100pb a servi d'échelle moléculaire. Le gel est coloré et les profils RFLP visualisés selon le même protocole utilisé pour le contrôle de l'extrait d'ADN (section 7.2.). Les profils sont analysés visuellement et comparés aux profils obtenus à partir des souches pures. Les taux d'occupation des nodosités par les rhizobiums ont été calculés.

### **8. Isolement des souches de rhizobiums**

La collection des souches de rhizobiums contenus dans les nodosités a été réalisée après isolement et purification. A l'issue de chaque broyage de nodosité, un aliquote de 50 µl a été réservé pour cet effet. Une goutte (environ 10 µl) de ce broyat a été prélevée puis étalée sur boîtes de pétri contenant le milieu de culture YMA. Au bout d'une semaine d'incubation à 28 °C, les colonies bactériennes apparues ont été purifiées par des repiquages successifs sur milieu YMA et par des observations au microscope optique. Une colonie de chaque souche isolée et purifiée a été prélevée et mise en culture dans un milieu liquide YM. Une analyse génétique par PCR-RFLP a été réalisée pour vérifier l'identité des souches de rhizobiums. Pour chaque souche, 1,2 ml de sa culture en milieu YM a été conservé dans 600 µl de glycérol 60 % à la température de -80 °C.

### **9. Test de nodulation des souches isolées**

Le test de nodulation décrit par Gibson (1963) a été utilisé. Les graines d'arachide ont été désinfectées dans de l'eau javellisée pendant 3 min, puis dans de l'alcool absolu pendant 3 min. Plusieurs séries de lavage avec de l'eau stérile ont été effectuées après chaque traitement. Les graines ont été mises à germer pendant 72 heures à l'obscurité dans de l'eau gélosée (9 g/l) stérile. Les souches de bactéries à tester ont été parallèlement mises en culture dans un milieu liquide YM. Les graines germées ont été repiquées dans des tubes Gibson de 22 x 220 mm contenant 30 ml de milieu Jensen (cf. Annexe) stérile incliné et de l'eau distillée stérile (Vincent, 1970). L'ensemble a été placé en atmosphère confinée humide pendant 72 heures. Les racines des jeunes plants ont été inoculées par 1 ml de la culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. Des plants inoculés avec LMG 9283 ou USDA 3187 et des plants non inoculés ont servi de témoins. Les plants ont été soumis durant 45 jours à un éclairage intermittent (16 heures de lumière - 8 heures d'obscurité) en chambre de culture à une

température de 28°C. Les nodosités au niveau des racines ont été prélevées et caractérisées par PCR/RFLP appliquée à l'IGS.



**Figure 6** : Plants de *A. hypogaea* cultivés en tubes Gibson

---

# *RESULTATS*

---

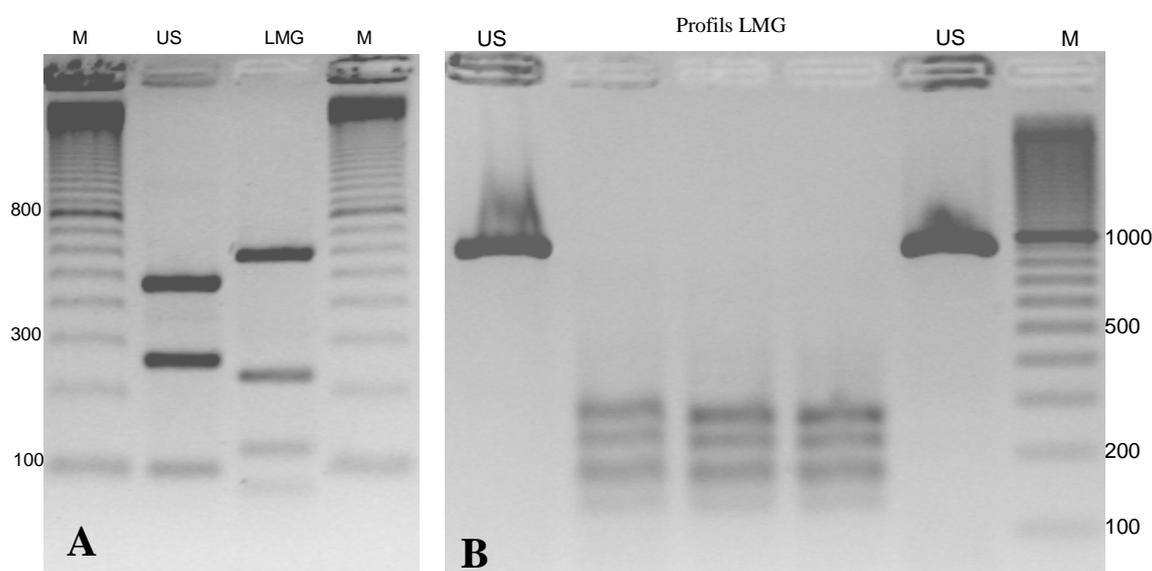
## CHAPITRE 3 : RESULTATS

### 1. Caractérisation génétique des rhizobiums

L'analyse génétique pour l'identification des rhizobiums à partir d'isolats et à partir de nodosités a été effectuée en utilisant la technique de PCR/RFLP appliquée à l'IGS 16S-23S de l'ADN ribosomal.

#### 1.1. Caractérisation des souches USDA 3187 et LMG 9283

Les profils de restriction obtenus avec les enzymes *Hae* III et *Msp* I de l'IGS des souches de *Bradyrhizobium* sp. USDA 3187 et LMG 9283 sont représentés sur la figure 8a. Ces profils sont bien distincts avec les deux enzymes de restriction. Le profil de la souche USDA 3187 avec l'enzyme *Msp* I a montré une seule bande de taille identique à la bande obtenue avec le contrôle de la PCR. Le profil de la souche LMG 9283 a présenté 4 bandes avec l'enzyme *Msp* I. Les profils obtenus avec *Hae* III ont montré 3 bandes pour la souche USDA 3187 et 4 bandes pour la souche LMG 9283.



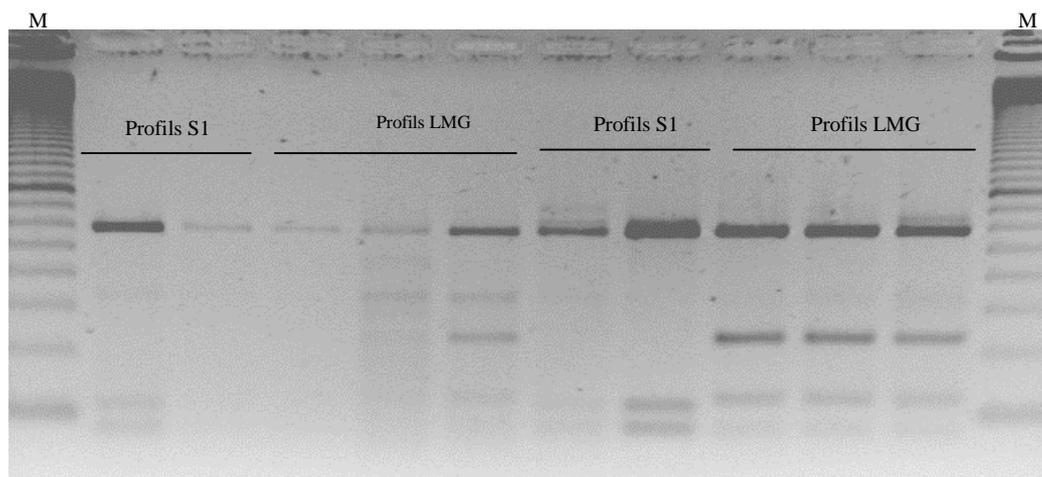
**Figure 8a** : Profils de restriction de l'IGS des souches USDA 3187 (US) et LMG 9283 (LMG) obtenus avec les enzymes *Hae* III (A) et *Msp* I (B); M = marqueur de poids moléculaire 100pb

## 1.2. Caractérisation des rhizobiums contenus dans les nodosités

Elle a été effectuée pour identifier les rhizobiums ayant formé des nodosités avec les différentes variétés d'arachide. Les résultats obtenus, traduits en pourcentage d'occupation des nodosités, ont donné les degrés de compétitivité des souches introduites par rapport aux souches indigènes. Au total 432 nodosités ont été échantillonnées pour le prélèvement effectué au bout de 30 jours de culture et analysées une à une suivant la technique de PCR/RFLP de l'IGS. Les résultats obtenus ont montré une diversité de ribotypes bactériens contenus dans les nodosités. Cette diversité était plus ou moins importante selon la variété d'arachide.

### 1.2.1. Variété 55-437

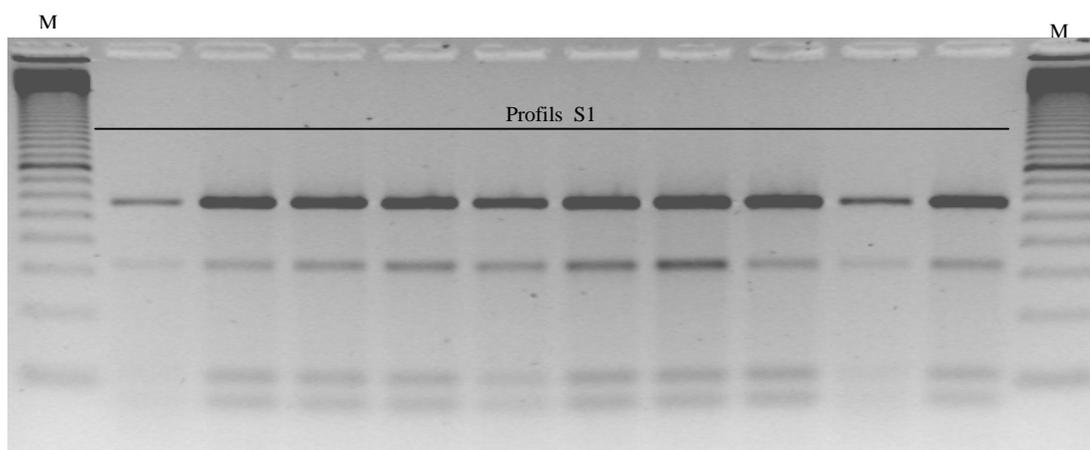
L'analyse génétique effectuée après extraction de l'ADN de nodosités récoltées de plants de la variété 55-437 a montré différents profils. La comparaison des différents profils entre eux puis avec ceux des souches USDA 3187 et LMG 9283 a donné différents groupes IGS suivant leurs similarités. Des résultats de l'analyse génétique sont consignés sur les figures 8b et 8c et dans le tableau 1a. Ces résultats ont montré pour les traitements inoculés avec des rhizobiums que le profil de la souche de *Bradyrhizobium* sp. LMG 9283 est présent dans 66,7 % et 54,2 % des nodosités analysées respectivement pour les traitements RH et RM. La souche indigène ayant le profil IGS S1 a occupé 33,3 % et 41,66 % des nodosités analysées pour les mêmes traitements. La souche correspondant au profil S5 a été rencontrée dans 4,16 % des nodosités analysées pour le traitement RM. La souche de *Bradyrhizobium* sp. USDA 3187 n'a été rencontrée dans aucun des traitements effectués sur la variété 55-437. Les résultats obtenus pour les plants n'ayant pas reçu l'inoculum de rhizobiums ont montré que la souche correspondant au profil S1 a été rencontrée dans 100 % des nodosités analysées pour les traitements M et E1. Elle a été aussi présente dans 91,30 % et 86,96 % des nodosités analysées respectivement pour les traitements E2 et T. La souche S5 a été présente dans les traitements E2 et T à 8,70 % et 13,04 % respectivement. Les profils correspondant aux deux souches inoculées USDA 3187 et LMG 9283 n'ont pas été rencontrés dans les plants non inoculés avec des rhizobiums.



**Figure 8b** : Profils *Hae* III d'extraits d'ADN de nodosités de plants de la variété 55-437 inoculés avec des rhizobiums

**Tableau 1a** : Taux de présence des souches introduites et des souches natives dans les nodosités analysées

Traitements	Profils IGS en %			
	USDA 3187	LMG 9283	S1	S5
Rhizobiums (RH)	0	<b>66,7</b>	33,3	
Rhizobiums+Mycorhizes (RM)	0	<b>54,18</b>	41,66	4,16
Mycorhizes (M)			<b>100</b>	
Engrais 1 (E1)			<b>100</b>	
Engrais 2 (E2)			<b>91,30</b>	8,70
Témoin (T)			<b>86,96</b>	13,04

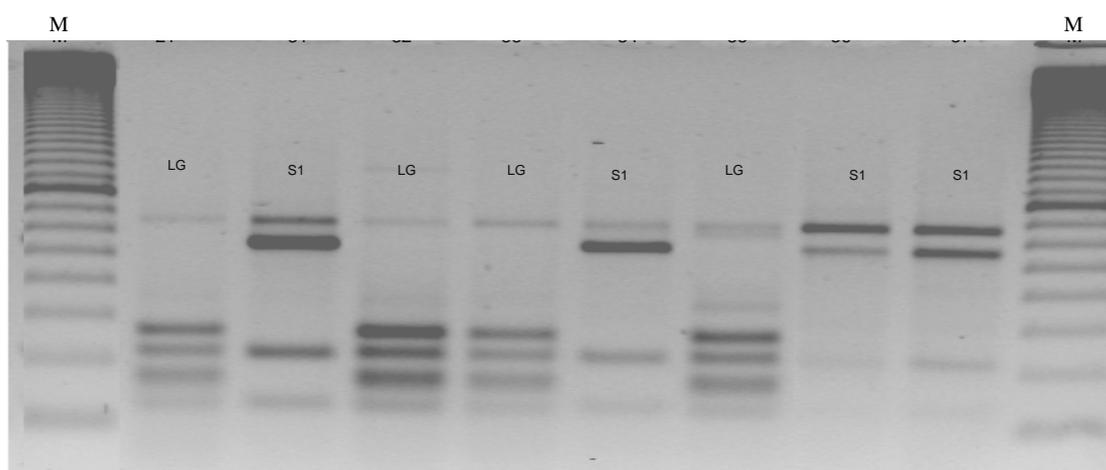


**Figure 8c** : Profils *Hae* III d'extraits d'ADN de nodosités de plants de la variété 55-437 non inoculés avec des rhizobiums

### 1.2.2. Variété 69-101

Des résultats de l'analyse et de la comparaison des profils obtenus avec la digestion des produits PCR des extraits d'ADN de nodosités sont consignés sur les figures 8d, 8e et 8f et dans le tableau 1c. Ces résultats ont montré que le profil de la souche LMG 9283 a été présent dans 41,70 % et 52,20 % des nodosités analysées respectivement pour les traitements RH et RM. Le profil S1 a été rencontré dans les nodosités à des pourcentages de 45,80 % pour RH et 47,80 % pour RM. Le profil S5 a été présent dans 12,5 % des nodosités du traitement RH. Le profil de la souche USDA 3187 n'a pas été rencontré.

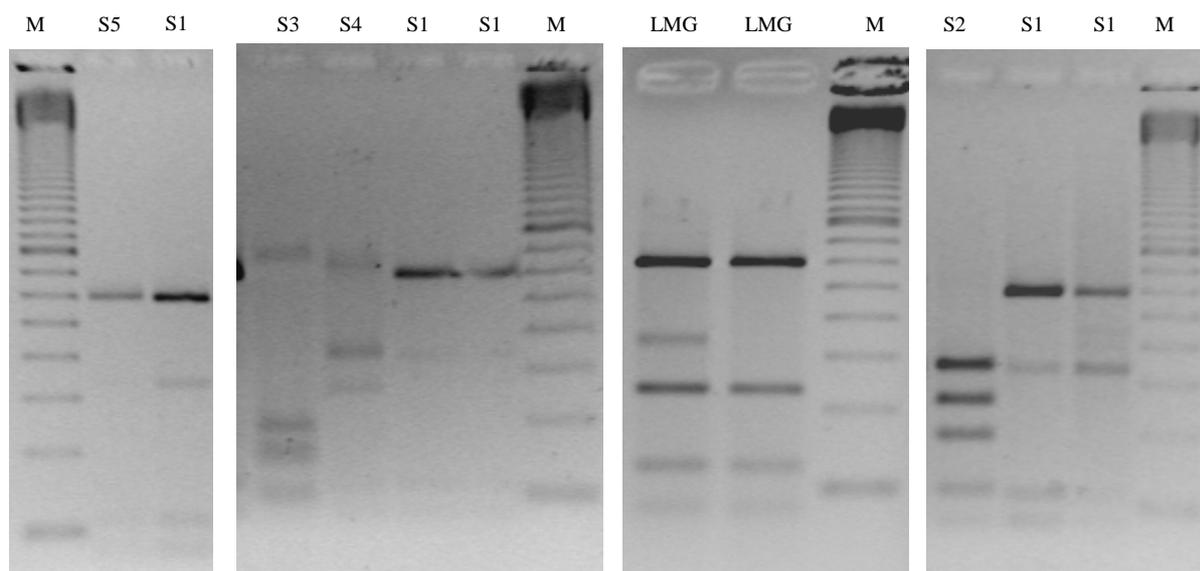
Pour les plants non inoculés avec des rhizobiums, la comparaison des profils obtenus a montré que le profil S1 a été présent dans 86,30 %, 86,66 %, 70 % et 86,67 % des nodosités analysées respectivement pour les traitements M, E1, E2 et T. Les autres profils obtenus (S2, S3, S4 et S5) ont été représentés à de faibles taux d'occupation des nodosités (qui varient de 4,60 à 13,33 %). Les profils correspondant aux souches USDA 3187 et LMG 9283 n'ont pas été rencontrés.



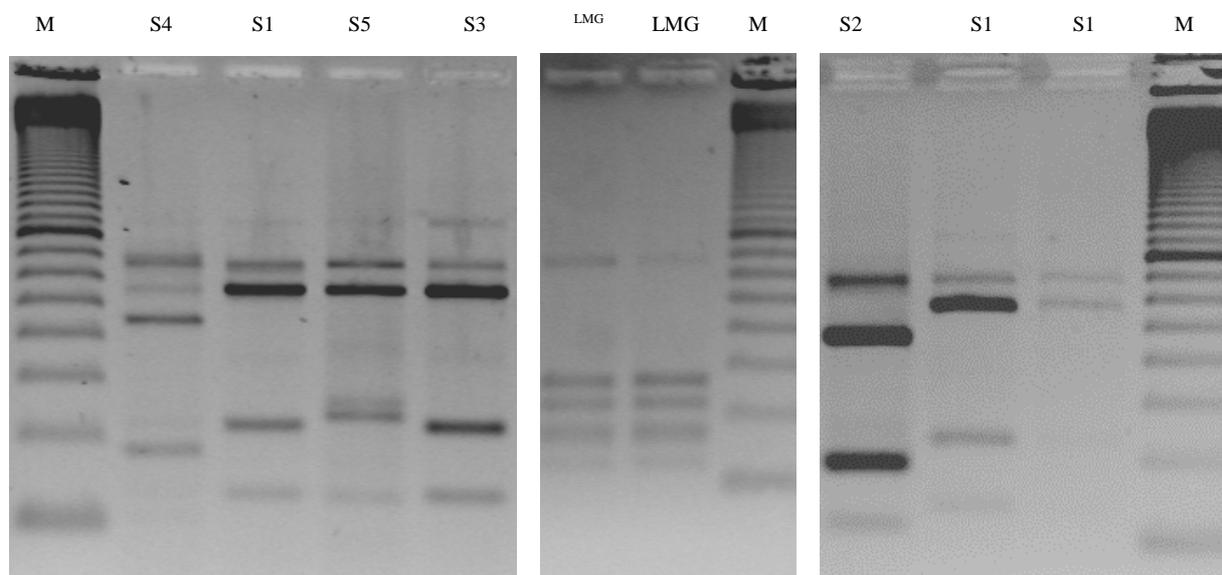
**Figure 8d** : Profils *Msp* I d'extraits d'ADN de nodosités de plants de la variété 69-101 inoculés avec des rhizobiums

**Tableau 1b** : Taux de présence des souches introduites et des souches natives dans les nodosités analysées

Traitements	Profils IGS en %						
	USDA 3187	LMG 9283	S1	S2	S3	S4	S5
Rhizobiums (RH)	0	41,7	<b>45,80</b>				12,5
Rhizobiums+mycorhizes (RM)	0	<b>52,2</b>	47,8				
Mycorhizes (M)			<b>86,3</b>	4,6			9,1
Engrais 1 (E1)			<b>86,66</b>		6,67		6,67
Engrais 2 (E2)			<b>70</b>		10	10	10
Témoin (T)			<b>86,67</b>				13,33



**Figure 8e** : Profils de restriction avec l'enzyme *Hae* III de l'IGS des représentants de groupes de souches rencontrés

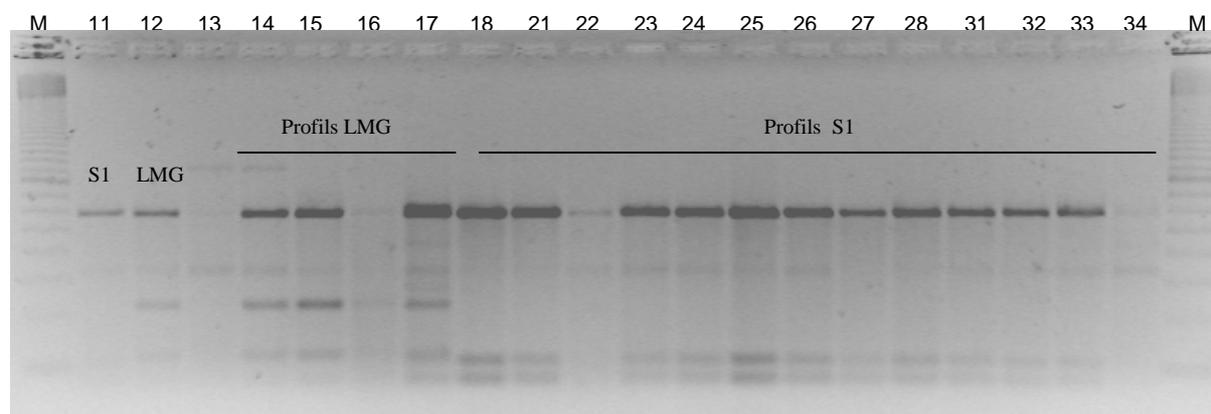


**Figure 8f** : Profils de restriction avec l'enzyme *Msp* I de l'IGS des représentants de groupes de souches identifiés

### 1.2.3. Variété fleur 11

Des nodosités récoltées de plants de la variété Fleur 11 puis analysées par PCR/RFLP après extraction de leur ADN ont donné différents profils (figure 8g et 8h). La comparaison des profils avec ceux des souches USDA 3187 et LMG 9283 a permis de définir différents groupes IGS. Les résultats ont montré pour les plants ayant reçu l'inoculum de rhizobiums que la souche correspondant au profil S1 a occupé 70,8 % et 66,64 % des nodosités analysées respectivement pour les traitements RH et RM. La souche LMG 9283 a été rencontrée à des pourcentages de 25 % pour RH et 29,20 % pour RM. Les profils des souches S2 et S5 ont été présents dans 4,20 % et 4,16 % respectivement. Le profil de la souche USDA 3187 n'a pas été retrouvé (tableau 1c).

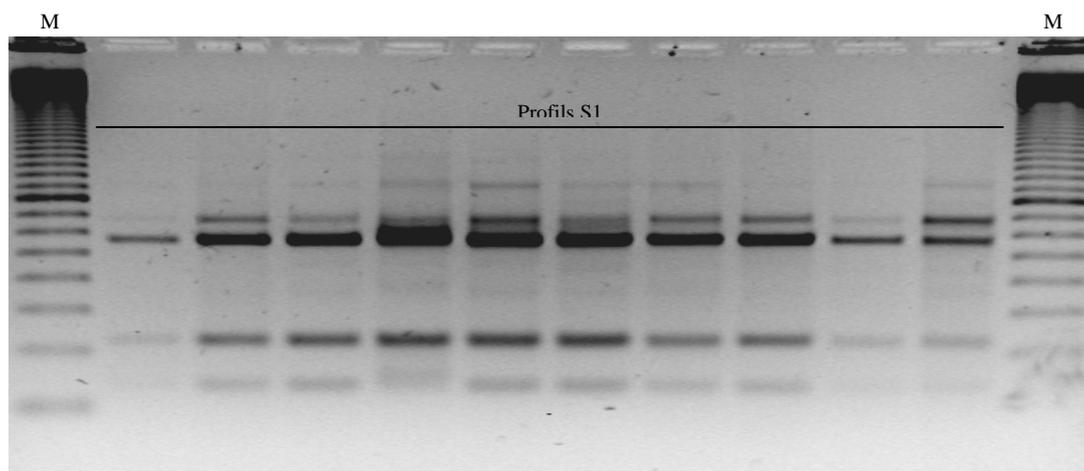
Les résultats obtenus avec les plants non inoculés avec des rhizobiums ont montré des profils tous identiques à celui de S1 pour les traitements M et E1. Le profil de cette souche a été présent dans 81,25 % et 87,50 % des nodosités analysées pour les traitements E2 et T respectivement. Le profil S5 a été retrouvé à des pourcentages de 18,75 % pour E2 et 12,5 % pour T. Les profils des souches USDA 3187 et LMG 9283 n'ont pas été rencontrés chez les plants non inoculés avec des rhizobiums.



**Figure 8g** : Profils *Hae* III (puits 11 à 34) d'extraits d'ADN de nodosités de plants de la variété Fleur 11 inoculés avec des rhizobiums

**Tableau 1c** : Taux de présence des souches introduites et des souches natives dans les nodosités analysées

Traitements	Profils IGS en %				
	USDA 3187	LMG 9283	S1	S2	S5
Rhizobiums (RH)	0	25	<b>70,8</b>	4,2	
Rhizobiums+mycorrhizes (RM)	0	29,2	<b>66,64</b>		4,16
Mycorrhizes (M)			<b>100</b>		
Engrais 1 (E1)			<b>100</b>		
Engrais 2 (E2)			<b>81,25</b>		18,75
Témoin (T)			<b>87,5</b>		12,5



**Figure 8h** : Profils *Msp* I d'extraits d'ADN de nodosités de plants de la variété Fleur 11 non inoculés avec des rhizobiums

#### 1.2.4. Suivi de la persistance des souches inoculées

Le suivi de la persistance dans le temps de la souche de rhizobium LMG 9283 n'a pas donné de résultats satisfaisants. Nous n'avons pas réussi à amplifier les extraits d'ADN de nodosités échantillonnés à 45 et 60 jours après semis.

## 2. Tests de nodulation des souches de rhizobiums

Nous avons étudié la capacité de nodulation des isolats correspondants aux différents types de profils RFLP obtenus en réalisant un test de nodulation sur *Arachis hypogaea*. Toutes les souches (USDA 3187, LMG 9283, S1, S3 et S4) testées dans les conditions *in vitro* ont induit la formation de nodosités sur des plants de *A. hypogaea*. Aucune nodosité n'a été retrouvée sur les plants témoins non inoculés de *A. hypogaea*. Les plants inoculés ont présenté une coloration verte plus prononcée et un aspect plus vigoureux par rapport aux plants témoins non inoculés. Les souches S2 et S5 n'ont pas été isolées.

## 3. Effet de l'inoculation avec des rhizobiums et des mycorhizes sur la nodulation, la croissance et le rendement des variétés d'arachide 55-437, 69-101 et Fleur 11

### 3.1. Effet de l'inoculation sur la nodulation

Le nombre de nodosités est le paramètre que nous avons mesuré pour apprécier l'effet de l'inoculation sur la nodulation des plants. Les résultats obtenus au cours des trois prélèvements effectués sont consignés dans les tableaux 2 (a, b et c).

- **Effet de l'inoculation 30 jours après semis**

Les résultats obtenus sur la nodulation des plants au bout de 30 jours de culture sont consignés dans le tableau 2a. L'analyse a montré pour la variété 55-437 que la double inoculation (74 nodosités en moyenne) de même que l'inoculation avec le champignon seul (58 nodosités en moyenne) ont augmenté de manière significative le nombre de nodosités par rapport au témoin absolu (20 nodosités en moyenne). En revanche, une baisse du nombre de nodosités par rapport au témoin absolu a été notée dans le traitement RH (7 nodosités en moyenne). L'apport d'engrais à la dose de 300 kg/ha a également provoqué une baisse significative (15 nodosités en moyenne) comparé au traitement fertilisé à la dose de 150 kg/ha (65 nodosités en moyenne).

Chez la variété 69-101, le nombre de nodosités obtenues dans les traitements RH, M et RM avec en moyenne respectivement 139 nodosités, 153 nodosités et 201 nodosités, a été statistiquement supérieur à celui obtenu dans le témoin absolu (50 nodosités en moyenne). Quelle que soit la dose utilisée, les plants fertilisés ont formé un nombre réduit avec en moyennes 15 nodosités pour le traitement E1 et 4 nodosités pour le traitement E2 (tableau 2a).

Pour la variété Fleur 11, les résultats de l'analyse statistique ont montré une amélioration significative du nombre de nodosités dans le traitement RH (130 nodosités en moyenne) par rapport au témoin absolu (71 nodosités en moyenne). Cependant, nous n'avons pas noté de différence significative dans les traitements M, RM, E1 et E2 avec respectivement 97 nodosités, 64 nodosités, 72 nodosités et 30 nodosités (tableau 2a).

**Tableau 2a** : Effet de l'inoculation sur le nombre de nodosités obtenues 30 jours après semis

Traitements	Variétés		
	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	7,5 b	<b>139 b</b>	<b>130,75 a</b>
Mycorhizes (M)	<b>58,75 a</b>	<b>153,25 ab</b>	97,5 ab
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	<b>74,75 a</b>	<b>201,5 a</b>	64,5 bc
Engrais 1 (E1)	<b>65,75 a</b>	15,75 c	72 bc
Engrais 2 (E2)	15 b	4,5 c	30,75 c
Témoin (T)	20,75 b	50 c	71,75 bc

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

- **Effet de l'inoculation 45 jours après semis**

Les résultats de l'analyse statistique ont montré chez la variété 55-437 qu'à 45 jours après semis, seul le traitement RM a induit une augmentation significative du nombre de nodosités. Ce nombre est passé de 66 nodosités en moyenne dans le témoin absolu à 215

nodosités pour le traitement RM (tableau 2b). Une variation significative n'a pas été notée entre le traitement RM et le traitement E1 qui a induit la formation de 206 nodosités en moyenne.

Pour les traitements effectués sur la variété 69-101, une variation significative sur le nombre de nodosités n'a pas été notée. Nous avons obtenu en moyenne 193 nodosités pour le traitement RH, 299 nodosités pour le traitement M, 277 nodosités pour le traitement RM et 213 nodosités pour le témoin absolu (tableau 2b). Cependant, une baisse significative par rapport aux traitements RM et M a été notée dans les traitements E1 et E2 avec en moyenne respectivement 113 nodosités et 61 nodosités formées (tableau 2b).

Chez la variété Fleur 11, une amélioration significative du nombre de nodosités par rapport au témoin absolu (92 nodosités en moyenne) n'a été observée que dans le traitement E1 qui a induit la formation de 266 nodosités en moyenne (tableau 2b). Les valeurs les plus faibles ont été notées dans le traitement M avec une moyenne d'environ 71 nodosités.

**Tableau 2b** : Effet de l'inoculation sur le nombre de nodosités obtenues 45 jours après semis  
Variétés

Traitements	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	62,75 c	193,5 abc	168,5 abc
Mycorhizes (M)	128,5 abc	299 a	71,75 c
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	<b>215 a</b>	277,75 a	140,5 bc
Engrais 1 (E1)	206,5 ab	113,75 bc	<b>266,5 a</b>
Engrais 2 (E2)	95,75 abc	61,5 c	203,75 ab
Témoin (T)	66 bc	213,5 ab	92,75 bc

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

- **Effet de l'inoculation 60 jours après semis**

Les résultats obtenus pour le prélèvement effectué 60 jours après semis sont présentés dans le tableau 2c. Ces résultats ont montré pour la variété 55-437 que le nombre de nodosités obtenues dans le témoin absolu (25 nodosités en moyenne) a été multiplié par un facteur 3 dans le traitement RH, 4 dans le traitement RM et 5 dans le traitement M.

Chez la variété 69-101, les traitements RH, M et RM ont induit une amélioration sur le nombre de nodosités obtenues (tableau 2c). L'analyse statistique a montré que cette amélioration est significative chez les plants du traitement RM qui ont formé en moyenne 350 nodosités soit environ le double comparé aux plants du témoin absolu (187 nodosités).

Pour la variété Fleur 11, le nombre de nodosités obtenues n'a été amélioré de façon significative par rapport au témoin absolu (194 nodosités en moyenne) que dans le traitement

E1 avec en moyenne 351 nodosités formées (tableau 2c). La valeur la plus faible a été notée dans le traitement RM avec en moyenne 95 nodosités formées.

**Tableau 2c : Effet de l'inoculation sur le nombre de nodosités obtenues 60 jours après semis**

Traitements	Variétés		
	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	<b>87,75 b</b>	297,5 ab	141 b
Mycorhizes (M)	<b>148,75 a</b>	231 bc	156,75 b
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	<b>100,75 ab</b>	<b>350 a</b>	95 b
Engrais 1 (E1)	58,75 bc	28,75 cd	<b>351 a</b>
Engrais 2 (E2)	<b>84,75 b</b>	13,5 d	150,5 b
Témoin (T)	25,5 c	187,5 bc	194 b

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

### 3.2. Effet de l'inoculation sur la croissance

Les paramètres de croissance que nous avons mesurés sont le poids sec des parties aériennes et le poids sec des racines. Les résultats obtenus avec l'analyse statistique sont présentés dans les tableaux (3a, 3b, 3c, 4a, 4b et 4c).

#### 3.2.1. Effet de l'inoculation sur la biomasse aérienne

- **Effet de l'inoculation 30 jours après semis**

Les résultats de l'analyse statistique ont montré chez la variété 55-437, que l'apport d'engrais à la dose de 150 kg/ha a induit une amélioration significative sur le poids sec des parties aériennes (PSPA) avec une production moyenne de 4,05 g par rapport au témoin absolu qui a donné 1,55 g en moyenne. En revanche, les traitements RH, M et RM qui ont produit respectivement 1,43 g, 2,59 g et 2,83 g en moyennes, n'ont pas présenté de différence significative par rapport au témoin absolu (tableau 3a).

Chez la variété 69-101, seuls les traitements M et RM avec respectivement des productions moyennes de 6,4 g et 5,05 g ont statistiquement amélioré le PSPA par rapport au témoin absolu qui a produit 2,35 g en moyenne et à l'apport d'engrais qui a donné en moyennes 1,96 g pour le traitement E1 et 0,92 g pour le traitement E2 (tableau 3a).

En ce qui concerne la variété Fleur 11, nous avons noté une amélioration significative sur le PSPA avec les traitements RH et E1 qui ont produit respectivement des moyennes de 6,59 g et 6,31 g par rapport au témoin absolu qui a donné de 3,04 g en moyenne. En revanche, une

amélioration du PSPA par rapport au témoin absolu n'a pas été notée dans les traitements M, RM et E2 qui ont donné en moyennes respectivement 3,94 g, 2,65 g et 3,79 g (tableau 3a).

**Tableau 3a** : Effet de l'inoculation sur le poids sec des parties aériennes (g) 30 jours après semis

Traitements	Variétés		
	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	1,43 b	3,53 bc	<b>6,59 a</b>
Mycorhizes (M)	2,59 b	<b>5,05 ab</b>	3,94 bc
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	2,83 b	<b>6,40 a</b>	2,65 c
Engrais 1 (E1)	<b>4,05 a</b>	1,96 cd	<b>6,31 ab</b>
Engrais 2 (E2)	2,32 b	0,92 d	3,79 bc
Témoin (T)	1,55 b	2,35 cd	3,04 c

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

- **Effet de l'inoculation 45 jours après semis**

Les résultats obtenus avec la variété 55-437 au bout de 45 jours de culture ont montré que les traitements M, RM, E1 et E2 qui ont produit respectivement des moyennes de 7,81 g, 7,2 g, 7,4 g et 6,2 g, ont amélioré le PSPA par rapport au témoin absolu qui a donné 4,16 g en moyenne (tableau 3b). L'analyse statistique a cependant montré que ces améliorations ne sont pas significatives.

Chez la variété 69-101, le traitement RM avec une production moyenne de 15,18 g, est le seul à induire une augmentation significative sur le PSPA par rapport au témoin absolu qui a donné 7,1 g en moyenne. Ce résultat obtenu avec le traitement RM, est statistiquement supérieur à celui fourni par l'apport d'engrais, soit en moyennes 8,72 g pour le traitement E1 et 3,51 g pour le traitement E2 (tableau 3b).

Par rapport à la variété Fleur 11, les améliorations notées sur le PSPA dans les traitements RH, E1 et E2 avec respectivement des moyennes de 12,39 g, 10,23 g et 11,03 g, ne sont pas significatives par rapport au témoin absolu qui a produit 9,39 g en moyenne.

**Tableau 3b** : Effet de l'inoculation sur le poids sec des parties aériennes (g) 45 jours après semis

Traitements	Variétés		
	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	4,23 a	7,35 bc	12,39 ab
Mycorhizes (M)	7,81 a	10,64 ab	6,67 ab
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	7,25 a	<b>15,18 a</b>	4,91 b
Engrais 1 (E1)	7,47 a	8,72 b	10,23 ab
Engrais 2 (E2)	6,20 a	3,51 c	11,03 ab
Témoin (T)	4,16 a	7,10 bc	9,39 ab

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

- **Effet de l'inoculation 60 jours après semis**

Chez la variété 55-437, l'analyse statistique a montré que les traitements RH, M et RM ont augmenté de manière significative le PSPA avec respectivement des productions moyennes de 7,86 g, 8,31 g et 7,82 g par rapport au témoin absolu qui a donné 4,71 g (tableau 3c). Ces résultats obtenus dans les traitements inoculés sont d'ailleurs comparables à ceux fournis par l'apport d'engrais avec comme productions moyennes 8,56 g pour le traitement E1 et 8,2 g pour le traitement E2.

En ce qui concerne la variété 69-101, le PSPA a été amélioré dans les traitements RH, M et RM avec respectivement des productions moyennes de 17,55 g, 14,8 g et 21,22 g par rapport au témoin absolu qui a donné 11,98 g en moyenne. Toutefois, l'analyse statistique a montré que ces améliorations n'ont été significatives que pour le traitement RM (tableau 3c). Par rapport aux plants ayant reçu une fertilisation, nous avons noté une baisse du PSPA avec respectivement des productions moyennes de 8,8 g pour le traitement E1 et 6,65 g pour le traitement E2.

Pour la variété Fleur 11, aucune différence significative n'a été notée dans les traitements RH, M et RM avec respectivement des productions moyennes de 12,5 g, 8,38 g et 8,17 g par rapport au témoin absolu qui a produit 9,5 g en moyenne. En revanche, l'apport d'engrais à la dose de 150 kg/ha a augmenté de manière significative le PSPA avec comme production moyenne 17,53 g (tableau 3c).

**Tableau 3c** : Effet de l'inoculation sur le poids sec des parties aériennes (g) 60 jours après semis

Traitements	Variétés		
	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	<b>7,86 a</b>	17,55 ab	12,50 b
Mycorhizes (M)	<b>8,31 a</b>	14,80 abc	8,38 b
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	<b>7,82 a</b>	<b>21,22 a</b>	8,17 b
Engrais 1 (E1)	<b>8,56 a</b>	8,80 cd	<b>17,53 a</b>
Engrais 2 (E2)	<b>8,20 a</b>	6,56 d	13,9 ab
Témoin (T)	4,71 b	11,98 bcd	9,50 b

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

### 3.2.2. Effet de l'inoculation sur la Biomasse racinaire

- **Effet de l'inoculation 30 jours après semis**

À l'exception du traitement E1 (0,23 g en moyenne) les résultats de l'analyse statistique chez la variété 55-437 n'ont pas présenté de variation significative du poids sec des racines (PSR) pour le prélèvement effectué après 30 jours de culture (tableau 4a).

Chez la variété 69-101, des améliorations significatives sur le PSR ont été notées dans les traitements RH, M et RM avec respectivement des moyennes de 0,23 g, 0,31 g et 0,30 g par rapport au témoin absolu qui a donné 0,16 g en moyenne et aux témoins fertilisés qui ont donné 0,13 g en moyenne pour le traitement E1 et 0,16 g pour le traitement E2 (tableau 4a). Pour la variété Fleur 11 les traitements RH et E1 sont les seuls à présenter une amélioration significative du PSR avec respectivement des moyennes de 0,28 g et 0,31 g par rapport au témoin absolu qui a donné 0,19 g en moyenne (tableau 4a).

**Tableau 4a** : Effet de l'inoculation sur le poids sec des racines (g) 30 jours après semis

Traitements	Variétés		
	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	0,12 c	<b>0,23 b</b>	<b>0,28 a</b>
Mycorhizes (M)	0,16 abc	<b>0,31 a</b>	0,25 ab
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	0,18 abc	<b>0,30 a</b>	0,18 b
Engrais 1 (E1)	<b>0,23 a</b>	0,15 c	<b>0,31 a</b>
Engrais 2 (E2)	0,19 ab	0,13 c	0,23 ab
Témoin (T)	0,13 bc	0,16 c	0,19 b

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

- **Effet de l'inoculation 45 jours après semis**

Dans les traitements effectués sur la variété 55-437, aucune variation significative du poids sec des racines n'a été observée par rapport au témoin absolu (0,24 g en moyenne) (tableau 4b).

En ce qui concerne la variété 69-101 le traitement RM avec une moyenne de 0,61 g a présenté une amélioration significative du PSR comparé aux autres traitements (tableau 4b). La valeur la plus faible a été notée dans le traitement E1 avec 0,25 g en moyenne.

Pour la variété Fleur 11, le traitement E1 a été le seul à montrer une augmentation significative du PSR avec une moyenne de 0,66 g par rapport au témoin absolu qui a donné en moyenne 0,31 g. Les résultats les plus faibles ont été notés avec les traitements M et RM avec respectivement 0,27 g et 0,35 g en moyennes (tableau 4b).

**Tableau 4b** : Effet de l'inoculation sur le poids sec des racines (g) 45 jours après semis

Traitements	Variétés		
	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	0,19 b	0,44 ab	0,54 ab
Mycorhizes (M)	0,36 a	0,51 ab	0,27 b
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	0,40 a	<b>0,61 a</b>	0,35 b
Engrais 1 (E1)	0,37 a	0,25 d	<b>0,66 a</b>
Engrais 2 (E2)	0,31 ab	0,32 cd	0,45 ab
Témoin (T)	0,24 ab	0,38 bc	0,31 b

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

- **Effet de l'inoculation 60 jours après semis**

Chez la variété 55-437, les résultats de l'analyse statistique ont montré une amélioration du PSR dans les traitements RH et RM qui ont produit en moyennes respectivement 0,36 g et 0,35 g par rapport au témoin absolu qui a donné 0,26 g en moyenne. Les résultats obtenus dans les traitements inoculés (RH, M et RM) n'ont pas été statistiquement différents de ceux fournis par la fertilisation avec en moyennes 0,39 g pour le traitement E1 et 0,35 g pour le traitement E2 (tableau 4c).

Pour la variété 69-101, une amélioration significative du PSR a été notée avec le traitement RM (0,8 g en moyenne) par rapport au témoin absolu qui a donné 0,55 g en moyenne et à l'apport d'engrais qui a produit en moyennes 0,33 g pour le traitement E1 et 0,34 g pour le traitement E2 (tableau 4c).

Chez la variété Fleur 11, les traitements fertilisés (E1 et E2) sont les seuls à augmenter de manière significative le PSR avec respectivement 0,86 g et 0,7 g en moyennes par rapport aux traitements M, RM et T qui ont produit en moyennes respectivement 0,39 g et 0,33 g et 0,33 g (tableau 4c).

**Tableau 4c** : Effet de l'inoculation sur le poids sec des racines (g) 60 jours après semis

Traitements	Variétés		
	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	<b>0,36 a</b>	0,62 ab	0,56 ab
Mycorhizes (M)	0,34 ab	0,54 bc	0,39 b
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	<b>0,35 a</b>	<b>0,80 a</b>	0,33 b
Engrais 1 (E1)	<b>0,39 a</b>	0,33 c	<b>0,86 a</b>
Engrais 2 (E2)	<b>0,35 a</b>	0,34 c	<b>0,7 a</b>
Témoin (T)	0,26 b	0,55 bc	0,33 b

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

### 3.3. Effet de l'inoculation sur le rendement en gousses

Le nombre et le poids sec des gousses sont les paramètres que nous avons mesurés pour apprécier le rendement des plants d'arachide cultivés en station. Les résultats obtenus avec l'analyse statistique sont présentés dans les tableaux (5a, 5b, 6a et 6b).

#### 3.3.1. Effet de l'inoculation sur le nombre de gousses

Aucune des trois variétés d'arachide utilisées n'a formé de gousse au prélèvement effectué 30 jours après semis.

• **Effet de l'inoculation 45 jours après semis**

Les résultats obtenus sur le nombre de gousses sont consignés sur les tableaux (5a et 5b). L'analyse statistique a montré pour la variété 55-437 que les traitements RH, M et RM ont amélioré le nombre de gousses obtenues avec respectivement des moyennes d'environ 2 gousses, 5 gousses et 9 gousses par rapport au témoin absolu qui a donné en moyenne 1 gousse environ (tableau 5a). Ces améliorations ne sont cependant significatives que pour le traitement RM. Toutefois, une différence significative n'a pas été notée entre les traitements inoculés (RH, M et RM) et l'apport d'engrais qui a produit environ 4 gousses en moyenne pour le traitement E1 et 2 gousses en moyenne pour le traitement E2.

Les résultats de l'analyse statistique ont montré chez la variété Fleur 11 que le nombre de gousse n'a été amélioré de manière significative par rapport au témoin absolu (6 gousses en moyenne) que dans les traitements E1 et E2 qui ont formé respectivement 13 et 11 gousses en moyennes (tableau 5a).

**Tableau 5a** : Effet de l'inoculation sur le nombre de gousses obtenues 45 jours après semis

Traitements	Variétés		
	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	2,5 b	0,0 b	8,5 ab
Mycorhizes (M)	5,5 ab	<b>0,75 a</b>	5 bc
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	<b>9 a</b>	0,0 b	0,0 c
Engrais 1 (E1)	4,75 ab	0,0 b	<b>13 a</b>
Engrais 2 (E2)	2,75 ab	0,0 b	<b>11,75 a</b>
Témoin (T)	1,75 b	0,0 b	6 bc

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

• **Effet de l'inoculation 60 jours après semis**

Les résultats de l'analyse statistique ont montré chez la variété 55-437, que le nombre de gousses est significativement amélioré dans les traitements RH, M et RM avec respectivement des moyennes de 8 gousses, 13 gousses et 9 gousses environ par rapport au témoin absolu qui a donné 3 gousses (tableau 5b). Une différence significative n'a pas été notée entre les traitements inoculés (RH, M et RM) et l'apport d'engrais qui a donné en moyenne 7 gousses pour le traitement E1 et environ 10 gousses en moyenne pour le traitement E2 (tableau 5b).

En ce qui concerne la variété 69-101, nous n'avons pas noté de différence significative sur le nombre de gousses formées dans les traitements inoculés (avec des moyennes d'environ 6 gousses pour le traitement RH, 7 gousses pour le traitement M et 5 gousses pour le traitement

RM) par rapport au témoin absolu qui a produit 6 gousses en moyenne (tableau 5b). Les plants ayant reçu une fertilisation avec l'engrais chimique NPK (E1 et E2) n'ont pas formé de gousses.

Chez la variété Fleur 11, les résultats de l'analyse statistique ont montré que le traitement E1 (environ 16 gousses en moyenne) a présenté une augmentation significative du nombre de gousses par rapport au témoin absolu (7 gousses en moyenne) et par rapport aux traitements RH, M et RM qui ont donné respectivement des moyennes de 9 gousses, 6 gousses et 6 gousses (tableau 5b).

**Tableau 5b** : Effet de l'inoculation sur le nombre de gousses obtenues 60 jours après semis

Traitements	Variétés		
	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	<b>8,5 b</b>	6,5 a	9 bc
Mycorhizes (M)	<b>13 a</b>	7,75 a	6,75 c
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	<b>9,75 ab</b>	6 a	6,5 c
Engrais 1 (E1)	<b>7 b</b>	0,0 b	<b>16,75 a</b>
Engrais 2 (E2)	<b>10,75 ab</b>	0,0 b	12 ab
Témoin (T)	3 c	5,25 a	7,75 bc

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

### 3.3.2. Effet de l'inoculation sur les poids sec des gousses

- **Effet de l'inoculation 45 jours après semis**

Au bout de 45 jours de culture, les résultats de l'analyse statistique ont montré avec la variété 55-437 que le traitement RM avec une production moyenne de 1,21 g a amélioré de manière significative le poids sec des gousses par rapport au témoin absolu qui a produit 0,11 g en moyenne (tableau 6a). Des améliorations par rapport au témoin absolu ont aussi été notées dans les traitements RH et M (0,42 g et 0,9 g respectivement), mais n'ont pas été significatives. Ces résultats obtenus avec les traitements inoculés sont statistiquement comparables à ceux fournis par l'apport d'engrais à la dose de 150 kg/ha qui a donné 0,55 g en moyenne.

Pour la variété Fleur 11, aucune variation significative n'a été notée entre les différents traitements au prélèvement effectué 45 jours après semis. Cependant, des améliorations par rapport au témoin absolu (2,44 g en moyenne) ont été observées dans les traitements E1, E2 et RH avec respectivement des productions moyennes de 5,31 g, 4,21 g et 3,03 g. Les résultats les plus faibles ont été notés dans les traitements M et RM avec 0,86 g en moyenne pour le traitement M et aucune gousse formée pour le traitement RM.

**Tableau 6a** : Effet de l'inoculation sur le poids sec des gousses (g) obtenues 45 jours après semis

Traitements	Variétés		
	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	0,42 ab	0,0 b	3,03 abc
Mycorhizes (M)	0,9 ab	<b>0,13 a</b>	0,86 bc
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	<b>1,21 a</b>	0,0 b	0,0 c
Engrais 1 (E1)	0,55 ab	0,0 b	5,31 a
Engrais 2 (E2)	0,24 b	0,0 b	4,21 ab
Témoin (T)	0,15 b	0,0 b	2,44 abc

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

• **Effet de l'inoculation 60 jours après semis**

En termes de rendement, l'analyse statistique a montré pour la variété 55-437 qu'au prélèvement effectué 60 jours après semis, les traitements RH, M et RM ont augmenté de manière significative les poids sec des gousses avec respectivement des moyennes de 2,02 g, 3,6 g et 2,1 g par rapport au témoin absolu qui a produit 0,25 g en moyenne. Ces résultats obtenus avec les traitements inoculés sont d'ailleurs comparables à ceux qui sont fournis par l'apport d'engrais soit en moyenne 2,78 g pour le traitement E1 et 2,14 g pour le traitement E2 (tableau 6b).

Pour la variété 69-101, les traitements RH, M et RM ont présenté une augmentation du poids sec des gousses avec respectivement des productions moyennes de 1,45 g, 1,58 g et 2,4 g par rapport au témoin absolu qui a donné 0,7 g en moyenne et à l'apport d'engrais qui n'a pas induit la formation de gousses. Cette augmentation par rapport au témoin absolu n'a cependant été significative qu'avec le traitement RM.

Chez la variété Fleur 11, une amélioration significative du poids sec des gousses par rapport au témoin absolu (2,57 g en moyenne) n'a été notée que dans le traitement fertilisé à la dose de 150 kg/ha avec une moyenne de 12,85 g. La fertilisation à la dose de 300 kg/ha (6,35 g en moyenne) a diminué de manière significative le poids sec des gousses par rapport à la dose de 150 kg/ha.

**Tableau 6b** : Effet de l'inoculation sur le poids sec des gousses (g) obtenu 60 jours après semis

Traitements	Variétés		
	55-437	69-101	Fleur 11
Rhizobiums (RH)	<b>2,02 a</b>	1,45 ab	3,75 bc
Mycorhizes (M)	<b>3,6 a</b>	1,58 ab	3,66 bc
Rhizobiums + Mycorhizes (RM)	<b>2,1 a</b>	<b>2,4 a</b>	1,74 c
Engrais 1 (E1)	<b>2,78 a</b>	0,0 c	<b>12,85 a</b>
Engrais 2 (E2)	<b>2,14 a</b>	0,0 c	<b>6,35 b</b>
Témoin (T)	0,25 b	0,7 bc	2,57 c

Sur une même colonne, les valeurs (moyennes de 3 répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher (à 95 %) ; Les valeurs en gras sont significativement supérieures au témoin absolu (T).

---

## *DISCUSSION*

---

## CHAPITRE IV : DISCUSSION

### Compétitivité des souches de rhizobiums

La technique de PCR/RFLP appliquée à l'espace intergénique (IGS) 16S-23S de l'ADN ribosomal permet une identification rapide et fiable des bactéries (Laguerre *et al.*, 1994). Elle est utilisée pour différencier des genres, espèces et souches de procaryotes (Harasawa *et al.*, 1993). C'est une technique qui donne toujours avec le même matériel, dans les mêmes conditions, des résultats identiques et précis (Thiao, 2005). Appliquée à l'IGS des souches USDA 3187 et LMG 9283, les résultats obtenus ont révélé des profils différents entre les deux souches, permettant ainsi de les distinguer facilement. Ainsi, nous avons porté notre choix sur cette technique pour l'évaluation de la compétitivité des bactéries ayant servi d'inoculum.

Le succès de l'inoculation dépend largement du degré de compétitivité des souches introduites face aux rhizobiums natifs (Castro *et al.*, 1999). Nous avons retrouvé dans les nodosités analysées des profils de souches indigènes correspondant à cinq groupes IGS différents. En d'autres termes, les souches de rhizobiums que nous avons apportées pour servir d'inoculum sont entrées en compétition avec cinq souches de rhizobiums natifs pour la formation des nodosités avec la plante. Un suivi de la souche USDA 3187 inoculée à des plants de *Arachis hypogaea* cultivés au champ avait précédemment été effectué par Castro *et al.* (1999). La technique sérologique et les caractéristiques intrinsèques de résistance des souches aux antibiotiques avaient révélé l'absence de la souche dans les nodosités obtenues (Castro *et al.*, 1999). L'inoculum de rhizobiums avait été apporté au moment des semis et à la levée des jeunes plants de façon à établir la supériorité en nombre des rhizobiums introduits sur les souches indigènes. La souche USDA 3187 n'a malgré tout été retrouvée dans aucun des traitements. Elle n'est donc pas compétitive dans le sol de Sangalkam. Le manque de compétitivité des rhizobiums introduits peut être liée à l'influence des facteurs biotiques tels les bactériophages (Evans *et al.*, 1979), mais aussi à l'effet des facteurs abiotiques du sol tels la température, le pH, la teneur en nitrate, etc. (Beattie *et al.*, 1989). Pour cette présente étude, un défaut d'adaptation aux caractéristiques du sol de Sangalkam (notamment les caractères physico-chimiques) expliquerait l'absence de compétitivité de la souche USDA 3187. Les autres souches bactériennes trouvées dans les nodosités ont probablement profité de ce défaut d'adaptation pour occuper les sites de nodulation de la plante.

Les bactéries symbiotiques natives possèdent en général des prédispositions d'adaptation aux caractéristiques particulières du sol (Castro *et al.*, 1999). Malgré la présence de souches natives, la souche LMG 9283 s'est maintenue le temps de former des nodosités avec les trois variétés utilisées. Elle est présente dans les nodosités à chaque fois qu'elle a été introduite dans le sol de Sangalkam à des pourcentages d'occupation qui varient de 25 % à 67 % suivant la variété utilisée. Cette variation suggère qu'il existe un effet variétal, c'est à dire une compatibilité entre les variétés utilisées et les souches de rhizobiums pour la formation des nodosités comme l'ont montré plusieurs auteurs (Nambiar, 1985 ; Ndoye *et al.*, 1991 ; Chen *et al.*, 2003). La souche LMG 9283 est parvenue à dominer les rhizobiums natifs dans l'infection et l'occupation des nodosités pour les variétés 55-437 et 69-101. Une souche peut être considérée comme très compétitive quand, comparée aux souches du milieu, elle forme plus de nodosités (Brockwell *et al.*, 1995).

En revanche pour la variété Fleur 11, la souche LMG 9283 n'a pu supplanter les rhizobiums natifs en termes de présence dans les nodosités analysées. Elle est présente au plus dans 30 % des nodosités analysées. Ce comportement ne peut être attribué aux caractéristiques du sol de Sangalkam puisque la souche a été apportée dans les mêmes conditions que dans le cas des variétés 55-437 et 69-101. Il serait plutôt lié à un effet variétal. La souche LMG 9283 présenterait une compatibilité moins marquée avec la variété Fleur 11 par rapport aux variétés 55-437 et 69-101.

La souche LMG 9283 s'est montrée plus compétitive que la souche USDA 3187 dans le sol de Sangalkam. Les deux souches ont été apportées à la plante dans les mêmes conditions et à des proportions égales. La compétitivité de la souche LMG 9283 s'expliquerait par le fait qu'elle a été isolée de plants d'arachide cultivés en pots sur un mélange de sol du bassin arachidier du Sénégal prélevés au cours de prospections nématologiques (Dreyfus, communication personnelle). Elle a été prédite comme étant la meilleure souche après criblage et ses bonnes qualités ont été confirmées dans différentes conditions de sol et de traitements chimiques (Dhery et Dreyfus, 1991).

Les souches USDA 3187 et LMG 9283 n'ont pas été détectées chez les plants non inoculés. Elles seraient naturellement absentes du sol de Sangalkam ayant servi de support de culture.

Nos résultats ont aussi montré que des souches indigènes ont formé des nodosités malgré l'application de l'inoculum bactérien. Ce sont donc des souches compétitives. La souche correspondant au profil S1 s'est montrée plus compétitive comparée aux autres

souches indigènes. Elle a été rencontrée à des pourcentages d'occupation qui varient de 70 à 100 % des nodosités analysées chez les plants non inoculés.

Le protocole d'extraction d'ADN de nodosités décrit par Krasova-Wade et Neyra (2007) a été utilisé pour ce travail. Nous l'avons trouvé moins contraignant et assez reproductible pour ce qui est des nodosités analysées au prélèvement effectué 30 jours après semis. Pour ce qui est des prélèvements à 45 et 60 jours de culture, nous avons décelé avec le contrôle des extraits d'ADN au spectrophotomètre, des inhibiteurs potentiels de la PCR (polysaccharides, protéines et poly phénols). Il semblerait que l'espèce végétale accumule ces substances en plus grande quantité au cours de son développement végétatif, rendant difficile la purification des extraits d'ADN. Cette hypothèse semble concorder avec les résultats des travaux de Sharma *et al.* (2000). Ces auteurs avaient aussi remarqué que les feuilles matures de *A. hypogaea* ont une quantité plus élevée en polyphénol, tanins et polysaccharides. Aucun parmi quatre protocoles publiés et utilisés dans leurs travaux n'a fourni d'extrait d'ADN de qualité pour faire une PCR (Sharma *et al.*, 2000).

### Effet de l'inoculation avec des rhizobiums et des mycorhizes sur la nodulation, la croissance et le rendement des variétés d'arachide 55-437, 69-101 et Fleur 11

La production de biomasse et les rendements en graines sont les premiers indicateurs de l'état nutritionnel des plantes. Ce sont des indicateurs de la disponibilité des éléments nutritifs et leur utilisation par la plante. Le nombre de nodosités est aussi un critère de prédiction de la réponse de la plante à l'inoculation. La mesure de ces paramètres nous a permis d'apprécier l'effet de l'inoculation avec les souches de rhizobiums USDA 3187 et LMG 9383 et le champignon *Glomus intraradices* chez les plants des trois variétés d'arachide 55-437, 69-101 et Fleur 11. Les résultats obtenus ont montré que la réponse de l'arachide à l'inoculation est fonction de la variété utilisée et du stade de développement végétatif de la plante. Des variations similaires ont été notées sur les rendements de plusieurs variétés d'arachide inoculées avec la souche de rhizobium NC 92 (Nambiar, 1985).

Dans le cas de la variété 55-437, nos résultats ont montré que les plants ayant reçu un mélange d'inoculum à base de cultures des souches USDA 3187 et LMG 9283 n'ont pas présenté une meilleure nodulation ou production de matière sèche au niveau des échantillons prélevés au 30<sup>ème</sup> jour et au 45<sup>ème</sup> jour après semis. En revanche, nous avons obtenu pour ces mêmes paramètres et pour le rendement en gousses des gains significativement supérieurs au témoin absolu au niveau des échantillons prélevés 60 jours après semis. Dans le cas de la

variété 69-101, une amélioration a été notée sur la nodulation au niveau des échantillons prélevés 30 jours après semis. Ces mêmes tendances ont été observées sur la biomasse des plants à 30 jours, 45 jours et 60 jours après semis. En tenant compte du fait que l'analyse génétique des extraits d'ADN de nodosités avait montré que la souche inoculée LMG 9283 était présente à des pourcentages élevés pour les deux variétés, cette souche persisterait dans les nodosités formées et serait à l'origine des gains notés. D'ailleurs, Sanginga *et al.* (1994) ont indiqué que la libération des rhizobiums par les nodosités sénescents contribue à augmenter la taille de la population de souches inoculées dans le cas où celles-ci sont responsables de la formation des nodosités et par conséquent leur compétitivité par rapport aux souches natives. Cette capacité des rhizobiums inoculés à améliorer la nodulation et la production en fanes et en gousses chez *A. hypogaea* a été notée dans plusieurs travaux antérieurs (Ndiaye, 1986 ; Dhery et Dreyfus, 1991 ; Lanier *et al.*, 2005 ; Anandham *et al.*, 2006 ; Bogino *et al.*, 2006).

L'apport de *Glomus intraradices* au traitement inoculé avec le mélange d'inoculum de rhizobium (USDA 3187 et LMG 9283) a provoqué une augmentation significative du nombre de nodosités, de la biomasse et du rendement en gousses dans l'ensemble des trois prélèvements effectués. Cela montre vraisemblablement que le déficit en certains éléments minéraux dont principalement le phosphore est un des facteurs limitant l'expression des potentialités des rhizobiums présents au stade jeune plante. D'ailleurs, les travaux de Khan et Toshiba (1994) avaient montré que le déficit en certains éléments minéraux du sol dont le phosphore, a des effets négatifs sur l'expression des capacités fixatrices de *A. hypogaea*. L'analyse génétique des extraits d'ADN de nodosités pour cette double inoculation avait montré chez ces variétés 55-437 et 69-101 que la souche LMG 9283 était dominante pour le prélèvement effectué 30 jours après semis. De ce fait, cette souche persisterait dans les nodosités formées après sénescence et formerait une synergie avec le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* comme l'ont montré plusieurs travaux effectués sur la double inoculation de légumineuses (Koide, 1991 ; Giller, 2001 ; Goss et de Varennes., 2002 ; Lesueur et Duponnois, 2005). Nos résultats corroborent ceux de Lekberg et Koide (2005) qui ont montré que l'apport de *Glomus intraradices* permet d'augmenter la nodulation de *Arachis hypogaea* avec la souche de *Bradyrhizobium sp.* MAR 1510 et ceci en améliorant vraisemblablement la nutrition en phosphore des plants. Giller (2001) a indiqué qu'une bonne nodulation et un taux élevé de fixation de N<sub>2</sub> requièrent une quantité importante en phosphore (P). Or, il est connu que les champignons endomycorhiziens peuvent par l'intermédiaire des

filaments mycéliens formés au niveau des racines augmenter le volume de sol exploré (Jakobsen *et al.*, 1992). Grâce à cette propriété, le champignon *Glomus intraradices* aurait amélioré l'approvisionnement des plants en éléments minéraux nécessaires au bon fonctionnement de la symbiose fixatrice de N<sub>2</sub>. Cette forme de synergie a aussi été notée dans les travaux de Dude et Raut (2005) qui ont montré avec la variété d'arachide JL-24 que la double inoculation permet d'obtenir des rendements en fanes et en gousses supérieurs à ceux obtenus par l'inoculation avec les rhizobiums seuls ou avec les mycorhizes seules.

La souche de rhizobium LMG 9283 et le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* qui ont induit une augmentation significative sur le nombre de nodosités, la biomasse et le rendement en gousses des plants, constitueraient de bons inoculums pour la culture des variétés 55-437 et 69-101 sur le sol de Sangalkam.

Nos observations ont aussi montré avec la variété 69-101, que l'apport d'engrais NPK 20-10-10 a présenté un effet dépressif sur la nodulation et la biomasse et a allongé le cycle végétatif de la plante. La formule utilisée serait globalement trop riche en N pour cette variété.

Dans les prélèvements effectués 30 jours après semis, nos résultats ont montré avec la variété Fleur 11 que l'apport du mélange des souches USDA 3187 et LMG 9283 augmente de manière significative la nodulation et la biomasse des plants. Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus quand les plants reçoivent un apport d'engrais à la dose de 150 kg/ha. Cependant, ces gains significatifs n'ont pas été maintenus au prélèvement effectué 60 jours après semis. En tenant compte du fait que la souche LMG 9283 a été retrouvée dans les nodosités de la variété Fleur 11 à un taux de 25 % pour le prélèvement effectué 30 jours après semis, ce taux pourrait encore diminuer avec les nodosités nouvellement formées, ce qui n'aurait pas permis de maintenir la dynamique de productivité initiale de la variété Fleur 11.

Sur la variété Fleur 11, nous n'avons pas obtenu un effet positif de l'inoculation avec le champignon seul ou avec la double inoculation. Le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* manquerait d'efficacité à former une symbiose effective avec la variété Fleur 11 dans le sol de Sangalkam. Une compétition avec des champignons endomycorhiziens indigènes qui existeraient dans le sol de Sangalkam et qui présenteraient une compatibilité avec la variété Fleur 11 pourrait être à l'origine. D'ailleurs, dans plusieurs travaux effectués en milieu naturel, l'échec de l'inoculation a été expliqué par un défaut dans la compétitivité des souches introduites (Dakora, 1985 ; Wanje, 1989 ; Castro *et al.*, 1999).

Nous avons aussi noté que la variété Fleur 11 de même que la variété 55-437 a donné avec l'apport d'engrais NPK à la dose de 150 kg/ha des gains significatifs en termes de biomasse et

de rendement en gousses. Ce gain peut être lié à l'effet « starter » de la fertilisation azotée qui peut permettre à l'arachide de gagner 8 à 10 jours sur la longueur de son cycle (INFOS CORAF. La lettre du réseau arachide–N°8- Décembre 1998). Chez les plants ayant reçu une fertilisation azotée, une amélioration de la nodulation n'a pas été observée au prélèvement effectué 30 jours après semis. Cette inhibition s'expliquerait par le fait que la fixation de  $N_2$  est une voie d'acquisition de l'azote beaucoup plus coûteuse en énergie pour la plante que l'absorption d'azote combiné (azote nitrique et ammoniacal) (Dommergues *et al.*, 1999). En revanche, chez toutes les trois variétés utilisées, nous avons observé un effet dépressif lorsque la dose d'engrais a été doublée (300 kg/ha). Ce résultat suggère que les fortes doses des engrais minéraux chimiques ne permettent pas d'obtenir une bonne productivité de l'arachide.

*Rapport-gratuit.com*   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

---

*CONCLUSION ET PERSPECTIVES*

---

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Grâce à la technique de marquage moléculaire par PCR/RFLP appliquée à l'IGS 16S-23S de l'ADNr, nous avons montré que la souche LMG 9283 est compétitive lorsqu'elle est introduite dans le sol de Sangalkam. La souche USDA 3187 n'a pas été retrouvée dans les nodosités analysées et n'est donc pas compétitive dans le sol de Sangalkam. La compétitivité de la souche LMG 9283 est plus marquée avec les variétés 55-437 et 69-101 qu'avec la variété Fleur 11. Un protocole d'extraction d'ADN de nodosités adapté à l'arachide permettrait un suivi de la dynamique de persistance de la souche LMG 9283 par rapport aux rhizobiums indigènes et par conséquent offrirait plus d'informations sur l'adaptation de la souche LMG 9283 aux conditions du sol de Sangalkam.

Cette étude a montré que l'expression des capacités des souches de rhizobiums et du champignon inoculés à accroître le nombre de nodosités, la biomasse sèche et le rendement en gousses des plants d'arachide est fonction de la variété utilisée et du stade de développement végétatif de la plante. Nous avons montré que la double inoculation avec les rhizobiums et le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* pouvait améliorer significativement le nombre de nodosités, la biomasse sèche et le rendement en gousses des variétés 55-437 et 69-101. Ces améliorations seraient liées à un effet synergique entre la souche de rhizobiums LMG 9283 et le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices*. De ce fait, il serait intéressant de pouvoir déterminer l'intensité et la fréquence de la mycorhization des plants pour avoir plus d'informations sur l'impact de *Glomus intraradices*. Nos résultats ont aussi montré que l'inoculation de la variété Fleur 11 avec *Glomus intraradices* seul ou même la double inoculation avec les rhizobiums et le champignon, ne permettait pas d'améliorer le nombre de nodosités, la biomasse sèche et le rendement en gousses des plants. Cependant nous avons obtenu des améliorations significatives de l'ensemble de ces paramètres en apportant à cette variété une fertilisation chimique NPK 20-10-10 à la dose de 150 kg/ha. La recherche d'un couple rhizobium-champignon compatible avec la variété Fleur 11 permettrait de limiter l'apport d'engrais chimique. Toutefois, les résultats obtenus dans ce travail devraient faire l'objet d'une confirmation par des expériences complémentaires en milieu paysan. Il serait également intéressant de pouvoir élargir cette étude sur un nombre plus important de variétés d'arachide cultivées au Sénégal.

---

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Allen, O.N. and Allen, E.K., 1981.** The leguminosae. Pp. 60-64. University of Wisconsin Press. ARORA, A.K., SAINI, J.S., GANDI, R.C. and SANDHU, R.S., 1970. Study of chemical composition and yield of groundnut as affected by *Rhizobium* inoculation. *Oleagineux*, **25** : 279-280.
2. **Anandham, R., Sridar, R., Nalayini, P., Poonguzhali, S., Madhaiyan, M. and Tongminsa., 2007.** Potential for plant growth promotion in groundnut (*Arachis hypogaea L.*) cv. ALR-2 by co-inoculation of sulphur-oxidizing bacteria and *Rhizobium*. *Microbiol. R.*, **162** : 139-153.
3. **Andéké-Lengui, M.A. and Dommergues, Y., 1983.** Coastal sand dune stabilization in Senegal, p.158-166. in : *Casuarina Ecology, Management and Utilization.* (Midgley S.J., Turnbull J.W., and Johnston R.D., eds). Proceedings of an International Workshop. 17-21 August 1981, Canberra, Australia.
4. **André, S., Neyra, M. and Duponnois, R., 2003.** Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Changes the Colonization Pattern of *Acacia tortilis* spp. Raddiana Rhizosphere by two Strains of Rhizobia. *Microbiol. Ecol.*, **45** : 137-144.
5. **Azpilicueta, C.E., Zawoznik, M.S. and Tomaro, M., 2004.** Phytoalexins synthesis is enhanced in groundnut plants inoculated with *Bradyrhizobium sp.* (*Arachis*). *Crop Protection*, **23** : 1069-1074.
6. **Bationo, A. and Buerkert, A., 2000.** Soil organic carbon management for sustainable land use in Sudano-Sahelian West Africa. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, **61** : 131-142.
7. **Beattie, G.A., Clayton, M.K. and Handelsman, J., 1989.** Quantitative comparison of the laboratory and field competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55** : 2755-2761.
8. **Benhinzia, Y., Benhinzia, H., Benguedouar, A., Muesu, R., Giacomini, A. and Squartini, A., 2004.** Gamma Proteobacteria Can Nodulate Legumes of the Genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **27** : 462-468.
9. **Berhaut, J., 1967.** Flore du Sénégal 2<sup>ème</sup> édition. Ed. Clairafrique, Dakar p.53.
10. **Bogino, P., Banchio, E., Rinaudi, L., Cerioni, G., Bonfiglio, C. and Giordano, W., 2006.** Peanut (*Arachis hypogaea L.*) response to inoculation with *Bradyrhizobium sp.* In soil of Argentina. *Ann. Appl. Biol.*, **148** : 207-212.
11. **Boogerd, F.C. and van Rossum, D., 1997.** Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium* : a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiol. Rev.*, **21** : 5-27.

12. **Brockwell, J., Bottomley, P.J., and Thies, J.E., 1995.** Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility : a crystal assessment. *Plant soil*, **174** : 143-180.
13. **Castro, S., Permigliani, M., Vinocur, M. and Fabra, A., 1999.** Nodulation in peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots in the presence of native and inoculated rhizobia strains. *Appl. Soil Ecol.*, **13** : 39-44.
14. **Chandler, M.R., 1978.** Some observations on infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot.*, **29** : 749-755.
15. **Chen, H. K., 1941.** The limited numbers of nodules produced in legumes by different strains of *Rhizobium*. *J. of Agric Sci.*, **31** : 479-487.
16. **Chen, Q., Zhang, X., Tereforwork, Z., Kaijalainen, S., Li, D. and Lindström, K., 2003.** Diversity and compatibility of peanut (*Arachis hypogaea* L.) bradyrhizobia and their host plants. *Plant and Soil*, **255** : 605-617.
17. **Claudel, D., Drame, N.K., Diop, N.D. et Zuily-Fodil, Y., 2005.** Adaptation à la sécheresse et création variétale : le cas de l'arachide en zone sahélienne. *Oléagineux. Corps gras, Lipide*, **12 (3)** : 248-260.
18. **Dakora, F.D., 1985.** Nodulation and nitrogen fixation by groundnut in amended and unamended field soil in Ghana. In: Biological fixation in Africa. Sali, H., and Keya, S.O., (eds). 324-339. proceedings of the first conference of the African association for biological nitrogen fixation (AABNF) held in Nairobi, Kenya, July 23 to 27, 1984.
19. **de Lajudie, P., 2004.** Taxonomie des microsymbiotes de légumineuses : historique et derniers développements. In Proceedings of the 2<sup>nd</sup> conference of Mediterranean Rhizobiologie. Oran, Algeria.
20. **Dénarié, J., Debelle, F. and Rosenberg, C., 1992.** Signalling and host range variation in nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.*, **46** : 497-537.
21. **Dhery, M. and Dreyfus, B., 1991.** Three treatments recommended for groundnut cultivation in Senegal : Nematode eradication, selected seed inoculation with rhizobia and phosphogypsum applications. *Oléagineux*, **46 (5)** : 197-207.
22. **Dhery, M., M'Baye, D., Gaye, F. and Diouf, M., 1987.** Traitement contre les nématodes dans le bassin arachidier Nord du Sénégal. *Oléagineux*, **42 (10)** : 369-377.
23. **Diouf, D., Forestier, S., Neyra, M. and Lesueur, D., 2003.** Optimisation of inoculation of *Leucaena leucocephala* and *Acacia mangium* with rhizobium under greenhouse conditions. *Ann. For. Sci.*, **60** : 379-384.

24. **Diouf, D., Duponnois, R., Ba, A.T., Neyra, M. and Lessueur, D., 2005.** Symbiosis of *Acacia auriculiformis* and *A. mangium* with mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium sp.* Improve salt tolerance in greenhouse conditions. *Funct. Plant Biol.*, **32** : 1143-1152.
25. **Dommergues, Y., Duhaux, E., et Hoang, G.D., 1999.** Les arbres fixateurs d'azote : Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Y. Dommergues (ed). Édition espaces 34. Paris, 475p.
26. **Dude, K.B. and Raut, R.S., 2005.** Combined effects of *Rhizobium* and VA-Mycorrhiza inoculation on groundnut. *J. of Soils and Crops*, **15 (2)** : 315-318.
27. **Drey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M. and Chauhan, S.M., 2004.** Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea L*) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol. R.*, **159** : 371-394.
28. **Dreyfus, B.L., Garcia, J.L. and Gillis, M., 1988.** Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov. a stem nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, **38** : 89-98.
29. **Dunham, D.H. and Baldwin, I.L., 1931.** Double infection of leguminous plants with good and poor strains of rhizobia. *Soil Sci.*, **32** : 235-248.
30. **Duponois, R., Founoune, H., Ba, A., Planchette, C., El Jafari, S., Neyra, M. and Ducouso, M., 2000.** Ectomycorrhization of *Acacia holosericea* A. Cunn. Ex G. Don by *Pisolithus spp.* In Senegal ; effect on plant growth and on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Ann. Sci. For.*, **57** : 345-350.
31. **Epstein, E., 1972.** Mineral nutrition of plants : Principles and perspectives. John Wiley, New York.
32. **Evans, J., Barnet, Y.M. and Vincent, J.M., 1979.** Effect of a bacteriophage on colonisation and nodulation of clover roots by paired strains of *Rhizobium trifolii*. *Can. J. Microbiol.*, **25** : 974-978.
33. **Faye, A., Sarr, A. and Lessueur, D., 2006.** Effect of Inoculation with Rhizobia on the Gum-Arabic Production of 10-Year-Old *Acacia senegal* trees. *Arid Land Research and Management*, **20** : 1-7.
34. **Fischer, R.F., and Long, S.R., 1992.** Rhizobium-plant signal exchange. *Nature* (london), **357** : 655-660.
35. **Gibson, A.H., 1963.** Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* (L.) plants. *Aust. J. Biol. Sci.*, **16** : 21-28.

36. Freud, C., Freud, E.H., Richard, J. et Thénevin, P., 1997. L'arachide au Sénégal, un moteur en panne. Karthala-CIRAD, 157p.
37. Giler, K., 2001. Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems, *second ed.* CABI Publishing, Wallingford, 423p.
38. Giller, P. et Silvestre P., 1969. L'arachide : techniques agricoles et production tropicales. *Maisonneuve G.-P & Larose*, 289p.
39. Goss, M.J. and de Varennes, A., 2002. Soil disturbance reduces the efficacy of mycorrhizal associations for early soybean growth and N<sub>2</sub> fixation. *Soil Biol. Biochem.*, **34** : 1167-1173.
40. Gueye, M. and Ndoye, I., 2000. Trenching : a necessity for assessment of N<sub>2</sub> fixation in field grown *Faidherbia albida* using <sup>15</sup>N-enrichment. *Ar. Soil Res. Rehabil.*, **14** : 233-237.
41. Graham, P.H., 1998. Biological dinitrogen fixation : Symbiotic. P. 322-345. In Sylvia *et al.* (ed.) Principles and applications of soil microbiology. Prentice – Hall, Upper Saddle River, NJ.
42. Hageman, R. H. 1984. Ammonium versus nitrate nutrition of higher plants. In. Nitrogen in crop production. ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA, 67-85.
43. Harasawa, R., Mizusawa, H., Nozawa, K., Nakagawa, T., Asada, K. and Kato, I., 1993. Detection and tentative identification of dominant *Mycoplasma* species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. *Res. Microbiol.*, **144**: 489-493.
44. Hayman, D.S., 1986. Mycorrhizae of nitrogen-fixing legumes. *W. J. of Microbiol and Biotech.*, **1 (2)** : 121-145.
45. Haynes, R. J., 1986. Origin, distribution and cycling of nitrogen in terrestrial ecosystems. In : Mineral nitrogen in the plant-soil system. R. J. Haynes (ed.) 1-15, Academic Press, Orlando.
46. Hegde, S.V., 1982. Field responses to *Rhizobium* inoculation in *Arachis hypogaea*, *Vigna spp.* And *Dolichos spp.* In India. In Biological Fixation Technology for Tropical Agriculture eds. Graham, P.H. and Harris, S.C. pp. 257-264. Cali, Colombis : CIAT.
47. Huang, H.Q., He F.R. and Chen Z.H., 1990. Study on the Biological characteristic of the fast-growing peanut rhizobial strains 85-7 and 85-19.J. *Sichuan Agric. Uni.*, **8** : 188-193.
48. Jakobsen, I., Abbot, L.K. and Robson, A.D., 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associate with *Trifolium subterraneum* L. I : Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytol.*, **120** : 371-380.

- 49. Jaubert, P., 1951.** Première étude au Sénégal des bactéries symbiotiques de l'arachide. Ann. du C.N.R.A., **5** : 144-164.
- 50. Jordan, D.C., 1984.** Conn 1938, In : Bergey's manual of systematic bacteriology, 1 : 234-254. Kriej, N.R. and Holt, J.G. (ed). *The William & Wilkins Co* ; Baltimore, London.
- 51. Khan, M.K. and Yoshida, T., 1994.** Nitrogen fixation in peanut determined by acetylene reduction method and <sup>15</sup>N-isotope dilution technic. *Soil Sci. and Plant Nutrition*, **40 (2)** : 283-291.
- 52. Khurana, A.L., Dudeja, S.S. and Sheoran, A., 1998.** Biological nitrogen fixation in chickpea for sustainable agriculture. Prospects and limitations. *Sust. Agric. Food, Energy, Ind.*, 439-444.
- 53. Koide, R.T., 1991.** Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytol.*, **117** : 365-386.
- 54. Krasova-Wade, T., Diouf, O., Ndoye, I., Sall, C. E., Braconier, S., and Neyra, M., 2006.** Water-condition effects on rhizobia competition for cowpea nodule occupancy. *African J. of Biotech.*, **5 (16)** : 1457-1463.
- 55. Krasova-wade, T. and Neyra, M., 2007.** Optimization of DNA isolation from legume nodules. *J.C. Appl. Microbiol.*, **45 (1)** : 95-99.
- 56. Laguere, G., Allard, M.R., Revoy, F. and Amarger, N., 1993.** Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60** : 56-63.
- 57. Lanier, J.E., Jordan, D.L., Spears, J.F., Wello, R. and Dewayne, J.P., 2005.** Peanut response to inoculation and nitrogen fertilizer. *Agronomy J.*, **97** : 79-84.
- 58. Layzell, D.B., 1990.** N<sub>2</sub> fixation, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction and NH<sub>4</sub> assimilation. In : Plant physiology, biochemistry and molecular biology. D.T. Denis and D.H. Turpin (eds), *Longman Scientific & Technical*, Singapore, 389-413.
- 59. Lekberg, Y. and Koide, R.T., 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobia, available soil P and nodulation of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in Zimbabwe. *Agric., Ecosyst. and environ.*, **110** : 143-148.
- 60. Lesueur, D. and Duponnois, R., 2005.** Relations between rhizobial nodulation and root colonization of *Acacia crassicarpa* provenances by an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices* Schenk and Smith or an ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius* Coker & Couch. *Ann. For. Sci.*, **62** : 467-474.

61. Lesueur, D., Ingleby, K., Odee, D., Chamberlain, J., Wilson, J., Manga, T.T., Sarrailh, J-M. and Pottinger, A., 2001. Improvement of forage production in *Calliandra calothyrsus* : methodology for the identification of an effective inoculum containing *Rhizobium* strains and arbuscular mycorrhizal isolates. *J. of Biotech.*, **91** : 269-282.
62. Li, J., Xu, L.M., Fan, F., Li, L., Ge, C and Yang, S.S., 1999. Genetic diversity among Chinese peanut rhizobia by REP- PCR analysis. *Acta Microbiol. Sin.*, **39** : 296-304.
63. Miller, R.M. and Jastrow, J.D., 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. In : Arbuscular mycorrhizal : physiology, molecular biology and ecology, Y. Kapulnik and D. Douds, Eds. Kluwer Acad Publ, Dordrecht, pp. 4-18.
64. Montañez, A., Danso, S.K.A. and Hardarson, G., 1995. The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five *Bradyrhizobium japonicum* strains. *Appl. Soil Ecology*, **2** : 165-174.
65. Montañez, A., 2000. Overview and case studies on biological nitrogen Fixation : Perspectives and limitations FAO, 11p.
66. Nambiar, P.T.C., 1985. Response of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to *Rhizobium* inoculation in the field : problems and prospect. *MIRCEN J. of Appl. Microbiol. and Biotech.*, **1** : 293-309.
67. Navarro, E., Simonet, P., Normand, P. and Bardin, R., 1992. Characterization of natural population of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of ribosomal intergenic spacer. *Arch. Microbiol.*, **157** : 107-115.
68. Ndiaye, M., 1986. Contribution à l'inoculation bactérienne au champ de l'arachide (*Arachis hypogaea*) et du soja (*Glycine max*) au Sénégal. Communication présentée au séminaire « amélioration biologique de la fertilité des sols ». Dakar-Sénégal, 19-25 Mars 1986.
69. Ndoye, I., de Billy, F., Vasse, J., Dreyfus, B., and Truchet, G., 1994. Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J. Bacteriol.*, **176** : 1060-1068.
70. Ndoye, I. and Dreyfus B., 1988. N<sub>2</sub> fixation by *Sesbania rostrata* and *S. sesban* estimated using <sup>15</sup>N and total N difference method. *Soil Biology Biochem.*, **20** (2) : 209-213.
71. Ndoye, I., Dreyfus B.L. and Becker M. 1996. *Sesbania rostrata* as green manure in lowland rice farming system in Casamance (Senegal) *Trop. Agric.*, **73** : 234-237.
72. Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntagij, A., Kotepong, S., et al., 2004. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J Gen Appl Microbiol.*, **50** : 17-27.

73. Peters, N.K. and Verma, D.P.S. 1990. Phenolic compounds are regulators of gene expression in *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **3** : 4-8.
74. Ponsonnet C. et Nesme X., 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch. Microbiol.*, **161** : 300-309.
75. Prin, Y., Galiana, A., Ducouso, M., Dupuy, N., de Lajudie, P. and Neira, M., 1993. Les rhizobiums d'acacia Biodiversité et taxonomie. *Bois for trop.*, **238** : 5-20.
76. Samba, R.T., Dorego, F., Neyra, M., Sylla, S.N. and Ndoye, I., 2004. Etude de la compétitivité des souches de rhizobiums d'*Acacia nilotica* var. adansonii. In Proceedings of the 2<sup>nd</sup> conference of Mediterranean Rhizobiologie. Oran, Algeria.
77. Sanginga, N., Danso, S.A.K. and Ojeifo, A.A., 1994. Persistence and recovery of introduced *Rhizobium* ten years after inoculation on *Leucaena leucocephala* grown on an Alfisol in South western Nigeria. *Plant-soil*, **159** : 199-204.
78. Sarr, A., Diop, B., Peltier, R., Neyra, M., and Lessueur, D., 2005. Effect of rhizobial inoculation methods and host plant provenances on nodulation and growth of *Accacia senegal* and *Acacia nilotica*. *New For.*, **29** : 75-87.
79. Sharma, K.K., Lavanya, M., and Anjaiah, V., 2000. A method for isolation and purification of peanut genomic DNA suitable for analytical applications. *Plant Mol. Biol. R.*, **18** : 393a-393h.
80. Simon, T., Kalalova, S. and Peterzik, K., 1996. Identification of rhizobium stains and evaluation of their competitiveness. *Folia Microbiol.*, **41** : 65-72.
81. Singleton, P.W., Bohlool, B.B. and Nakao, P.L., 1992. Legume response to rhizobial inoculation in the tropic : myths and realities? In : Lal, R., Sanchez, P.A. (eds.), myths and science of soils of the tropic. *Soil Sci. Soc. Am. And Am. Soc. Agron. Spec. Publ.*, **29** : 135-155.
82. Smith, S.E. and Read, D.J., 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press; 2<sup>nd</sup> ed. London, 605P.
83. Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B.J.J., and Kijne, J.W., 1992. Molecular Mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.*, **6** : 2897-2903.
84. Stevenson, J.F., 1986. Cycles of soil : carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients. John Wiley & Son, New York.
85. Subrahmanyam, P., Wongkaew, S., Reddy, D.V.R., Demski, J.W., Donald, D.MC, Sharma, S.B. et Smith, D.H., 1992. Diagnostic au champ des maladies de l'arachide. Bulletin d'information (36). *Patanchan*, A.P., 502 324, Inde, 84p.

- 86. Sutherland, J.M. and Sprent, J., 1993.** Nitrogen fixation by legumes trees .in: Subba Rao NS, Rodriguez – Burrueco C (eds) Symbioses in nitrogen fixing trees, pp 33-63. New Delhi: oxford and IBH.
- 87. Sylla, S.N., 1996.** Contribution à l'étude de la symbiose fixatrice d'azote chez *Pterocarpus erinaceus* Poir. (venn) et *Pterocarpus lucens* Lepr. Thèse de doctorat de troisième cycle de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar-Sénégal, 94p.
- 88. Sylla, S.N., Ndoye, I., Gueye, M., Ba, A.T., and Dreyfus, B., 2002.** Estimates of biological nitrogen fixation by *Pterocarpus lucens* in a semi arid natural forest park in Senegal using <sup>15</sup>N natural abundance method. *African J. of Biotech.*, **1 (2) : 50-56.**
- 89. Taurian, T., Ibañez, F., Fabra, A. & Aguilar, O.M., 2006.** Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in central Argentinean Soils. *Plant and Soil*, **282 : 41-52.**
- 90. Thiao, M., 2005.** Caractérisation et étude de la survie et de la compétitivité en pépinière et au champ de souches de *rhizobium* inoculées chez *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. Thèse de troisième cycle de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar, 116p.
- 91. Toro, N., 1996.** Nodulation competitiveness in the *Rhizobium* –legume symbiosis. *W. J. Microbiol. Biotech.*, **12 : 157-162.**
- 92. Triplett, E.W., 1990.** The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **3 : 199-206.**
- 93. Truchet, G., Debelle, F., Vasse, J., Tergaghi, B., Garnerone, A.M., Rosenberg, C., Batut, C., Maillet, F. and Dénarié, J. 1985.** Identification of a *Rhizobium meliloti* pSym 2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation. *J. Bacteriol.*, **164 : 1200-1210.**
- 94. Trujillo, M.E. Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A.M., Rivas, R., Ludeña, D., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E. and Velázquez, E., 2005.** Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum Lupini* sp. Nov? *Appl. Environ. Microbiol.*, **71 : 1318-1327.**
- 95. Turgeon, B.G. and Bauer, W.D., 1985.** Ultrastructures of infection thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta.*, **163 : 328-349.**
- 96. Uheda, E., Daimon, H., and Yoshizako, F., 2001.** Colonization and invasion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots by gusA-marked *Bradyrhizobium* sp. *Can. J. Bot.*, **79 (6) : 733-738.**
- 97. Van Kessel, C. and Hartley, 2000.** Agricultural management of grain legumes : has it led to an increase in nitrogen fixation? *Field crop Res.*, **65 : 165-181.**

- 98. Van Rossum, D., Schuurmans, F.P., Gillis, M., Muyotcha, A., Van Verseveld, H.W., Stouthamer, A.H. and Boogerd, F.C., 1995.** Genetic and phenotypic analysis of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** : 1599-1609.
- 99. Vincent, J.M., 1970.** A Manual for the Practical Study of Root- nodule bacteria. IBP Handbook N° 15, Blackwell, oxford, 164p.
- 100. Wanje, S.S., 1989.** Response of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to inoculation with *Rhizobium* strains isolated from wild arboreal legumes. *MIRCEN*, **5** : 135-141.
- 101. Willems, A., 2003.** The taxonomy of rhizobia : an overview. *Plant Soil*, 1-11. In Ben Romdhane, S., Nasr, H., Samba-Mbaye, R., Neyra, M., Ghorbal, H., and De Lajudie, P., 2006. Genetic diversity of *Acacia tortilis* ssp. Raddiana rhizobia in Tunisia assessed by 16S-23S rDNA genes analysis. *J. of Appl. Microbiol.*, 100 (3) : 436-445.
- 102. Yang, J.K., Xie, F.L., Zou, J., Zhou, Q. and Zhou, J.C., 2005.** Polyphasic characteristics of bradyrhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in China. *Soil Biol. Biochem.*, **37** : 141-153.
- 103. Zahran, H.H., 1999.** Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63** : 968-989.

---

*ANNEXES*

---

**ANNEXE 1 : MILIEUX DE CULTURE****Milieu YMA (Yeast Mannitol Agar)**

Mannitol.....	10 g
Glutamate de sodium.....	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0,1 g
NaCl .....	0,05 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....	0,04 g
FeCl <sub>3</sub> .....	0,004 g
Extrait de Levure (Difco).....	1 g
Agar .....	15 g
H <sub>2</sub> O.....	QSP 1 l
pH :.....	6,8
Stérilisation à 120 °C pendant .....	20 min

**Milieu YM modifié Mn**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,66 g
Glutamate de sodium.....	2,5 g
Extrait de Levure (Difco).....	2 g
NaCl .....	0,05 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (10 g/l).....	10 ml
CaCl <sub>2</sub> (40 g/l).....	1 ml
FeCl <sub>3</sub> (4 g/l).....	1 ml
Sulfate de Mn (1 g/l).....	10 ml
QSP eau.....	1000 ml
pH .....	6,8

**Milieu Jensen**

Solution P (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> à 20 g/l. MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O à 20 g/l).....	10 ml
Solution Q (NaCl à 20 g/l) .....	10 ml
Solution R (CaHPO <sub>4</sub> à 50 g/l) .....	20 ml
Solution D (FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O à 4 g/l.....	10 ml
ou FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O en solution).....	11,1 ml
Oligoélément de Jensen*.....	1 ml
Agar .....	20 g/l
QSP eau.....	1000 ml

\*Le litre de solution d'oligoélément de Jensen est composé de :

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	2,86 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O.....	2,03 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,22 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O.....	0,08 g
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....	0,09 g
pH.....	6,7
Stérilisation: 120 °C pendant .....	20 min.

**ANNEXE 2 : SOLUTIONS****Glycérol 60 %**

Glycérol 100 %.....	60 ml
Eau déminéralisée.....	40 ml
Autoclavage 120 °C.....	20 min

**Tampon Tris-Borate (TBE)**

Tris-Base .....	1 % p/v
Na <sub>2</sub> EDTA .....	0,07 % p/v
Acide Borique .....	0,5 % p/v
pH ajuster à .....	8,0

**Tampon de charge**

Bleu de Bromophénol .....	0,25 %
Glycérol.....	30 %

**Bromure d'Ethidium**

Bromure d'Ethidium.....	100 µl
Eau distillée QSP.....	1000 ml

**Tampon de broyage (TES/saccharose), pH 8,0 stérilisé**

Tris-HCl .....	20 mM (pH 8,0)
EDTA (2Na) .....	1 mM (pH 8,0)
NaCl.. .....	50 mM
Saccharose .....	8 %, p/v
Conservé à .....	+4 °C

**Lysozyme**

Lysozyme .....	20 mg/ml
dans le tampon TE*.....	1 X
Ne pas dépasser 2 mois de conservation à -20 °C.	

\*1 X du tampon TE est composé de :

Tris-HCl.....	10 mM
EDTA .....	1 mM
Autoclavage à 120 °C.....	20 min

**GES (Guanidine thiocyanate, EDTA, Sarcosyl)**

Guanidine thiocyanate.....	0,5 mM
EDTA (2Na).....	100 mM (pH 8,0)
N-Lauryl sarcosine .....	1 %, p/v

**NaOH**

NaOH.....	8 mM
Autoclavage à 120 °C.....	20 min

Ne pas dépasser 6 mois de conservation.

**Solution minérale de Long Ashton**

Macroéléments.....	mg/l
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	350
KNO <sub>3</sub> .....	400
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	900
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....	200
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	500
Oligoéléments.....	mg/l
MnSO <sub>4</sub> .....	2,5
CuSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,25
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,3
NaCl.....	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	5 ml/100 l
EDTA-Fe (13 %) (11 g/l).....	4 ml