

# Effet de l'association *Rhizobium leguminosarum* – *Azotobacter chroococcum* sur la nodulation et la croissance des plantes de la fève (*Vicia Faba*, L)

K. Yaakoubi <sup>1</sup> \*, N. EL Mernissi <sup>1</sup>, B. Sijilmassi <sup>2</sup>, I. Meftah Kadmiri <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Green Biotechnology Center, MAScIR (Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation & Research), Rue Mohamed Al Jazouli, Madinat Al Irfane, 10 100 Rabat, Morocco.

<sup>2</sup>ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Area), Station Exp. INRA –Guich Rue Hafiane Cherkaoui, Agdal, Rabat, Maroc

\*Corresponding author: [k.yaakoubi@mascir.com](mailto:k.yaakoubi@mascir.com)/ +212641267908

**Résumé:** **Problématique:** Les légumineuses alimentaires contribuent significativement dans la sécurité alimentaire, la génération des revenus et la préservation des sols pour des millions de petits agriculteurs au Maroc et en Afrique. Cependant, la production des légumineuses souffre du manque d'utilisation des intrants agricoles, de la dégradation des sols et de la baisse de l'efficacité de la fixation symbiotique d'azote. **L'objectif:** L'objectif de cette étude est d'étudier l'apport d'une association entre deux souches fixatrices d'azote, symbiotique et non-symbiotique dans l'amélioration de la symbiose des plantes de la fève. Les souches sont ainsi isolées, identifiées et leur association sur l'amélioration de la symbiose et la croissance des plantes de la fève est testée. **Methodologie:** Deux souches (NF2 et VGNF8) ont été criblées en utilisant des méthodes moléculaires basées sur la présence du gène *nifH* et du gène *nifD* chez le groupe de souches symbiotiques et non-symbiotiques, respectivement. La confirmation des deux souches a été basée sur plusieurs tests : Induction de nodulation chez la plante de la fève, test de réduction de l'acétylène, galerie API 20 NE et le séquençage des gènes *ADNr* IGS. *nifD* et *nifH*. Dans une deuxième série d'expérience, l'effet de l'inoculation concomitante des deux souches NF2 et VGNF8 sur les plantes de la fève a été testé par des essais agronomiques. Les graines de la fève ont été enveloppées par la souche NF2, tandis qu'une solution de la souche VGNF8 a été ajoutée aux pots par la technique du « drench soil ». Après 45 jours au phytotron, la biomasse aérienne ainsi que le poids des nodules ont été déterminés. **Résultats:** A partir d'une dizaine de souches fixatrices d'azote symbiotiques et non-symbiotiques, le criblage moléculaire a permis d'identifier les deux souches NF2 et VGNF8. Les résultats de l'identification biochimique et moléculaire ont confirmé l'appartenance de la souche NF2 à l'espèce *Rhizobium leguminosarum* et la souche VGNF8 à l'espèce *Azotobacter chroococcum*. Cette dernière a montré une capacité de fixation d'azote par le test ARA de 1635 nml C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/24h<sup>-1</sup> culture<sup>-1</sup>. Après inoculation des graines de fève par la souche *R. leguminosarum* NF2 (par seed coating atteignant 5x10<sup>5</sup> UFC/graine) et la souche *A. chroococcum* VGNF8, les résultats des essais agronomiques ont montré que la co-inoculation a augmenté la biomasse aérienne de 14% en comparaison avec l'inoculation de la souche NF2 seule (le poids passe de 4,075±0,08 g /plante sèche à 4,59±0,44 g/plante sèche). De même, le poids des nodules passe de 0,0735±0,002 g à 0,145±0,05 g (97,95%) lorsque les deux souches sont inoculées. En conclusion, l'inoculation de la souche *Azotobacter chroococcum* VGNF8 augmente significativement la relation symbiotique entre la souche *Rhizobium leguminosarum* NF2 et les plantes de la fève.

## 1. Isolement, criblage et identification des souches étudiées

**1) Identification complète des souches: Biochimique et séquençage de l'ADNr IGS**  
**2) Caractérisation des traits PGPM**  
**3) Essais sur les plantes de la fève**

Tests API 20NE	Composants actifs	NF2	Tests Biochimiques	VGNF8
N03	Potassium Nitrate	-	Rhamnose	+
N02	L-tryptophane	-	Meso-inositol	D
TRP	D-glucose	-	Uréase	+
GLU	L-arginine	-	Oxydase	+
ADH	L-arginine	-	Production H <sub>2</sub> S	D
URE	Urée	+	Glucose	+
ESC	Esculine citrate de fer	+	Sucrose	+/
GEL	Gélatine	-	Mélibiose	+
PNPQ	4-Nitrophényl β-D-glucopyranoside	+	Mannitol	+/
GLU	D-glucose	-	Sorbitol	-
ARA	L-arabine	-	Amylase	-
MNE	D-mannose	-	Acide malique	+
MAN	D-mannitol	-	Nitrate réductase	-
NAG	N-acétyl-glucosamine	-	Indole	-
MAL	D-maltose	-	Croissance à 30 °C	+
GNT	Phaasium gluconate	-	Croissance à 37 °C	+
CAP	Acide caprique	-	Amylase	-
ADI	Acide adipique	-		
MLT	Acide malique	+		
CIT	Triclosan citrate	-		
PAC	Acide phénylacétique	-		
CX	Oxydase	-		

Arbre phylogénétique de la séquence du gène *ADNr* IGS (965 pb) de la souche VGNF8 par la méthode Neighbour-Joining montrant son positionnement. Les nombres sur les nœuds sont les valeurs Bootstrap (pourcentages de 1000 répliques).

Arbre phylogénétique de la séquence du gène *ADNr* IGS (965 pb) de la souche NF2 par la méthode Neighbour-Joining montrant son positionnement. Les nombres sur les nœuds sont les valeurs Bootstrap (pourcentages de 1000 répliques).

**Rhizobium leguminosarum NF2**  
**Azotobacter chroococcum VGNF8**

## 2. Caractérisation des souches *Rhizobium leguminosarum* NF2 et *Azotobacter chroococcum* VGNF8

### 2.1 Caractérisation de la souche NF2:

- Essais sous des conditions contrôlées dans les jars de Léonard
- Estimation de l'efficacité de la souche sur les plantes de la fève

Résultats de l'effet de la souche NF2 sur la nodulation et la biomasse des plantes de fève (*Vicia faba*, L.)



### 2.2 Caractérisation de la souche VGNF8:

- Caractérisation de la fixation d'azote par le test ARA « Acetylene Reduction Assay »
- Caractérisation de la solubilisation du phosphate inorganique dans le milieu liquide
- Caractérisation de la production des sidérophores par le test CAS-Agar

Souches	ARA (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /24h <sup>-1</sup> .culture <sup>-1</sup> )	P solubilisation (µg/ml)
<b>Azotobacter chroococcum VGNF8</b>	<b>1635</b>	<b>32,8</b>
<b>Azotobacter chroococcum DSM 2286</b>	<b>82</b>	<b>76</b>



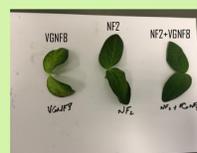
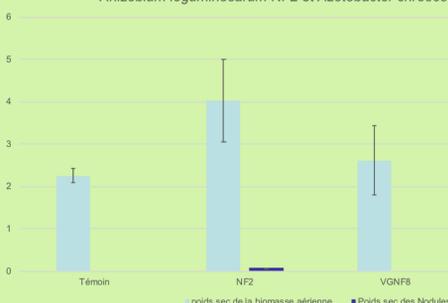
- La souche *Rhizobium leguminosarum* NF2 est effective dans la nodulation des plantes de fève
- Elle induit une augmentation de 61% de la biomasse aérienne sèche (0,75±0,04 à 1,21±0,07 g)
- Elle induit la formation de 53,33±10,4 nodules / plantes

- La souche *Azotobacter chroococcum* VGNF8 exprime plusieurs traits de promotion de la croissance des plantes
- Elle fixe l'azote *in vitro* plus significativement que la souche de référence DSM 2286

## 3. Effet de l'inoculation des souches *Rhizobium leguminosarum* NF2 et *Azotobacter chroococcum* VGNF8 sur la fève:

- Inoculation concomitante des plantes de fève (*Vicia faba*, L) par les deux souches NF2 (par enrobage des graines; 5x10<sup>5</sup> UFC/graine) et VGNF8 (par drench soil; 1ml d'une solution de 10<sup>9</sup> UFC/ml/graine) dans les pots avec le sol stérile
- Incubation dans un phytotron à 26 °C, photopériode de 16:8 h avec une intensité lumineuse de 240 µmol.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>
- Détermination des paramètres de croissance, de la nodulation et de la nutrition

Effet de l'inoculation simultanée des plantes de fève par les souches *Rhizobium leguminosarum* NF2 et *Azotobacter chroococcum* VGNF8



- La co-inoculation de la fève par les souches *Rhizobium leguminosarum* NF2 et *Azotobacter chroococcum* VGNF8 a augmenté la biomasse aérienne de 14% en comparaison avec l'inoculation de la souche NF2 seule
- Le poids des nodules passe de 0,0735±0,002 g à 0,145±0,05 g (97,95%) lorsque les deux souches sont inoculées.
- Les plantes de fève inoculées par les deux souches montrent un aspect plus sain que les plantes non inoculées

### En Conclusion:

- Le criblage par des outils moléculaires (gènes *nifH* et *NodD*) constitue un moyen rapide et efficace pour l'obtention de nouvelles souches PGPM
- L'inoculation des plantes de fève par la souche *Azotobacter chroococcum* VGNF8 augmente significativement la relation symbiotique entre la souche *Rhizobium leguminosarum* NF2 et les plantes inoculées.
- Les souches promotrices de la croissance des plantes (PGPM) expriment des effets synergétiques pour la nodulation des légumineuses par les rhizobia.