



UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE

UFR AGROFORESTERIE

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur et
de la Recherche Scientifique

ANNEE : 2024-2025

N° D'ORDRE :
133

CANDIDATE

Nom : ATSE

Prénoms : Marie-Paule
Aboueuh

THESE DE DOCTORAT

Mention : Agriculture et Foresterie Tropicale

Spécialité : Microbiologie des Sols

Evaluation d'accessions de haricot sec (*Phaseolus vulgaris*,
L.) et identification de rhizobia locaux efficaces pour
l'amélioration de la production de cette légumineuse dans le
Centre de la Côte d'Ivoire

JURY

Président : M. KOFFI N'Goran Mathurin, Professeur Titulaire,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Directeur : M. KONATE Ibrahim, Professeur Titulaire, Université
Jean LOROUGNON GUEDE

Rapporteur : M. ATTIE Yao Paul, Maître de Conférences,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Examineurs : M. KOUASSI Kra Athanase, Maître de Conférences,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

M. COULIBALY Noupé Diakaria, Maître de Recherche,
Centre National de Recherche Agronomique

Soutenue publiquement le :
17 Mai 2025

TABLE DE MATIÈRES

TABLE DE MATIÈRES.....	i
DEDICACE.....	vii
REMERCIEMENTS	viii
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES FIGURES.....	xvi
LISTE DES ANNEXES.....	xvii
INTRODUCTION.....	1
Première partie : GENERALITES	5
1. HARICOT COMMUN (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	6
1.1. Origine, domestication et distribution géographique	6
1.2. Description de la plante	7
1.2.1. Description taxonomique	7
1.2.2. Description botanique	9
1.2.2.1. Appareil végétatif.....	9
1.2.2.2. Appareil reproducteur.....	10
1.3. Ecologie de la plante.....	11
1.4. Importance de la culture	12
1.4.1. Importance socio-économique du haricot	12
1.4.2. Importance nutritionnelle.....	12
1.4.3. Importance agronomique	13
1.4.4. Importance médicinale.....	13
1.5. Mode de consommation.....	13
1.6. Contraintes liées à la culture du haricot.....	13
1.6.1. Ravageurs.....	14
1.6.2. Maladies	14
1.7. Moyens de lutte	15
1.8. Itinéraires techniques de la culture	15
1.8.1. Préparation du sol	15
1.8.2. Semis.....	15
1.8.3. Fertilisation du sol.....	16
1.8.4. Entretien de la culture	16

1.8.4.1. Irrigation	16
1.8.4.2. Désherbage	16
2. RHIZOBIA	17
2.1. Découverte et taxonomie	17
2.2. Caractérisation morphologique et diversité écologique des rhizobia	18
2.3. Spécificité d'hôte	19
2.4. Rhizobia associés au haricot	19
2.5. Etude de la diversité des rhizobia	20
2.5.1. Méthodes phénotypiques	20
2.5.2. Méthodes moléculaires	21
2.6. Phylogénie moléculaire et méthodes phylogénétiques	22
2.6.1. Phylogénie moléculaire	22
2.6.2. Méthodes phylogénétiques	23
3. SYMBIOSE RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE	24
3.1. Définition de la symbiose	24
3.2. Intérêts de la symbiose <i>Rhizobia</i> -légumineuses	24
3.3. Etapes de la fixation symbiotique	25
3.3.1. Dialogue moléculaire et reconnaissance	25
3.3.2. Infection bactérienne	26
3.3.3. Développement de la nodosité et types de nodules	27
3.4. Fonctionnement de la symbiose	29
3.4.1. Signaux moléculaires et spécificité de la reconnaissance symbiotique	29
3.4.1.1. Flavonoïdes	29
3.4.1.2. Gènes de nodulation	29
3.4.1.3. Facteurs Nod	30
3.4.2. Molécules clés de la fixation biologique de l'azote	30
3.4.2.1. Nitrogénase	30
3.4.2.2. Léghémoglobine	31
3.5. Fixation d'azote par la symbiose rhizobienne chez le haricot	31
3.6. Facteurs influençant la symbiose rhizobium-légumineuse	32
3.6.1. Température	32
3.6.2. Salinité	33
3.6.3. Humidité	33
3.6.4. pH	34

3.6.5. Pesticides.....	34
Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES	35
1. PRÉSENTATION DES SITES D'ETUDE	36
1.1. Présentation des sites d'échantillonnage	36
1.2. Description des sites d'expérimentation	36
1.3. Justification du choix des sites d'expérimentation et d'échantillonnage de sols.....	39
2. MATERIEL	40
2.1. Matériel biologique.....	40
2.1.1. Matériel végétal.....	40
2.1.2. Matériel bactérien	42
2.2. Matériel technique	42
2.2.1. Matériel chimique	42
2.2.1.1. Fertilisants et solution nutritive.....	42
2.2.1.2. Pesticides	42
2.2.2. Substrats	42
2.2.3. Milieux de cultures	43
3. METHODES.....	43
3.1. Evaluation agromorphologique des 35 accessions de haricot sec	43
3.1.1. Dispositif expérimental	43
3.1.2. Mise en place des essais, semis et entretien des parcelles	45
3.1.3. Mesures et observations des paramètres	45
3.2. Constitution d'une collection de rhizobia locaux du haricot sec résistant aux facteurs environnementaux et anthropiques	48
3.2.1. Prospection et collecte des échantillons de sols	48
3.2.2. Piégeage des potentiels bactéries nodulant le haricot sec	49
3.2.3. Collecte et conservation des nodules.....	50
3.2.4. Isolement, purification et conservation des isolats.....	50
3.2.4.1. Isolement des rhizobia	50
3.2.4.2. Purification et conservation des isolats bactériens.....	50
3.2.5. Caractérisation morphologique des isolats.....	51
3.2.5.1. Examen macroscopique	51
3.2.5.2. Examen microscopique par la coloration de Gram	51
3.2.6. Caractérisation symbiotique et physiologique des rhizobia	51
3.2.6.1. Authentification des isolats	51

3.2.6.2.	Evaluation du spectre variétal des bactéries nodulants le haricot sec	52
3.2.6.3.	Caractérisation physiologique des isolats	53
3.3.	Evaluation au champ de l'efficacité symbiotique et agronomique des isolats	55
3.3.1.	Traitements	55
3.3.2.	Dispositif expérimental	55
3.3.3.	Production d'inoculum	57
3.3.4.	Inoculation et semis des graines	57
3.3.5.	Observations et mesures	58
3.3.5.1.	Effet des isolats sur les paramètres végétatifs et la nodulation du haricot..	58
3.3.5.2.	Effet des isolats sur le rendement et ses composantes	58
3.4.	Caractérisation moléculaire des rhizobia nodulant le haricot sec	58
3.4.1.	Extraction d'ADN génomique des isolats	58
3.4.2.	Amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S	59
3.4.3.	Séquençage et analyse du gène de l'ARNr 16S	59
3.4.4.	Analyse des données de séquençage	60
3.4.5.	Analyse phylogénique	60
3.5.	Analyses statistiques des données	60
Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION		62
CHAPITRE 1 : PERFORMANCES AGRONOMIQUES DE 35 ACCESSIONS DE		
HARICOT SEC		63
1.	RESULTATS	63
1.1.	Analyse comparative des accessions	63
1.1.1.	Paramètres de croissance des accessions de haricot sec	63
1.1.2.	Paramètres phénologiques	65
1.1.3.	Composantes du rendement des accessions	67
1.1.3.1.	Composantes liées aux gousses	67
1.1.3.2.	Composantes liées aux graines	69
1.2.	Structuration de la variabilité agromorphologique	73
1.2.1.	Corrélation entre les paramètres agro-morphologiques	73
1.2.2.	Variables contribuant à la différenciation des groupes d'accessions	75
1.2.3.	Typologie des accessions de haricot sec	78
2.	DISCUSSION	81
CHAPITRE 2 : COLLECTION DE RHIZOBIA LOCAUX NODULANT LE HARICOT ...		84
1.	RESULTATS	84

1.1.	Nodulation des accessions de haricot en fonction de l'origine du sol.....	84
1.2.	Caractéristiques phénotypiques des isolats.....	87
1.2.1.	Caractéristiques morphologiques et biochimiques des isolats	87
1.2.2.	Caractéristiques symbiotiques des isolats bactériens	88
1.2.2.1.	Isolats bactériens authentifiés du haricot sec	88
1.2.2.2.	Infectivité symbiotique des isolats	89
1.2.2.3.	Effet des isolats sur la biomasse	92
1.2.2.4.	Efficacité symbiotique	94
1.2.2.5.	Corrélation entre le nombre de nodules et la biomasse sèche produite	95
1.2.3.	Caractéristiques physiologiques des isolats	96
1.2.3.1.	Effet du stress acido-basique sur la survie des rhizobia.....	96
1.2.3.2.	Effet de la salinité sur la croissance des rhizobia.....	97
1.2.3.3.	Effet des pesticides sur la croissance des bactéries nodulant le haricot.....	99
2.	DISCUSSION	102
CHAPITRE 3 : SELECTION DES RHIZOBIA LOCAUX PERFORMANTS,		
COMPÉTITIFS ET CAPABLES DE BOOSTER LA PRODUCTION DU		
HARICOT		111
1.	RESULTATS	111
1.1.	Effet des rhizobia locaux sur les paramètres végétatifs du haricot sec.....	111
1.1.1.	Effet des rhizobia locaux sur le diamètre au collet des plants du haricot sec ..	111
1.1.2.	Effet des rhizobia locaux sur la hauteur des plants du haricot sec	113
1.1.3.	Effet des rhizobia locaux sur la biomasse sèche des plants du haricot sec	115
1.2.	Effet des rhizobia locaux sur les paramètres nodulaires du haricot.....	117
1.2.1.	Effet des rhizobia locaux sur le nombre de nodules.....	117
1.2.2.	Effet des rhizobia locaux sur le poids sec des nodules des plants de haricot...	119
1.3.	Effet des rhizobia locaux sur les paramètres de rendement des accessions de haricot	
	sec.....	121
1.3.1.	Effet des rhizobia locaux sur le poids des gousses du haricot sec	121
1.3.2.	Effet des rhizobia locaux sur le rendement en gousses des accessions.....	123
1.3.3.	Effet des rhizobia locaux sur le rendement en graines du haricot.....	125
2.	DISCUSSION	127
CHAPITRE 4 : DIVERSITE DES RHIZOBIA LOCAUX NODULANT LE HARICOT ..		131
1.	RESULTATS	131
1.1.	Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S par PCR	131

1.2. Affiliation des séquences de gènes d'ARNr 16S des isolats bactériens	131
2. DISCUSSION	136
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	138
REFERENCES	141
ANNEXES	170

DEDICACE

*A la mémoire de
Dr N'GBESSO Mako François De Paul,
mon co-Directeur de Thèse,
ex Directeur de la Station de Recherche sur les Cultures Vivrières du CNRA de Bouaké.*

*Votre passion et votre dévouement à la recherche ont profondément marqué ma vie
académique. Vous étiez bien plus qu'un Directeur de Thèse, vous avez été pour moi un guide,
un mentor et une source d'inspiration.*

*Ce document est le reflet de votre influence et de votre soutien inestimable.
Je vous dédie cette Thèse avec une immense gratitude et un respect éternel.*

Repose en Paix !!!

REMERCIEMENTS

Ce travail a été exécuté dans le cadre du partenariat établi entre l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) Agroforesterie de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE de Daloa et le Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) à travers l'appui financier du réseau WECABREN (West and Central Africa Bean Research Network).

Au terme de ces travaux, je voudrais remercier Madame ADOHI Krou Viviane, Professeur Titulaire, Présidente de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE de Daloa, de m'avoir accueillie dans son institution et pour avoir autorisé l'exécution de ce travail.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de Monsieur SANGARE Abdourahamane, Maître de Conférences, Directeur Général du CNRA, pour avoir autorisé mon stage au CNRA et mis les moyens pour la conduite des travaux de cette thèse.

Je dis un grand merci à M. SORO Dogniméton, Professeur Titulaire, Vice-Président de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE, Chargé de la Pédagogie et de la Vie universitaire, de la Recherche et de l'Innovation Technologique pour avoir été toujours attentif à mes préoccupations.

Je remercie également M. KONE Issiaka, Professeur Titulaire, Vice-Président de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE, Chargé de la Programmation, de la Planification et des Relations Extérieures pour ses encouragements et l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

J'ai été comblée par la disponibilité de M. KOUASSI Kouassi Clément, Maître de Conférences, Directeur de l'UFR Agroforesterie de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE et M. BEUGRE Avit Grah Maxwell, Professeur Titulaire, Directeur du Laboratoire d'Agrovalorisation, chaque fois que j'ai eu à les solliciter pour des questions administratives.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à M. KOUASSI N'gouan Cyrille Directeur de Recherche, Directeur Régional du CNRA de Bouaké, pour m'avoir reçu dans sa direction et pour la facilitation de mon stage auprès des responsables de la Station Cultures Vivrières de Bouaké.

A M. KONATE Ibrahim, Professeur Titulaire à l'Université Jean LOROUGNON GUEDE et co-Directeur de cette Thèse, je voudrais manifester ma profonde gratitude pour la confiance qu'il a placée en moi depuis le Master 1. Neuf (09) ans que j'évolue sous votre supervision et durant ces années j'ai beaucoup appris dans le domaine passionnant de la Microbiologie. J'ai

aussi pu voir à quel point vous êtes un scientifique brillant, perfectionniste doté de qualités humaines exceptionnelles. Je ne saurais jamais assez vous remercier pour vos conseils avisés qui ont été d'une valeur inestimable et m'ont permis de conduire à terme les activités de cette thèse. Trouvez, ici, l'expression de mon infinie reconnaissance.

Je suis très reconnaissant :

à M. KOFFI N'Goran Mathurin, Professeur Titulaire à l'Université Jean LOROUGNON GUEDE pour s'être intéressé au sujet de Thèse en acceptant de présider le jury de cette étude ;

à M.. KOUASSI Kra Athanase, Maître de Conférences à l'Université Jean LOROUGNON GUEDE, pour avoir exprimé de l'intérêt sur le sujet de la présente Thèse en acceptant d'examiner les travaux y afférents et de siéger parmi les membres du jury ;

à M. COULIBALY Noupé Dakaria, Maître de Recherche au CNRA de Bouaké, pour avoir montré de l'intérêt pour ce sujet de Thèse en consentant d'examiner ce travail et de siéger parmi les membres du jury ;

à M. ATTIEN Yao Paul, Maître de Conférences à l'Université Jean LOROUGNON GUEDE, pour s'être intéressé au sujet de Thèse en donnant l'accord d'en être rapporteur et de siéger parmi les membres de jury ;

à Mme ASSOHOON-DJENI Nanouman Marina Christelle, Maître de Conférences à l'Université Nangui Abrogoua pour avoir manifesté de l'intérêt pour sa participation à la conception de ce document, grâce aux corrections qu'elle y a apportées.

Je voudrais aussi remercier Messieurs GADJI Gabaze André et OSSEY Christian Landry, tous Chargés de Recherche au Programme Cultures Maraîchère et Protéagineuses pour leur soutien moral et leurs conseils avisés.

Un merci particulier aux enseignants-Chercheurs du Département Biochimie-Microbiologie de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE notamment à Messieurs ZEBRE Arthur et OUINA Toualy, tous Maître-Assistant pour leur aide et l'intérêt particulier qu'ils ont accordé à cette Thèse.

Que Messieurs OCHOU Ochou Germain et YAO Guy Fernand, respectivement Directeur de Recherche et Maître de Recherche au CNRA de Bouaké trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour avoir permis et facilité mes travaux au sein de leurs différents laboratoires.

Je voudrais également témoigner ma reconnaissance à Messieurs N'GUETTIA Jérémie et KANATE Issoufou, Techniciens Supérieurs ainsi que Messieurs KOUAME Kouakou Jean-Baptiste, KOUASSI Kouakou et BAMBA Ousmane, Auxiliaires Techniques et Ouvriers spécialisés au CNRA de Bouaké, pour l'assistance technique. Leur grande expérience m'a été profitable tant dans les manipulations au laboratoire que dans la conduite des essais sur les parcelles.

Je voudrais saisir cette opportunité pour témoigner toute ma reconnaissance à Messieurs AMANI Kouadio et OUATTARA Adama, Attachés de Recherche au CNRA, puis à M. ABE Allepo Innocent et Mlle GUEI Nassé Kaeda Raïssa, Assistants à l'Université Jean LOROUGNON GUEDE. Merci à vous chers aînés pour votre "coaching", vos conseils et votre précieuse aide qui ont permis la réalisation de ce mémoire.

Je suis redevable à tous les enseignants de l'UFR Agroforesterie de l'Université Jean LOROUGNON GUEDE de Daloa pour leur contribution à ma formation.

J'adresse mes remerciements au personnel de la Station de Recherche sur les cultures vivrières du CNRA de Bouaké qui a permis que mon stage se déroule dans la convivialité et la bonne humeur ainsi qu'à tous les journaliers avec qui j'ai eu du plaisir à travailler.

Un grand merci à M. YEO Katiénapariga Tayourou, Attaché de Recherche au Programme Anacarde, Mangue, Papaye et Karité du CNRA, pour sa disponibilité, sa franche collaboration, ses conseils, ses mots d'encouragements et de réconfort dans mes moments de désespoir et qui m'ont redonné confiance pour l'aboutissement de ce travail.

Je remercie mes compagnons Doctorants et Docteurs du CNRA de Bouaké qui m'ont aidé à mener à bien ce travail, notamment KOUAME Abenan N'guessan Marie France, KONAN Arthur Jocelyn, N'CHO Anthelme Jocelin et KOUADIO Marie-Fance N'da. Merci pour votre sens de fraternité, l'esprit de partage et la convivialité qui ont régné entre nous.

Mes sincères remerciements à M. KOFFI Franck Sidoine et SILUE Korotoumou pour toute l'aide et le soutien que vous m'avez apportés. Vous avez été d'un réel secours dans la réalisation et l'aboutissement de ce travail.

A feu mon père ATSE Yapi, merci serait un bien piètre mot pour t'exprimer ma reconnaissance pour tous les efforts consentis durant mes études. J'espère que cette Thèse qui marque l'achèvement de ces années de sacrifices t'a rendu fier.

A mes mamans N'GBA Botto Christine Marie et BROU N'din N'din Valentine, mes frères et sœurs ANGUIE Anguié Emmanuel, ATSE Chia Denise, ATSAIN Elise Rosina, N'GBA Djoman-Bié Françoise Olphise, SOANZE Marie Eunice et ATSE Ayèla Maie Prunelle Amiria, je voudrais dire que l'amour et le soutien infailible que vous m'avez toujours apporté ont été ma plus grande source de motivation.

A YEO Yépéry Anissa Giannie, ma fille, merci pour ta patience et ton amour. Que cette Thèse soit pour toi une référence.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ABI : Applied Biosystems
ACP : Analyse en Composantes Principales
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomique
ANOVA : Analysis Of Variance
ARN : Acide ribonucléique
ARNr : Acide ribonucléique ribosomique
ATP : Adénosine TriPhosphate
BLAST : Basic Local Arrangement Search Tool
CAH : Classification Ascendante Hiérarchique
CIAT : Centre International de l'Agriculture Tropicale
CMP : Cultures Maraîchères et Protéagineuses
CNRA : Centre National de Recherche Agronomique
CPS : Polysaccharide capsulaire
CTA : Centre Technique de coopération Agricole et rurale
CV : Coefficient de Variation
EPS : Exo polysaccharides
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAOSTAT : Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics
GPS : Global Positioning System
IBPGR : International Board for Plant Genetic Resources
JAS : Jour Après Semis
LCO : lipochito-oligosaccharides
LPS : Lipopolysaccharides
MCL : Maximum Composite Likelihood
MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MINADER : Ministère de l'Agriculture et le Développement Rural
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate
NCBI : National Center for Biotechnological Information
PCR : Polymerase Chain Reaction
PNIA : Programme National d'Investissement Agricole
RPC : Rhizobia isolé de *Phaseolus vulgaris* en Côte d'Ivoire
SRCV : Station de Recherche sur les Cultures Vivrières

UFR : Unité de Formation et de Recherche

UJLoG : Université Jean Lorougnon GUEDE

UPIL : Unité de Production d'Inoculum pour Légumineuses

WECABREN : West and Central Africa Bean Research Network

YEM : Yeast Extract Mannitol

YEMA : Yeast Extract Mannitol Agar

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : espèces de haricot cultivées et leur intérêt pour la sélection	8
Tableau II : différentes accessions de haricot sec utilisées.....	41
Tableau III : description des paramètres agro-morphologiques mesurés et observés	47
Tableau IV : origine des sols échantillonnés et leur précédant cultural	48
Tableau V : caractéristiques des pesticides utilisés	54
Tableau VI : variation des paramètres végétatifs de 35 accessions de haricot sec.....	64
Tableau VII : stades phénologiques (floraison et fructification) de 35 accessions de haricot	66
Tableau VIII : longueur de gousses, nombre de graines par gousse, poids de gousses par plant et rendement en gousses chez 35 accessions.....	68
Tableau IX : dimension des graines et poids de graines par plant de 35 accessions de haricot.....	70
Tableau X : variation du poids de 100 graines, du rendement en graine et de l'indice de récolte chez 35 accessions de haricot sec	72
Tableau XI : matrice de corrélation de Pearson (r) entre les paramètres agromorphologiques de 35 accessions de haricot sec	74
Tableau XII : valeurs propres et pourcentage de variation.....	76
Tableau XIII : caractéristiques principales des différents groupes formés par la CAH.....	80
Tableau XIV : nombre de nodules obtenus en fonction des sols échantillonnés.....	86
Tableau XV : nombre de nodules par plant induits par 22 isolats locaux évalués sur quatre accessions de haricot sec	89
Tableau XVI : nombre de nodules par plant induits par 22 rhizobia locaux évalués sur trois accessions de haricot sec	91
Tableau XVII : effet des rhizobia locaux sur le poids sec des nodules chez trois accessions de haricot sec	92
Tableau XVIII : matière végétale sèche générée par 21 isolats évalués sur trois accessions de haricot sec	94
Tableau XIX : effet du pH sur la croissance des isolats locaux du haricot sec.	97
Tableau XX : effet du chlorure de sodium sur la croissance des isolats locaux du haricot....	98
Tableau XXI : effet du chlorure de potassium sur la croissance des isolats.....	99
Tableau XXII : impact des pesticides sur la croissance des isolats.....	101
Tableau XXIII : effet des rhizobia locaux sur le diamètre au collet de trois accessions de haricot sec.....	112

Tableau XXIV : effet des rhizobia locaux sur la hauteur des plants de trois accessions de haricot sec.....	114
Tableau XXV : effet des rhizobia locaux sur la biomasse sèche de trois accessions de haricot sec.....	116
Tableau XXVI : nombre de nodules induits par des rhizobia sur trois accessions de haricot sec.....	118
Tableau XXVII : effet des rhizobia locaux sur le poids sec nodulaire de trois accessions de haricot sec.....	120
Tableau XXVIII : effet des rhizobia locaux sur le poids sec des gousses par plant chez trois accessions de haricot sec	122
Tableau XXIX : effet des rhizobia locaux sur le rendement en gousses chez trois accessions de haricot sec	124
Tableau XXX : effet des rhizobia locaux sur le rendement en graines chez trois accessions de haricot sec	126
Tableau XXXI : caractéristiques des séquences codantes de la région 16S des souches	134

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : quelques aspects morphologiques du haricot commun	11
Figure 2: arbre phylogénétique de l'ADNr 16S α -, β et γ -protéobacteries	18
Figure 3 : dialogue moléculaire Rhizobium-Légumineuse	26
Figure 4 : différents stades de développement des nodules	28
Figure 5 : carte des sites d'échantillonnage de sols	30
Figure 6 : carte de localisation des sites d'étude	38
Figure 7 : diagramme ombrothermique de la ville de Bouaké de 2020 à 2022.....	39
Figure 8 : dispositif expérimental de l'essai de caractérisation agromorphologique	44
Figure 9 : pots plastiques contenant les sols échantillonnés	49
Figure 10 : boîte de Pétri subdivisée en secteur	53
Figure 11 : dispositif expérimental de l'essai en condition de champ	56
Figure 12 : inoculum bactérien contenu dans un sachet de 100 g	57
Figure 13 : représentation des individus dans le plan des axes 1-2 de l'ACP	77
Figure 14 : classification ascendante hiérarchique de 35 accessions de haricot sec	79
Figure 15 : racines de plantes de haricot présentant des nodules	85
Figure 16 : coupe transversale de nodules de haricot	85
Figure 17 : colonies bactériennes obtenues après purification des isolats sur milieu YEMA	87
Figure 18 : aspect microscopique des isolats après la coloration de Gram (G×100).....	87
Figure 19 : efficacité symbiotique des isolats testés sur différentes accessions de haricot	95
Figure 20 : corrélations entre le nombre de nodules et la biomasse sèche chez trois accessions de haricot sec	96
Figure 21 : taux d'isolats tolérants aux pesticides	100
Figure 22 : image d'électrophorèse sur gel du gène de l'ARNr 16S amplifié de 10 isolats ..	131
Figure 23 : distribution des genres de <i>rhizobia</i> nodulant le haricot sec	135
Figure 24 : arbre phylogénétique déduit des séquences du gène de l'ADNr 16S des rhizobia isolés du haricot	135

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : milieu YEM.....	A
Annexe 2 : composition de la solution nutritive de Broughton & Dilworth sans azote	A
Annexe 3 : caractéristiques morphologiques des bactéries du haricot commun isolées	B

INTRODUCTION

Le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) est une légumineuse à graine appartenant à la famille des *Fabaceae*. C'est l'espèce la plus importante sur le plan économique au sein du genre *Phaseolus*. En effet, elle constitue plus de 90 % de la production mondiale de haricot et représenterait le tiers de la production mondiale des légumineuses (Uebersax *et al.*, 2023). L'espèce est cultivée dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées (FiBL, 2021). Elle est généralement cultivée pour ses graines sèches (haricot sec) ou ses gousses immatures (haricot vert) qui sont consommées cuites mais dans certaines régions, ses feuilles sont utilisées comme légume-feuille et plante fourragère. Le haricot sec est le légume sec le plus consommé au monde. En Côte d'Ivoire, les données sur la production nationale du haricot sec sont quasiment inexistantes (Ossey *et al.*, 2021). Cette légumineuse possède une richesse en protéines composées d'acides aminés essentiels comme la lysine, la phénylalanine et la leucine. En plus de sa richesse protéique, le haricot sec possède une teneur importante en fibres, glucides, vitamines et minéraux. Cette plante est riche en fer et zinc ; la carence de ces deux minéraux affecte plus de 2 milliards de personnes dans le monde (Mirindi *et al.*, 2018). Toutes ces caractéristiques font du haricot sec une denrée de bonne valeur nutritive et constitue de ce fait, une source protéique peu coûteuse dans l'alimentation des populations des pays en voies de développement (Ntamwira *et al.*, 2017). Par ailleurs, des études menées par Kouakou *et al.* (2013) ont démontré que cette légumineuse possède des propriétés anticancérigènes, antioxydantes et sa consommation permet de lutter contre les maladies cardiovasculaires ainsi que l'hypo-glycémie.

Malgré ses nombreux atouts, le haricot sec reste une ressource encore mal exploitée en Côte d'Ivoire. Son niveau de consommation est faible contrairement aux autres légumineuses alimentaires comme le soja, le niébé et l'arachide (PNIA, 2017). La raison qui pourrait expliquer cette situation est que la culture du haricot sec est marginalisée dans ses zones de productions (Noupé *et al.*, 2021). En effet, seules les femmes en milieu rural la pratiquent et uniquement que pour la consommation familiale. Aussi, ces dernières utilisent-elles des semences « tout-venant » avec de faibles rendements sans apport de fertilisants (MINADER, 2009).

Alors pour accroître les productions agricoles, les méthodes naturelles de restauration de la fertilité des sols (jachère) ont été abandonnées au profit de celles basées sur l'utilisation d'engrais et pesticides de synthèse. Ces intrants chimiques apportés au sol sont souvent inappropriés avec des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé humaine (Konaté *et al.*, 2015). Par contre, la technologie d'inoculation utilisant des rhizobactéries associées au

haricot commun pourrait constituer une source agroécologique de fertilisation pour accroître sa production et revaloriser sa culture.

Dans cette association symbiotique, les bactéries fixent l'azote atmosphérique et le transforment en ammoniacque assimilable par la plante. Cette dernière à son tour fournit aux bactéries des substrats énergétiques. La symbiose entre les rhizobia et les légumineuses produit plus de la moitié de l'azote qui provient de l'atmosphère (Shankar *et al.*, 2012) et représente une alternative à l'utilisation des intrants chimiques (Gholami *et al.*, 2012). Elle constitue ainsi un moyen économique et écologique pour améliorer la productivité agricole (N'Gbesso *et al.*, 2013).

Des études réalisées sous divers cieux ont montré qu'il existe des rhizobia efficaces, compétitifs et capables d'améliorer la production du haricot commun. Yadav *et al.* (2018) au cours de leurs travaux ont isolés des sols de l'Himalaya des rhizobia capables de noduler et d'améliorer la croissance du haricot commun. Au Kenya, Kawaka *et al.* (2014) ont démontré la présence de rhizobia locaux aux performances potentiellement supérieures aux inocula commerciaux et pouvant être exploités pour améliorer la culture du haricot. Si dans ces différents milieux, l'utilisation de rhizobia dans la culture du haricot commun a déjà été réalisée, ce n'est pas le cas de la Côte d'Ivoire où peu d'informations sur les rhizobia de cette plante sont disponibles. En Côte d'Ivoire, les études sur l'utilisation des rhizobia ont porté essentiellement sur le soja (Amani *et al.*, 2020) et le pois bambara (Gueï *et al.*, 2020). C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui a pour objectif général de contribuer à l'amélioration de la production du haricot sec par la mise à la disposition des producteurs des inocula de rhizobia efficaces. De façon spécifique, il s'est agi de :

- identifier des accessions de haricot commun les plus performantes ;
- constituer une collection de rhizobia locaux nodulant le haricot commun et adaptés aux conditions environnementales ;
- sélectionner les souches locales de rhizobia performantes compétitives capables d'améliorer la production du haricot commun ;
- Décrire la diversité spécifique des rhizobia sélectionnés par les outils de la biologie moléculaire.

Pour atteindre ces objectifs, quatre hypothèses ont été formulées à savoir :

- il existe des variétés de haricot introduites et/ou locales prometteuses ;

- une diversité de rhizobia locaux adaptés aux conditions environnementales et anthropiques locales établit une symbiose efficace avec le haricot commun ;
- ces rhizobia locaux améliorent la production des différentes variétés de haricot ;
- les rhizobia capable d'améliorer le rendement du haricot commun sont génétiquement diversifiés.

Le présent document est organisé en trois parties en plus de l'introduction, la conclusion, les perspectives de recherche et les références. La première partie consacrée à la revue bibliographique fait une synthèse de la littérature sur le haricot, les rhizobia et la symbiose rhizobia-légumineuse. La deuxième partie relative aux matériel et méthodes, décrit la zone de l'étude, le matériel utilisé et la méthodologie mise en œuvre pour la réalisation des expérimentations. Dans la troisième partie, les résultats obtenus suite aux différents essais réalisés sont exposés puis discutés.

Première partie : GENERALITES

1. HARICOT COMMUN (*Phaseolus vulgaris* L.)

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille des *Fabacées*. C'est la troisième famille de plante la plus importante par le nombre d'espèces après les *Astéracées* et les *Orchidées* (Schneider & Huyghe, 2015). Ces plantes sont caractérisées par des fleurs papilionacées (en forme de papillon) et une gousse contenant des graines. Elles ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique par l'établissement d'une relation symbiotique avec des bactéries fixatrices d'azote (Schneider *et al.*, 2015). Cette famille est très diverse et est subdivisée en trois (03) sous-familles que sont les *Mimosoideae*, regroupant des arbres, des arbustes ou des herbes, parfois grimpantes ; les *Césalpinoideae*, regroupant surtout des arbustes ornementaux et les *Papilionoideae*. La sous-famille des *Papilionoideae* représente des plantes herbacées et plus rarement les arbres et arbustes. C'est la plus large de ces trois sous-familles, avec 28 tribus différentes. Ce travail de thèse s'intéresse à l'espèce *Phaseolus vulgaris* (haricot commun), une légumineuse de la sous-famille des *Papilionoideae*.

1.1. Origine, domestication et distribution géographique

Le haricot commun est une plante originaire de la zone intertropicale d'Amérique (Chacón-Sánchez, 2018). Avant sa domestication, le haricot était une liane pérenne, avec des fleurs violettes, des gousses peu charnues, filandreuses et avec des graines de très petite taille. Il a été domestiqué simultanément dans 3 zones différentes à savoir : l'Amérique Centrale (Mexique, Guatemala...), le Nord et le Sud des Andes (Colombie, Venezuela, Equateur, Pérou, Bolivie, Nord du Chili et d'Argentine). Des preuves archéologiques ont indiqué que le haricot est une plante domestiquée depuis 6000 avant Jésus-Christ au Pérou et en 5000 avant J.-C. au Mexique. Puis, il a été transporté vers d'autres continents depuis le XVI^e siècle (Uebersax *et al.*, 2023). Le haricot commun fut introduit pour la première fois en Europe par Christophe Colomb qui le découvrit à Cuba (Nuevitas). En Afrique, elle serait due à des marchands portugais via Sofala (Mozambique), Zanzibar et Mombasa. La diversité génétique de la plante ainsi que des preuves linguistiques démontrent que la plante est devenue une culture essentielle d'abord dans les régions d'altitude de l'Afrique centrale (au Rwanda et au Burundi) avant les autres régions d'Afrique (Shamseldin & Velázquez, 2020).

Aujourd'hui, le haricot commun a une importance mondiale, en particulier en Amérique du Nord et du Sud, en Europe et en Afrique (Parker & Gepts, 2021).

1.2. Description de la plante

1.2.1. Description taxonomique

Le haricot commun appartient au genre *Phaseolus*. La première description botanique du haricot commun a été faite par les botanistes Tragus et Fuchs en 1542 sous le nom de *Smilax hortensi*. Le mot « haricot » désigne à la fois le fruit, la graine et la plante qui les produit. Il est dérivé de « ayacolt », nom de ce légume en nahuatl, langue parlée par les aztèques. Le nom générique de *Phaseolus* a été introduit par Linné en 1752 qui avait classé en deux espèces les haricots connus à son époque. Il s'agit de *Phaseolus vulgaris* et *Phaseolus nanus*, distinguant ainsi les formes grimpantes et les formes naines (De Ron *et al.*, 2015 ; Chávez-Servia *et al.*, 2016). Le genre *Phaseolus* comprenait plus de 200 espèces, mais en 1974, Verdcourt en a rattaché un grand nombre au genre *Vigna*. Finalement après plusieurs révisions, Deboucq, en 1988, a recensé 56 espèces dans ce genre. Quatre (04) espèces du genre *Phaseolus* seulement ont un intérêt agronomique. Ce sont *Phaseolus vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L. et *P. acutifolius* A (Tableau I). Cependant, *P. vulgaris* est l'espèce la plus largement cultivée (Porch *et al.*, 2013).

Règne	: Plantes (Plantae)
Sous-règne	: Tracheophytes (Tracheophyta)
Division	: Angiospermes (Magnoliophyta)
Classe	: Dicotylédones (Magnoliopsida)
Sous-classe	: Rosidae
Ordre	: Fabales
Famille	: Fabaceae
Sous-famille	: Faboideae
Tribu	: Phaseoleae
Sous-tribu	: Phaseolinae
Genre	: <i>Phaseolus</i>
Espèce	: <i>Phaseolus vulgaris</i>

Tableau I : espèces de haricot cultivées et leur intérêt pour la sélection

Nom botanique	<i>P. acutifolius</i>	<i>P. coccineus</i>	<i>P. lunatus</i>	<i>P. vulgaris</i>
Nom commun	Tepary bean	Haricot d'Espagne	Haricot de Lima	Haricot commun
Germination	Epigée	Hypogée	Epigée	Epigée
Caractéristiques	Petites gousses	Souvent grosses graines	Lignes radicales sur graines	Polymorphes
Zone de culture	Régions sèches	Tropicales d'altitude	Tropicales humides	Tropicales, tempérées
Intérêt pour la sélection	Résistante à la sécheresse et aux bactéries	Résistant aux basses températures et aux virus d'allogamie	Résistante à la sécheresse et aux bactéries	Résistant aux basses températures et aux virus d'allogamie
Photo des graines				

Source : Rana *et al.* (2015)

P : *Phaseolus*

1.2.2. Description botanique

1.2.2.1. Appareil végétatif

✓ Système racinaire

Phaseolus vulgaris L. est une plante herbacée annuelle, légèrement pubescente. La plante présente une racine principale pivotante à partir de laquelle de nombreuses racines secondaires de 10 à 15 cm se développent (Debouck, 2021). Les racines du haricot, comme celles de toutes les légumineuses, sont le siège du phénomène de nodulation provoquées par l'infestation par des bactéries du genre *Rhizobium* (Chávez-Servia *et al.*, 2016).

✓ Tige

C'est l'axe central de la plante et elle est formée par une suite de nœuds et d'entre-nœuds. Au niveau des nœuds se trouvent des feuilles et des bourgeons axillaires. La tige est herbacée et son diamètre est supérieur à celui des rameaux (Karavidas *et al.*, 2022). Elle tend à être verticale et anguleuse ou presque cylindrique et peut présenter des variations de couleur allant du vert au violet. Cependant, selon l'habitus de croissance de la variété, la tige peut être droite (haricots nains à port érigé), rampante (haricots à rames à port volubile) ou semi-rampante faisant du haricot une plante très polymorphe. Les haricots à rames ont une tige grimpante peu ramifiée et peuvent atteindre 2 à 3 m de hauteur. Les types nains sont les plus ramifiés avec un port buissonnant ou dressé de 40 à 60 cm de haut (Loko *et al.*, 2018).

✓ Feuilles

De couleur verte ou pourpre, elles sont attachées à la tige et aux rameaux en différents points (nœuds) par un pétiole. Des deux côtés de la gaine, se trouve deux petites lames vertes ou stipules qui constituent une caractéristique importante de la systématique des légumineuses (Martínez-Martínez *et al.*, 2018). Cette plante possède deux types de feuilles : les feuilles simples et les feuilles composées. Les feuilles simples (unifoliées) aussi appelées feuilles primaires sont opposées et apparaissent au premier nœud de la tige. Elles se forment dans la graine pendant l'embryogenèse et tombent avant que la plante soit complètement développée (Debouck, 2021). Les feuilles du haricot typique appelées feuilles adultes sont présentes à partir du troisième nœud. Elles sont trifoliolées (composées), alternées, habituellement ovales et mesurent entre 7,5 et 14 cm de long sur 5,5 à 10 cm de large. La foliole centrale ou terminale est symétrique et acuminée ; les deux latérales sont asymétriques et également acuminées (Rana *et al.*, 2015).

1.2.2.2. Appareil reproducteur

✓ Fleurs

Les fleurs sont hermaphrodites, zygomorphes, réunies en inflorescences axillaires ou terminales de 4 à 10 fleurs (Figure 1F), de couleur très variable selon les variétés allant du blanc verdâtre au carmin (Figure 1B), (Barikissou *et al.*, 2012). Le calice est campanulé avec les 5 sépales soudés tandis que la corolle est dite papillonacée et formée de cinq pétales inégaux et très différenciés. Les étamines quant à elles sont diadelphes. Neuf (09) d'entre elles sont soudées par le filet, la dixième étamine étant libre. L'ovaire est supère et formé d'un seul carpelle avec un placenta pariétale comportant une loge de quatre à huit ovules. Les fleurs, fermées (cléistogamie), favorisent une fécondation principalement autogame. Ce caractère contribue au le maintien de variétés stable en facilitant la sélection de lignées pures (Abid *et al.*, 2009).

✓ Fruits

Les fruits sont des gousses appelées également « cosses », déhiscentes, droites ou plus généralement courbes, à bec proéminent avec une section pouvant être cylindrique, ovale ou aplatie (Figure 1C), (Yathindra *et al.*, 2017). La cosse est charnue lorsqu'elle est immature, verte ou jaune, souvent rouge ou violette, de forme et de longueur variable, (8 à 20 cm de long et 1 à 2 cm de large). Elle comporte jusqu'à 12 graines par cosse, mais la plupart des variétés possèdent entre 4 et 6 graines (Das *et al.*, 2014).

✓ Graines

Les graines sont réniformes à globuleuses, oblongues ou ellipsoïdes, de longueur allant de 0,5 à 2 cm. Le tégument peut être noir, blanc ou revêtit de différentes nuances de jaune, brun, rouge ou rose, parfois à motifs marbrés ou panachés (Figure 1D) selon les variétés (Los *et al.*, 2018). Les parties extérieures les plus importantes de la graine sont le testa ou enveloppe qui correspond à la couche placentaire de l'ovule, le hyle ou cicatrice sur le côté concave laissée par le funicule qui unit la graine au placenta, le micropyle qui est une ouverture de l'enveloppe près du hyle (Figure 1E). C'est par cette ouverture que se produit l'absorption d'eau. En outre, les graines sont exalbuminées et composées d'un embryon à deux cotylédons volumineux. Dans ces cotylédons s'accumulent les réserves nécessaires au développement future de la plantule avant l'apparition des premières feuilles chlorophylliennes (Figure 1E), (Uebersax *et al.*, 2023). Les graines peuvent garder leur pouvoir germinatif trois à cinq ans après leur récolte. Leur germination est dite « épigée » (Figure 1A) car la croissance de l'hypocotyle entraîne le

déploiement des cotylédons hors du sol pendant que la racicule s'enfonce dans le sol (Figure 1A), (Punia *et al.*, 2020).

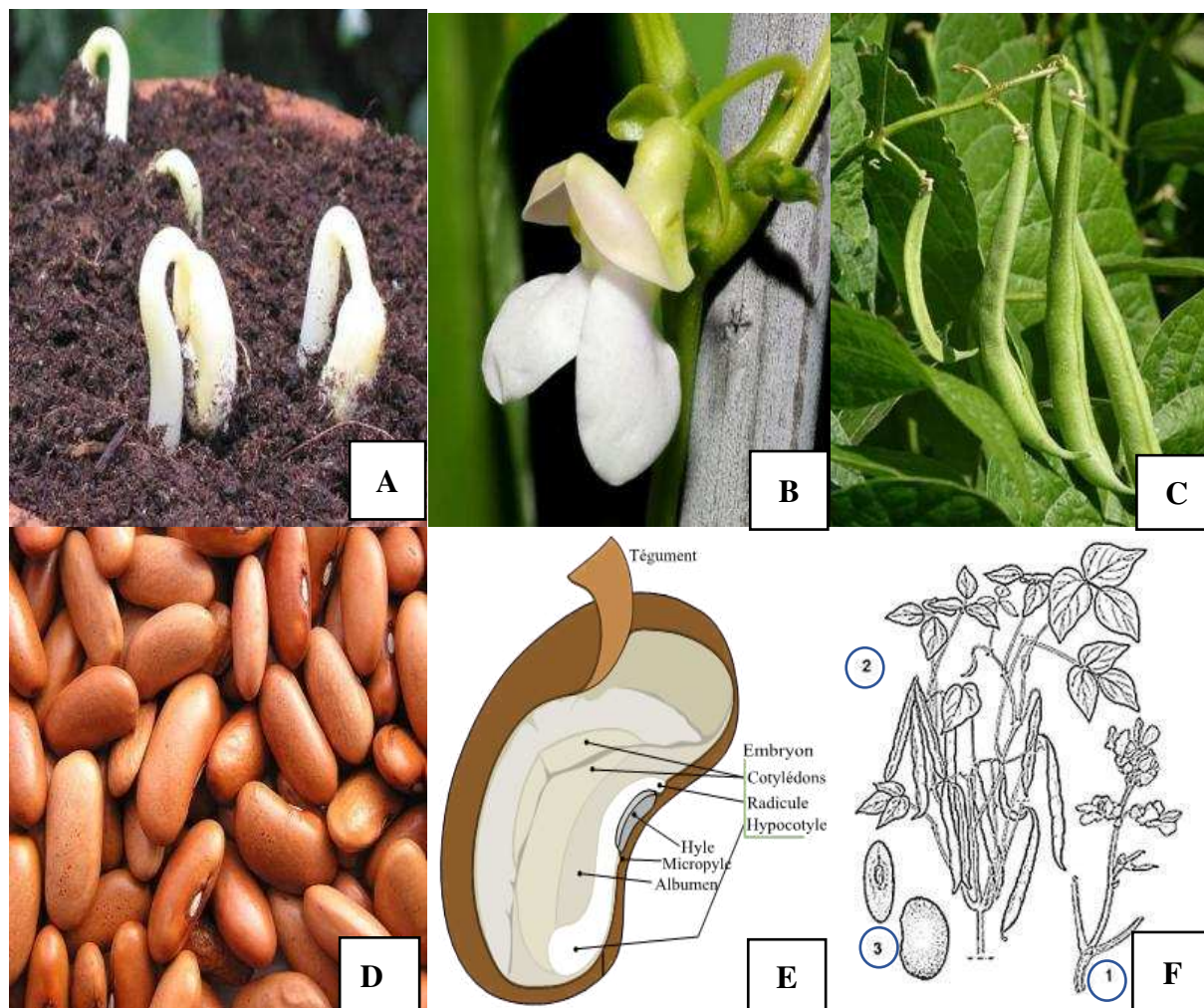


Figure 1 : quelques aspects morphologiques du haricot commun

A : germination épigée du haricot ; B : fleur ; C : gousses ; D : graines ; E : Structure de la graine ; F : quelques parties d'un plant de haricot 1, inflorescence ; 2, rameau en fruits ; 3, graines. (Uebersax *et al.*, 2023)

1.3. Ecologie de la plante

Les températures moyennes les plus idéales pour la culture du haricot se situent entre 15 et 23 °C. La plante peut supporter des températures allant jusqu'à 35°C, mais cela aboutit souvent à l'avortement des fleurs. Cependant, elle est sensible aux températures basses (Alemu, 2017).

La culture du haricot a besoin de 300 à 400 mm d'eau, régulièrement répartie, avec une période critique en début de floraison. La sécheresse provoque le flétrissement et la coulure des fleurs alors que l'humidité excessive favorise le développement des maladies cryptogamiques comme l'anthracnose et peut déclencher des chloroses en début du cycle. Le haricot préfère les sols à texture moyenne, bien drainés et aérés de plus de 0,5 m de profondeur (Renard *et al.*, 2007).

Il est sensible à l'acidité du sol, y compris les toxicités à l'aluminium et au manganèse qui lui sont associées. Le pH optimal est de 6 à 7,5 (Alemu, 2017).

1.4. Importance de la culture

1.4.1. Importance socio-économique du haricot

La production mondiale totale de haricot sec et la superficie récoltée en 2020 étaient respectivement de 27,5 millions de tonnes et de 34,8 millions d'hectares (Uebersax *et al.*, 2023). Les pays comme le Myanmar, l'Inde, le Brésil, la Chine, les États-Unis, le Mexique et la Tanzanie représentaient les deux tiers de la production mondiale de haricot sec. La Chine est le principal producteur de haricot sec (avec 17 millions de tonnes en 2011, soit 77% de la production mondiale totale), (FAO, 2022).

L'Afrique produit 26 % de la production mondiale de haricot sec dont 70 % est fournie par l'Afrique de l'Est et Central. En effet, l'espèce est bien établie dans plusieurs pays africains, mais c'est en Afrique centrale que sa culture est plus intensive. Les gros producteurs d'Afrique tropicale, avec des superficies cultivées variant de 100 000 à 600 000 ha par an, sont la République Démocratique du Congo, le Rwanda, le Burundi, l'Éthiopie, le Kenya, l'Ouganda, la Tanzanie, le Malawi, l'Angola et le Mozambique (CTA, 2010 ; Beebe *et al.*, 2014).

Le haricot prend une part importante dans la diète des populations dans la région des Grands Lacs comme le Burundi, la République Démocratique du Congo et le Rwanda où environ 50 à 60 kg de haricots secs sont consommés par an et par habitant représentant le record mondial de consommation. Contrairement à l'Éthiopie où 90 % de la production est commercialisée, la plus grande part des haricots secs produits en Afrique tropicale est autoconsommé (CTA, 2010). Malgré son importance, le haricot sec demeure une culture marginale en Côte d'Ivoire. Aucune donnée sur sa production nationale n'a pu être fournie par les statistiques (Ossey *et al.*, 2021).

1.4.2. Importance nutritionnelle

Le haricot est une denrée très nutritive qui contient de faibles teneurs en lipides et des teneurs très élevées en protéines. Les protéines des grains du haricot sont très proches de celle de la viande de mouton. Il constitue un aliment de base dans certains pays en développement, notamment en Amérique Latine et en Afrique orientale. En effet, le haricot joue un grand rôle dans la couverture des besoins alimentaires en protéines pour les populations de ces pays en compensant leur manque de source de protéines animales (De Ron *et al.*, 2015). Les grains du haricot constituent aussi un complément nutritionnel indispensable pour les régimes alimentaires à base de céréales (riches en méthionine) ou de tubercules amyliques (Nzungize,

2012), en leur apportant un ou plusieurs autres acides aminés essentiels dont la lysine. Il est également une bonne source de vitamines et de minéraux (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, thiamine, niacine et vitamine B6) ; ce qui permet de lutter contre la malnutrition infantile (Shang *et al.*, 2016).

1.4.3. Importance agronomique

La culture du haricot contribue à la fertilisation du sol à travers la fixation symbiotique de l'azote en association avec les bactéries du genre *Rhizobium* (Kumar, 2020). Le haricot peut s'intégrer dans le système de production biologique qui utilise la bio-fertilisation. A cet effet, il est utilisé avec d'autres légumineuses dans les systèmes de rotations culturales ou associé à d'autres cultures, particulièrement les céréales, afin d'améliorer le statut azoté du sol, de diminuer les coûts de fertilisation et de limiter la pollution. Il favorise le développement des mycorhizes qui améliorent la nutrition phosphatée des plantes lors d'une carence en phosphore, et augmente le degré d'infection des autres plantes par ces micro-organismes bénéfiques (Kazadi *et al.*, 2020).

1.4.4. Importance médicale

Utilisées en poudre ou en infusion, les gousses du haricot favorisent l'élimination urinaire et l'évacuation des toxines. Elles réduisent légèrement le taux de glucose dans le sang et sont indiquées dans le traitement du diabète. La poudre saupoudrée sur l'eczéma, calme les démangeaisons et assèche la peau (Huignard *et al.*, 2011).

1.5. Mode de consommation

La consommation du haricot se fait sous trois formes dont les grains secs, frais et les gousses (haricots verts). Dans certains pays occidentaux, le haricot est consommé sous forme de farine. Les feuilles aussi sont parfois consommées en Amérique centrale ou en Afrique comme aliment de disette (Celmeli *et al.*, 2018). Cependant, en raison de sa facilité de conservation, les grains secs sont la forme de haricot couramment utilisée (De Ron *et al.*, 2015).

1.6. Contraintes liées à la culture du haricot

La culture du haricot est sujette à de nombreuses contraintes qui peuvent entraîner d'importantes pertes de production. Ces pertes en Afrique tropicale s'estiment à plus de 50 % chaque année (Silué, 2009).

L'une des contraintes liées à la culture du haricot commun est la sélection inadéquate de ses semences. En effet, de nombreux agriculteurs ont des difficultés à trouver des variétés à bon

rendement et adaptées aux conditions locales. A cela s'ajoute, la gestion peu fiable des semences du fait d'un mélange de variétés (locales et améliorées) sur une même parcelle. Cette situation conduit progressivement à la perte des caractéristiques des variétés améliorées (FiBL, 2021).

Une autre contrainte à la culture du haricot est la dégradation du sol. La production de haricot en Afrique est fortement limitée par la faible fertilité des sols notamment en azote et en phosphore. Cependant, sous les tropiques, le haricot est fréquemment cultivé sur des sols marginaux caractérisés par une forte acidité, un faible capacité d'échange cationique et une forte désaturation. Par ailleurs, des éléments comme le Ca, Mo, Co, B, Cu et Zn sont soit déficitaires ou convertis en une forme non assimilable pour la plante alors que très indispensables pour assurer le potentiel d'assimilation symbiotique de la légumineuse (Lunze *et al*, 2012 ; Kanyenga *et al.*, 2016).

Aux contraintes sus-citées s'ajoutent les attaques dues aux ravageurs et maladies.

1.6.1. Ravageurs

Le haricot est ravagé par les acariens, les nématodes et aussi les insectes qui causent les dégâts les plus importants (Shoorooei *et al.*, 2018). Ils attaquent tous les stades de développement de la plante même jusqu'à l'entreposage. Les principaux insectes du haricot sont entre autre le ver des jeunes pousses (*Agrotis spp.*, *Spodoptera sp.*), l'asticot des jeunes tiges *Ohpiomyia phaseoli*, *O. spencerella*, *O. centrosematis*, le coléoptère des feuilles (*Ootheca bennigseni* et *O. mutabilis*), le boreur des gousses (*Helicoverpa amigera* et *Maruca vitrala*), la punaise des gousses (*Clavigralla sp.*), les aphides vecteurs du virus de la mosaïque du haricot (*Aphis sp.*), la mouche blanche (*Bemisia tabaci*) et la bruche du haricot stocké (*Acanthoscelides obtectus* et *Zabrotes subfasciatus*), (Buruchara *et al.*, 2010).

1.6.2. Maladies

Le haricot commun est particulièrement sensible aux maladies. Il est sujet à l'attaque de nombreuses maladies virales, fongiques et bactériennes. Celles-ci sont extrêmement variées et sont aussi à l'origine de faibles rendements de la culture du haricot dans les pays en voie de développement (Tang & Feng, 2023). Parmi celles-ci, la maladie des tâches anguleuses des feuilles est la plus importante et celle qui affecte la production du haricot en Afrique (Etana, 2022). Elle est causée par le champignon *Phaseo isariopsis griseola* ou *Isariopsis griseola* et est très répandue car aussi présente dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique Centrale et du Sud (Worrall *et al.*, 2015).

1.7. Moyens de lutte

La lutte contre les ravageurs et les maladies repose sur la combinaison de différentes méthodes. Ce sont entre autres l'emploi de variétés tolérantes et de semences saines indemnes de germes pathogènes ou traitées par des fongicides, la rotation culturale, l'irrigation maîtrisée et sans excès et l'emploi de fongicides et d'insecticides adaptés (Barrera *et al.*, 2022). De récentes recherches ont mis en évidence des sources de résistance de certaines espèces de haricot *vis-à-vis* de certaines pathologies. C'est le cas de la maladie des tâches anguleuses où des espèces tolérantes de haricot ont été identifiées dans la collection de *P. vulgaris* du CIAT et aussi à l'intérieur des espèces *P. coccineus* et *P. polyanthus* (Delhove *et al.*, 2023). Aussi, des sélectionneurs ont développé une résistance durable à la rouille du haricot et mis en évidence l'existence des sources de résistance à l'anthracnose, à la fonte de semis, à la mosaïque commune du haricot (Meziadi *et al.*, 2017 ; Singh *et al.*, 2020 ; Ketta & Hewedy, 2021).

En Côte d'Ivoire, la méthode employée contre les maladies et ravageurs du haricot vert est basée sur la lutte chimique. L'utilisation de fongicides et d'insecticides sont les premiers moyens de lutte. Des méthodes culturales sont conseillées aux producteurs, mais elles ne sont pas toujours suivies (Goudjo *et al.*, 2023).

1.8. Itinéraires techniques de la culture

1.8.1. Préparation du sol

La préparation du sol se fait par le défrichage, l'abattage des arbres, le sarclage, le labour (20 à 25cm de profondeur), (Delhove *et al.*, 2021).

1.8.2. Semis

La densité de semis diffère selon que l'on cultive le haricot en association ou en culture pure. Le semis peut se faire à la main ou par les engins agricoles. En culture pure, la distance de plantation est de 20 cm x 40 cm. En respectant cette marque de plantation et en semant deux graines par poquet, la densité de semis est estimée à 250 000 pieds par hectares. En culture associée avec le maïs, par exemple, l'on procédera par une distance de plantation de 15 cm x 90 cm si le maïs est semé avec une distance de 50 cm x 90 cm. Ce qui suppose que l'on aura deux (02) plants de haricot entre deux (02) pieds de maïs sur la ligne. En semant deux graines par poquet, l'on aura 150 000 pieds/ha (Miklas *et al.*, 2022).

1.8.3. Fertilisation du sol

Pour se développer, le haricot produit en symbiose avec les rhizobia une bonne partie de l'engrais dont il a besoin. Il produit surtout de l'azote. Un apport d'engrais riche en phosphore et surtout en élément potassique est conseillé au moment du semis à raison de 200 kg à l'hectare (Uebersax *et al.*, 2022).

1.8.4. Entretien de la culture

1.8.4.1. Irrigation

En plein champ, les besoins en eau de la culture sont très importants après semis pour assurer une homogénéité dans la levée et dans la qualité de la récolte. En contre saison, l'irrigation est importante au moment de la floraison et de la fructification pour assurer la qualité des gousses. L'irrigation peut se faire par aspersion ou par voie gravitaire (Augagneur *et al.*, 2022).

1.8.4.2. Désherbage

Il est conseillé de faire deux (02) sarclages. Le premier sarclage se fait 2 à 3 semaines après le semis et le deuxième après 5 à 6 semaines. (Delhove *et al.*, 2021).

2. RHIZOBIA

La fixation biologique de l'azote est un processus permettant la production de substances protéiques à partir de l'azote atmosphérique (Mendoza-Suárez *et al.*, 2020). C'est une voie importante d'entrée de l'azote dans le cycle biogéochimique. Différents microorganismes sont capables de fixer l'azote atmosphérique sans être en association symbiotique tels que les microorganismes libres (*Azospirillum*, *Azotobacter*). La fixation d'azote étant énergétiquement coûteuse, certaines espèces de microorganismes effectuent cette réaction lors d'interactions symbiotiques avec des plantes. Ce sont les fixateurs symbiotiques. Cette partie de la généralité est consacrée à la présentation de ces bactéries notamment celles associées au haricot ainsi qu'à l'étude de leur diversité.

2.1. Découverte et taxonomie

Rhizobium, du grec rhiza : racine et bios : vie est un terme générique dérivé du premier genre bactérien *Rhizobium* décrit au XIX^{ème} siècle comme des bactéries qui vivent dans le sol avec le potentiel de noduler des légumineuses (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2015). En effet, le premier isolement et la première culture pure de bactéries fixatrices d'azote à partir d'un nodule de légumineuse remonte à la fin du XIX^{ème} siècle par Beijerinck (Coba de la Peña *et al.*, 2018). L'année suivante, cette bactérie est appelée *Rhizobium leguminosarum* (Sachs *et al.*, 2018). Les différentes espèces de *Rhizobium* découvertes ensuite ont été nommées en fonction de leur légumineuse partenaire. Par exemple, les bactéries à croissance rapide issues de *Phaseolus vulgaris* (haricot) sont nommées *R. phaseoli* et celles extraites de nodules de *Trifolium* sp. (trèfle) sont appelées *R. trifolii*. *R. lupinii* quant à lui est associé au genre *Lupinus* (Poole *et al.*, 2018). Une cinquantaine d'années plus tard, un nouveau genre a été créé pour rassembler les bactéries à croissance lente tel que le genre *Bradyrhizobium* (Via *et al.*, 2016). Ainsi, le genre *Rhizobium*, composé de trois (03) espèces (*R. melitoli*, *R. loti* et *R. leguminosarum*) est caractérisé par une croissance rapide. Le genre *Bradyrhizobium*, quant à lui, est composé de 2 espèces (*B. japonicum* et *Bradyrhizobium* sp) et se caractérise par une croissance lente. La découverte de *R. fredii*, une bactérie à croissance rapide capable d'induire des nodules chez le soja, a montré qu'une légumineuse pouvait s'associer à des espèces de rhizobia très différentes, remettant alors en question le critère de nomenclature des rhizobia en fonction de leur hôte (Thilakarathna & Raizada, 2017). L'espèce *Rhizobium fredii* a par la suite été incluse dans un deuxième genre de bactéries à croissance rapide, le genre *Sinorhizobium* (Masson-Boivin & Sachs, 2018).

Grâce aux progrès technologiques utilisés en taxonomie qui se basent sur des critères morphologiques, physiologiques ainsi que sur l'analyse des séquences d'ADN, des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques sont aujourd'hui connues pour leur capacité symbiotique (Frache *et al.*, 2009). Plus de 70 espèces de rhizobia sont alors identifiées et réparties dans 12 genres différents regroupés en 2 classes dont les α -protéobactéries et les β -protéobactéries. La plupart des bactéries nodulant les légumineuses appartiennent à la classe des α -protéobactéries et se répartissent au sein de 10 genres bactériens. Ce sont *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* et *Shinella* (Figure 2). Les β -protéobactéries contiennent 2 genres bactériens qui nodulent les légumineuses. Il s'agit des genres *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Figure 2), (Gyaneshwar *et al.*, 2011).

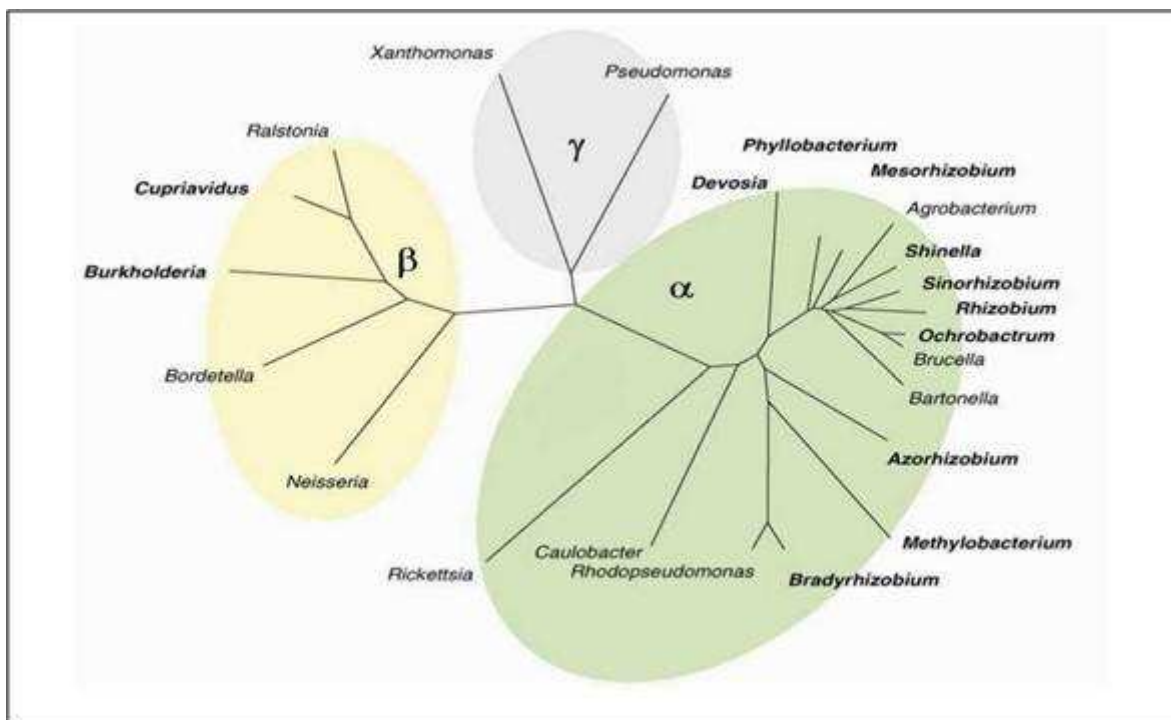


Figure 2: arbre phylogénétique de l'ADNr 16S α -, β et γ -protéobactéries
Les genres en gras contiennent les rhizobia nodulant les légumineuses
(Source : Masson-Boivin *et al.*, 2009)

2.2. Caractérisation morphologique et diversité écologique des rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries telluriques, à gram négatif, non sporulées, hétérotrophes, strictement aérobies, appartenant à la famille des rhizobiaceae et mobiles à l'état jeune, bacilles (0,5 μ m de diamètre et 1,2 à 3 μ m), (Nakei *et al.*, 2022). Ils se développent bien dans le sol et sont généralement présents dans la terre cultivée. Etant mésophiles, leur température optimale de croissance se situe entre 25 et 30°C. La plupart des rhizobia préfère la neutralité du pH.

D'autres par contre tolèrent les pH acides. C'est le cas de *Bradirhizobium japonicum* qui supporte des pH de l'ordre 3,5 à 4 ; ou alcalin jusqu'à pH 12 (Wekesa *et al.*, 2022). Le YEM (Yeast Extract Manitol) est le milieu d'isolement et de culture des rhizobiums qui forment sur milieu gélosé des colonies bombées, incolores, blanchâtres ou crémees. Leur présence dans les sols pauvres et dégradés des climats arides et semi arides témoigne de leur parfaite adaptation aux conditions défavorables de l'environnement.

2.3. Spécificité d'hôte

Les spécificités d'interaction entre les rhizobia et les légumineuses est l'une des principales caractéristiques de la symbiose. Dans cette symbiose, le partenaire bactérien n'est capable de s'associer qu'avec un nombre plus ou moins important de légumineuses hôtes (Akter *et al.*, 2013). Inversement, une espèce de légumineuse donnée ne pourra établir une association symbiotique qu'avec une ou plusieurs espèces de Rhizobia. Cette association définit le spectre d'hôtes de la légumineuse. Ces spécificités d'hôte sont généralement dépendantes de la composition des exsudats racinaires produit par la plante, ainsi que la nature de déterminants moléculaires sécrétés par les rhizobia appelés facteurs Nods (Andrews & Andrews, 2017). Il est aussi possible que des souches d'une même espèce nodulent des légumineuses taxonomiquement éloignées. Ainsi la notion de symbiovar (sv) a été introduite pour différencier les bactéries d'une même espèce mais qui possèdent une gamme d'hôte différente (Chen *et al.*, 2021). L'espèce *Rhizobium leguminosarum* est probablement l'une des plus connues avec les symbiovars *viciae* pour le genre *Vicia*, *trifolii* pour le genre *Trifolium* et *phaseoli* pour le genre *Phaseolus* (Hassen *et al.*, 2020).

2.4. Rhizobia associés au haricot

Le terme *Bacillus-Phaseolus* a été appliqué au *Rhizobium* du haricot par Beijerinck afin de le distinguer de toutes les autres souches de *Rhizobium* (Shamseldin & Velázquez, 2020). Plus tard, Schneider proposa le nom de *Rhizobium frankii* var *majus* pour les rhizobia symbiotiques en les distinguant de *Rhizobium frankii* var *minus* pour *P. vulgaris* (Andrews & Andrews, 2017). Cependant les désignations de Schneider n'étaient pas valables sur le plan taxonomique et *Rhizobium phaseolus* devient la forme acceptée en 1926 (Poole *et al.*, 2018). C'était l'une des 10 espèces du genre *Rhizobium* décrit par Dangeard (1926) dans une nouvelle tribu des Hyphodea de la famille des *Bacteriaceae*.

Selon la littérature, les souches de rhizobia nodulant le haricot peuvent être séparées en deux groupes.

Le premier groupe contient les rhizobia qui forment des nodules effectifs chez le haricot. Ce sont *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Pattnaik *et al.*, 2019 ; Chen *et al.*, 2021), *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. etli*, *R. tropici*, *Rhizobium* sp. BR816, GRH2, et *Rhizobium* sp. NGR234. Le second groupe contient les rhizobia qui sont capables de former des nodules ineffectifs tels que *B. japonicum*, *A. caulinodans*, et *R. leguminosarum* bv. *viciae* (da-Silva *et al.*, 2017 ; Goyal *et al.*, 2021).

2.5. Etude de la diversité des rhizobia

Plusieurs méthodes basées sur des caractéristiques phénotypiques et génotypiques ont été utilisées pour étudier la diversité des rhizobia.

2.5.1. Méthodes phénotypiques

L'information phénotypique est donnée par les protéines bactériennes et repose principalement sur la détermination des caractéristiques morphologiques, biochimiques, symbiotiques et physiologiques des bactéries *via* des techniques standardisées (Rajkumari *et al.*, 2022). Les méthodes couramment utilisées pour l'identification bactériennes sont les tests phénotypiques classiques. Ces tests concernent la caractérisation de la cellule et de la colonie bactérienne (Ditzeno *et al.*, 2022). Ils sont aussi basés sur la détermination de l'activité de différents enzymes et indiquent la capacité infective, effective, compétitive d'une souche donnée. Ils reposent également sur la détermination de la vitesse de croissance de la bactérie, la croissance en présence de substrats donnés et différentes variations de température, du pH, de sels, d'antibiotiques, de métaux lourds ou à d'autres facteurs de l'environnement (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2015 ; Chen *et al.*, 2021).

Les tests phénotypiques classiques sont toujours admis comme étape primordiale pour la description et l'identification des souches d'une même espèce. Cependant pour certaines bactéries, le manque de caractéristiques phénotypiques pose souvent des problèmes pour leur description ou leur différenciation (Lorite *et al.*, 2018). Dans ces cas, les méthodes génétiques ou chimiotaxonomiques sont nécessaires pour identifier de manière sûre les souches. Ainsi, le développement des systèmes miniaturisés et automatisés a rendu plus aisée la classification des microorganismes par l'approche phénotypique. Ce sont la composition des parois cellulaires, FAME (Fatty Acid Methyl Ester ») ou analyse des acides gras cellulaires, SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), des protéines cellulaires totales, MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis), les systèmes commerciaux miniaturisés (Galerie API, BIOLOG...), (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2015 ; Legesse, 2016 ;

Dicenzo *et al.*, 2022 et Rajkumari *et al.*, 2022) :

- la composition des parois cellulaires est une approche qui peut servir à la caractérisation des bactéries mais elle est utilisée plutôt pour les bactéries à gram-positif, car la composition de leur paroi contient une variabilité d'éléments informatifs.
- La cellule bactérienne contient plus de 2000 protéines différentes, source importante d'information pour la connaissance de la position taxonomique d'un organisme bactérien. Alors, la méthode SDS-PAGE consiste en l'extraction des protéines cellulaires totales que l'on fait ensuite migrer sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. On obtient ainsi des profils caractéristiques de chaque souche bactérienne.
- La méthode FAME consiste en l'extraction des acides gras totaux de la cellule bactérienne et l'obtention de profils d'acides gras qui sont caractéristiques de la souche étudiée. Cependant, cette méthode doit procéder à une standardisation du milieu et des conditions de culture, car la composition d'acides gras dans les cellules peut varier selon les conditions environnementales.
- La technique MLEE est une méthode puissante qui consiste à extraire et charger sur gel d'amidon des enzymes bactériennes (qui permet un meilleur découpage des bandes que le gel de polyacrylamide). Ensuite les bandes sont mises dans des solutions pour révéler la présence ou l'absence d'une enzyme. Dans le cas où l'enzyme est présente, sa mobilité est comparée pour les différents isolats.
- Les systèmes commerciaux miniaturisés (Galerie API, BIOLOG...) sont une batterie de tests de caractérisation de microorganismes en présence de substrats (croissance, activité enzymatique...). Très pratiques d'utilisation et performants, ces systèmes permettent de créer des bases de données intéressantes. Cependant ils restent coûteux et leur fabrication n'est pas assurée dans le temps.

2.5.2. Méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires ciblent directement les acides nucléiques bactériens (ADN ou ARN) pour étudier la localisation ou la variabilité en séquence des gènes ou de fragments de gènes. Elles sont actuellement les méthodes dominantes de la taxonomie moderne, conséquence des progrès technologiques (Lardi & Pessi, 2018 ; Tounsi-Hammami *et al.*, 2019).

Les techniques (marqueurs) les plus utilisées chez les rhizobia sont la détermination du pourcentage guanine + cytosine (% G + C), l'hybridation ADN : ADN, la caractérisation plasmidique, la technique PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), la méthode LMW (Low Molecular Weight) et le séquençage de l'ADNr 16S (Yoneyama *et al.*, 2019) que nous nous

limiterons à décrire car utilisée dans le cadre de notre étude.

Les séquences d'ADN ribosomiaux (ADNr 23S, 16S et 5S) présentes sous forme d'opérons sont des marqueurs évolutifs relativement robustes de l'ensemble du génome. Ces séquences sont utiles pour l'étude des relations phylogénétiques et l'évolution des espèces microbiennes au cours du temps chez tous les microorganismes (Rajkumari *et al.*, 2022). Ces opérons peuvent être présents en un ou plusieurs exemplaires sur le chromosome. C'est principalement l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S qui est le marqueur moléculaire le plus utilisé dans l'analyse des relations phylogénétiques bactériennes au niveau genre et espèce (Helene *et al.*, 2022). Ce gène a comme avantage d'être présent chez toutes les bactéries, d'être constitué de domaines hautement conservés entourant des domaines variables, de présenter une taille d'environ 1500 pb aisément séquençable et de fournir une séquence suffisamment informative (Saranraj *et al.*, 2021). Ces régions hautement conservées servent de cibles pour des amorces dites "universelles" pour l'amplification *in vitro* par PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage (Diédhiou & Diouf, 2018). Dans les années 1990, l'ADN 16S est devenu le marqueur taxonomique le plus important chez les rhizobia conduisant à la répartition des genres inclus dans la famille *Rhizobiaceae* et la création d'un nouvel ordre appelé "rhizobiales" proposé dans le *Bergey's Manual* (Kuźniar *et al.*, 2019). Ainsi l'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S est très utile pour classer les bactéries dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce. Lahry *et al.* (2024) ont montré qu'en dessous de 97% de similarité de séquences ARNr 16S, deux souches représentent potentiellement des espèces différentes. Plusieurs chercheurs ont utilisé l'ADNr comme une approche rapide pour évaluer la variabilité génétique entre les souches de rhizobia (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2018 ; Ponndara *et al.*, 2024). Des études portant sur le séquençage d'autres gènes de ménage ont été utilisées pour détecter et identifier les espèces bactériennes (Stackebrandt *et al.*, 2002 ; Maiden, 2006).

2.6. Phylogénie moléculaire et méthodes phylogénétiques

2.6.1. Phylogénie moléculaire

La phylogénie est une discipline émergente qui permet d'étudier les espèces afin de les classer en fonction de leur ressemblance phénotypique ou en fonction de leur séquence génétique (Nelson & Sadowsky, 2015). Elle est l'histoire évolutive qui révèle les rapports existants entre un groupe d'organismes avec un ancêtre situé à un plus haut niveau taxonomique. La comparaison des données obtenues pour les souches ou les espèces par différentes approches moléculaires permet l'identification de groupes ou de taxons. Les différents taxons obtenus peuvent alors être comparés et utilisés pour le traçage de lignées de filiation reconnues

communément sous le nom d'arbre phylogénétique. Les relations phylogénétiques établies entre les rhizobia sont actuellement basées principalement sur la comparaison des séquences de l'ADN ribosomique 16S (Stępkowski *et al.*, 2018).

2.6.2. Méthodes phylogénétiques

L'analyse en phylogénie moléculaire génère des arbres phylogénétiques. Ces derniers schématisent donc les liens unissant les taxons (ou organismes). Les feuilles de l'arbre sont représentées par les séquences connues des taxons. Sur les nœuds intermédiaires figurent les ancêtres à l'origine de ces taxons et dont les séquences sont inconnues (Montiel *et al.*, 2018). Les taxons se situant après un nœud intermédiaire dans l'arbre forment des clades. Enfin, un arbre peut être enraciné si l'ancêtre commun de toutes les séquences étudiées a pu être déterminé préalablement (Michaud, 2012).

Il existe plusieurs méthodes de reconstruction permettant d'inférer un arbre phylogénétique. La première est basée sur l'observation simple de la distance entre des séquences prises deux à deux. La méthode des distances est représentée par la méthode UPGMA (tombée en désuétude), (Mustaq *et al.*, 2024) ainsi que la méthode de Neighbor-Joining (NJ), (Lachance, 2022). Ces méthodes construisent des arbres non enracinés en incrémentant les séquences en fonction de leur proximité avec les précédentes. Elles suivent un modèle évolutif explicite, c'est-à-dire basé sur l'observation des mécanismes évolutifs à l'œuvre. La seconde s'intéresse à l'état des caractères qui divergent à chaque site des séquences (les colonnes de l'alignement), c'est-à-dire qu'elle prend en compte la nature et la position des substitutions (transversion, transition, indel).

C'est le cas des méthodes de maximum de parcimonie, de maximum de vraisemblance et d'inférence bayésienne. Ces dernières peuvent être subdivisées en deux groupes : le maximum de vraisemblance et l'inférence bayésienne, qui construisent un arbre phylogénétique en suivant un modèle explicite d'évolution, tout en calculant la probabilité de l'organisation des branches de l'arbre, ainsi que de la longueur de ces branches. Ces méthodes génèrent des arbres enracinés puisque les modèles appliqués tiennent compte de la flèche du temps. Le maximum de parcimonie, quant à lui, ne suit pas de modèle explicite d'évolution, puisqu'il se borne à comptabiliser le nombre de « pas mutationnels » nécessaires pour passer d'une séquence à une autre au sein de l'arbre (Shaktawat & Bhurani, 2019 ; Vaz *et al.*, 2021).

3. SYMBIOSE RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE

Les symbioses fixatrices d'azote font intervenir les légumineuses et les Rhizobia. Dans ce chapitre, ont été présenté le mécanisme d'établissement de cette symbiose et les facteurs qui limitent son fonctionnement.

3.1. Définition de la symbiose

Etymologiquement, le terme symbiose signifie vivre avec. Au sens large, une symbiose implique au minimum deux organismes vivants dont l'association stable dans le temps existe sous trois (03) aspects suivants les bénéfices retirés par l'un ou l'autre des partenaires. Le parasitisme profitera à l'un des partenaires au détriment de l'autre. Le commensalisme définit une symbiose où l'un des partenaires tire profit de son association à l'autre sans lui nuire. Enfin, le mutualisme représente une association à bénéfice réciproque. Il devient alors possible pour les deux partenaires de pouvoir se développer ensemble dans un environnement hostile ou peu adapté (Masson-Boivin & Sachs, 2018 ; Goyal *et al.*, 2021). La symbiose au sens strict est la relation étroite bénéfique et réciproque entre deux organismes différents qui vivent ensemble. Dans cette relation, le partenaire de plus grande taille est appelé hôte (ou macro-symbiote) et celui de plus petite taille est nommé symbiote ou micro-symbiote (Walker *et al.*, 2020).

Certains végétaux supérieurs ont acquis au cours de leur évolution la capacité d'établir des associations symbiotiques avec des microorganismes du sol. Cette association est connue sous le nom de la symbiose rhizobium-légumineuse (Jaiswal *et al.*, 2021). Elle a pour but d'améliorer l'acquisition des nutriments essentiels au développement des légumineuses et a lieu à l'intérieur de cellules spécialisées de la racine de l'hôte végétal, les nodosités (Remigi *et al.*, 2016). En effet, c'est au sein de ces dernières que les bactéries fixent l'azote atmosphérique, grâce à leur activité nitrogénase, et le transfèrent sous une forme combinée assimilable à la plante (azote ammoniacal ou ammoniac). En contrepartie, la plante fournit aux bactéries des substrats carbonés provenant de la photosynthèse (Chen *et al.*, 2021). C'est donc un indubitable échange bénéfique et réciproque entre les deux partenaires.

3.2. Intérêts de la symbiose *Rhizobia*-légumineuses

Cette symbiose permet à la légumineuse de se développer sur des sols carencés en azote et est le facteur principal à l'origine du succès des Fabacées parmi les végétaux (Fossou *et al.*, 2012). La symbiose fournirait un cadre de reproduction idéal qui favoriserait l'évolution des bactéries tout comme l'augmentation de la population des rhizobia spécifiques à la légumineuse hôte après culture au niveau du sol (Schneider *et al.*, 2015).

La fixation de l'azote représente la plus grande part des apports d'azote au sol concourant ainsi à la restauration de la fertilité azotée des sols (Bargaz *et al.*, 2012). En effet, la moitié de la fixation biologique d'azote est réalisée par cette symbiose, avec un taux allant de 10 à 300 kg d'azote fixé par hectare et par an (Lindström *et al.*, 2010). Elles contribuent ainsi à réduire l'utilisation des intrants azotés et est un excellent antécédent cultural à introduire dans les systèmes culturaux (N'gbesso *et al.*, 2013).

3.3. Etapes de la fixation symbiotique

La mise en place de la symbiose rhizobium-légumineuse se caractérise par 3 étapes principales (Bano & Iqbal, 2016 ; Liu *et al.*, 2020) :

- le dialogue entre les deux partenaires symbiotiques ;
- l'infection de la racine par la bactérie ;
- la formation d'un nouvel organe racinaire, la nodosité, au sein duquel se déroulent la réduction et la fixation de l'azote atmosphérique.

3.3.1. Dialogue moléculaire et reconnaissance

La symbiose rhizobium-légumineuse débute par une reconnaissance mutuelle faisant intervenir un dialogue moléculaire entre les deux partenaires (Figure 3), (Sharma *et al.*, 2020). La plante hôte sécrète dans le sol des composés tels que des glucides, des acides organiques ainsi que différents dérivés phénoliques pouvant induire des changements sur le microbiote du sol. Parmi ces composés des flavonoïdes (flavone, chalcone, isoflavonoïdes ...) sont reconnus spécifiquement par des protéines régulatrices bactériennes, majoritairement les protéines NodD. Cette reconnaissance représente un premier niveau de spécificité de la symbiose. Les rhizobia sont alors attirés vers les racines des légumineuses par chimiotactisme (Menéndez *et al.*, 2017). Une fois les flavonoïdes reconnus par le récepteur NodD, celui-ci va induire l'expression coordonnée des gènes de la nodulation (gènes nod, noe et nol communément rassemblés sous le terme gènes nod) par l'intermédiaire de boîtes régulatrices (nod-box) situées en amont des gènes nod (Shumilina *et al.*, 2023). Les produits des gènes nod sont impliqués dans la biosynthèse de lipochitoooligosaccharides (LCO) appelés facteurs Nod. Les facteurs Nod sont perçus par la plante à de très faibles concentrations d'environ 10^{-4} nM grâce à la présence des récepteurs membranaires LysM-RKs (Gough & Cullimore, 2011). Cette perception induit chez la plante de multiples réponses et permet simultanément la courbure des poils absorbants racinaires, l'induction d'un méristème et la formation des nodules chez la plante. Elle représente

un second niveau de spécificité de la symbiose (Coba de la Peña *et al.*, 2018 ; García-Calderón *et al.*, 2020).

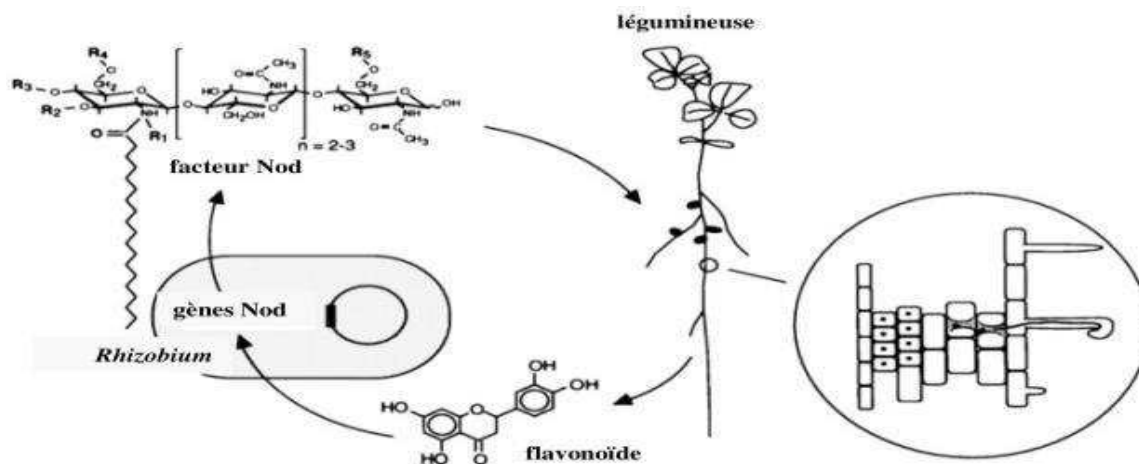


Figure 3 : dialogue moléculaire Rhizobium-Légumineuse

Le zoom montre un cordon d'infection allant le cortex racinaire vers un groupe de cellules en division, qui deviendra le primordium nodulaire (Lindström *et al.*, 2010)

3.3.2. Infection bactérienne

Il existe une variabilité de type d'infection des légumineuses par les rhizobia. Ces infections peuvent se faire *via* trois mécanismes distincts.

Le premier mode d'infection, se fait par voie intercellulaire connue sous le nom de crack entry. L'infection se fait généralement au niveau de passages libérés par l'émergence des racines latérales ou adventives, par des blessures ou parfois directement à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme (Xu & Wang, 2023). Ce mode d'infection est connu chez de nombreuses légumineuses d'origine essentiellement tropicale ou sub-tropicale telles que *Arachis hypogaea* (Sharma *et al.*, 2020).

Le second mode d'infection est observé chez *Mimosa scabrella*, *Lupinus* spp et *Listia* spp. Lors de cette infection, les rhizobia pénètrent directement entre les cellules épidermiques non endommagées en dissolvant la lamelle moyenne des parois cellulaires radiales et envahissent les cellules hôtes à travers des structures semblables à des cordons d'infection (Czernic *et al.*, 2015).

Le dernier mode d'infection est le mode le plus courant et le plus étudié. Il a lieu à travers les poils absorbants et se rencontre chez le soja et le haricot. Dans ce mode, l'adhésion des bactéries aux poils absorbants se fait grâce à la présence de rhicadhésines (sécrété par les bactéries) et de lectines (à la surface des poils racinaires), (Schwember *et al.*, 2019).

La fixation des rhizobia aux poils absorbants et l'influence des facteurs Nod provoquent la déformation des poils absorbants en une structure dite de crosse de berger (Rashid *et al.*, 2015). La courbure en crosse de berger piège les bactéries qui forment alors une micro colonie. En parallèle, la membrane plasmique du poil absorbant s'invagine puis une nouvelle paroi est formée autour de cette invagination produisant le cordon d'infection qui est une structure tubulaire (de Carvalho-Niebel *et al.*, 2024). C'est à l'intérieur de cette structure que les bactéries se divisent et progressent du cortex racinaire vers les cellules du futur primordium nodositaire, site définitif de libération des bactéries. Ensuite, les bactéries pénètrent au sein des cellules végétales grâce à une invagination de la membrane plasmique via un phénomène d'endocytose (Sachs *et al.*, 2018).

3.3.3. Développement de la nodosité et types de nodules

C'est le primordium nodulaire qui se développera plus tard en nodule. Ainsi, les bactéries isolées du cytoplasme de la cellule végétale par une membrane dite peribactéroïdienne, forme le symbiosome. A l'intérieur du symbiosome, les rhizobia subissent des changements morphologiques et métaboliques, aboutissant à une différenciation en bactéroïdes (Geddes & Oresnik, 2016). A ce stade, ces microorganismes fabriquent la nitrogénase, l'enzyme responsable de la fixation de l'azote. Au sein des nodosités, une protéine spécifique appelée leghémoglobine est formée par synthèse de globine par la plante et d'hème par le rhizobium. Cette protéine confère à la région centrale de la nodosité une coloration rose. Sa fonction est de maintenir une pression en oxygène à un niveau assez bas dans l'environnement de la nitrogénase (Tsyganova *et al.*, 2021).

Il existe deux types majeurs de morphologie nodulaire chez les légumineuses. Selon l'espèce, le primordium nodulaire prend naissance dans le cortex interne, pour former des nodosités dites de type indéterminé (Figure 4). Elles sont caractérisées par une zone méristématique qui persiste pendant toute la durée de vie de la nodosité et qui leur confère une forme allongée. Ces nodosités sont rencontrées chez les légumineuses tempérées (pois et luzène), (Sprent *et al.*, 2017). Chez le second type, le primordium nodulaire se forme dans le cortex externe pour donner naissance à des nodosités de type déterminé de forme sphérique avec un méristème qui cesse son activité lorsque la nodosité devient mature (Figure 4). Ces types de nodosités sont observés chez les légumineuses tropicales (soja, haricot), (Schwember *et al.*, 2019).

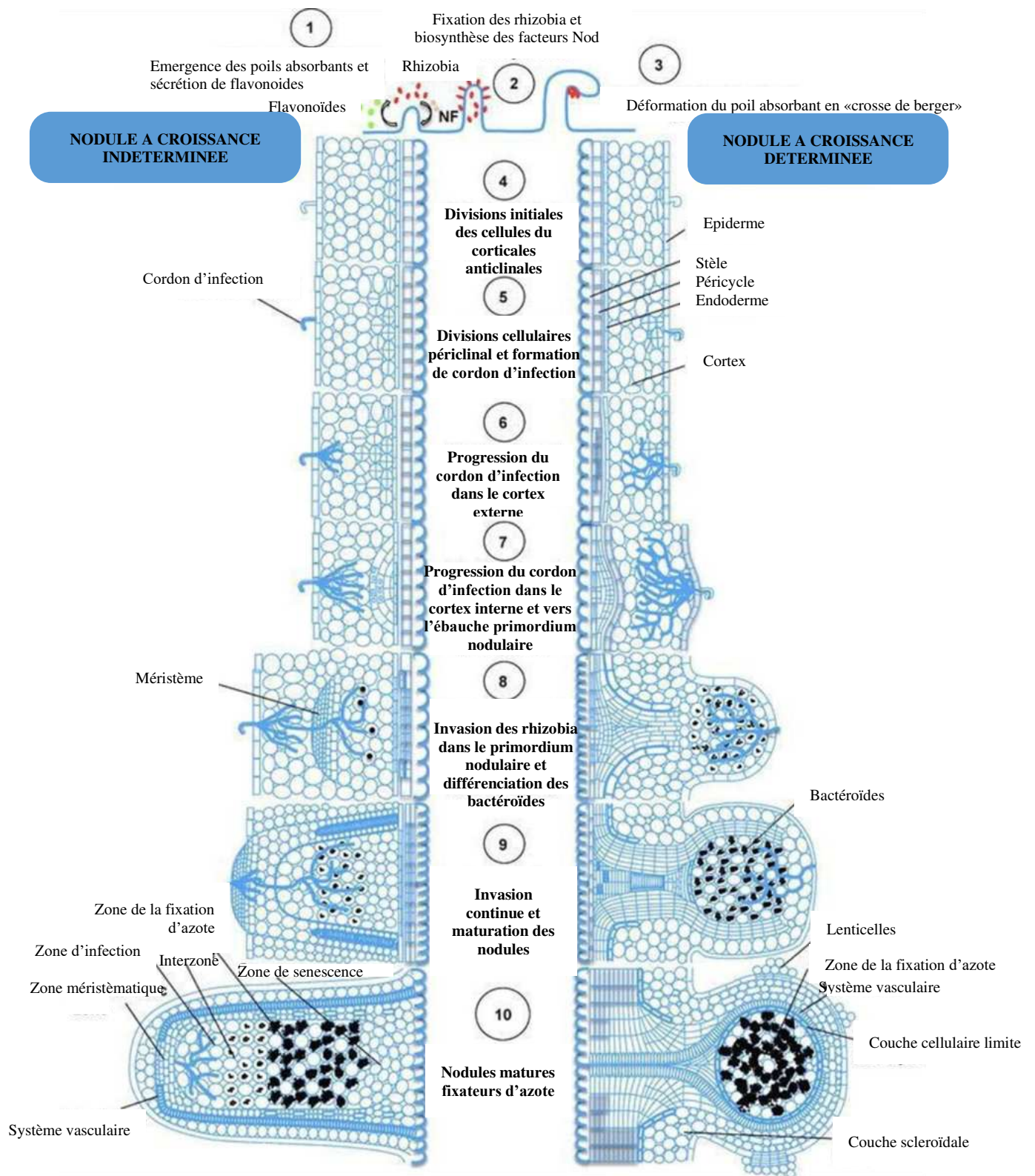


Figure 4 : différents stades de développement des nodules
(Ferguson *et al.*, 2010)

3.4. Fonctionnement de la symbiose

3.4.1. Signaux moléculaires et spécificité de la reconnaissance symbiotique

3.4.1.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires, de nature aromatiques, exsudés par les racines de la plante dans la rhizosphère (Dong & Song, 2020 ; Bag *et al.*, 2022) et incluent des isoflavones, des chalcones des flavonols, des flavones, des anthocyanidines et autres composés relatifs. Il existe plus de 4 000 flavonoïdes identifiés dont la grande majorité intervient dans la spécificité d'interaction hôte-symbiote (Shah *et al.*, 2020). Ce sont des dérivés de phénylpropanoïdes. Ils sont constitués de deux cycles de benzène liés à travers un hétérocyclique pyrone.

Ce sont les principaux signaux émis par la légumineuse et perçus par les rhizobia dans le sol (Sugiyama, 2021), induisant l'expression des gènes de nodulation chez le genre *Rhizobium* (Bag *et al.*, 2022). La production de ces signaux est limitée à la zone de prolongation des poils racinaires à partir de laquelle se développe plus tard la plupart des nodules (Dong & Song, 2020).

3.4.1.2. Gènes de nodulation

Ils sont pour la plupart localisés sur un plasmide et permettent de reconnaître les signaux (flavonoïdes) de la plante (Kidaj *et al.*, 2020) qui activent le programme symbiotique précoce de la bactérie. Ces signaux déterminent donc en retour la synthèse et la sécrétion des signaux bactériens, les facteurs Nod (Shumilina *et al.*, 2023). La capacité des rhizobia à former des nodules dépend de la présence d'un ensemble de gènes de nodulation (gènes *nod*, *no* et *noe*) dans leur génome et qui sont indispensables à la symbiose (Nelson & Sadowsky, 2015 ; Ghantasala & Choudhury, 2022).

Les gènes de nodulation peuvent être classés en trois groupes : les gènes *nod* régulateurs, les gènes *nod* communs et les gènes *nod* spécifiques (Skorupska *et al.*, 2010 ; Singh & Verma, 2023). Les gènes *nod* régulateurs, comprenant notamment le gène *nodD* (parfois en plusieurs copies dans le génome des rhizobiums). Il est le premier gène transcrit lors du processus de nodulation (Li & Li, 2023). Ils codent pour des protéines qui, en présence de flavonoïdes activent l'expression des autres gènes *nod* dits gènes *nod* communs. Les gènes *nodD* codent pour des récepteurs spécifiques de signaux de la plante et constituent le premier niveau de contrôle de la spécificité d'hôte (Li & Li, 2023). Les gènes *nod* communs (*nodABC*), appelés aussi gènes de structures *nodA*, *nodB* et *nodC* sont présents en copie unique (sauf exception).

Ce sont des gènes clés de la nodulation car ils sont impliqués dans la biosynthèse et la sécrétion de signaux symbiotiques rhizobiales, les facteurs *Nod*. Ils sont présents chez presque tous les rhizobiums et jouent un rôle essentiel dans la nodulation (Mergaert *et al.*, 2020). Les gènes *nod* spécifiques ou *hsn* (host specific nodulation) sont les déterminants principaux de la spécificité de l'hôte. Chaque espèce de rhizobia est caractérisée par une combinaison des gènes *nod*, codant pour des enzymes impliquées dans le griffage du squelette lipochitooligosaccharidique du facteur *Nod* avec des substitutions qui confèrent la spécificité de l'hôte (Dwivedi *et al.*, 2015). En effet, la localisation et l'organisation des gènes *nod* sont différentes d'une espèce à l'autre parmi les rhizobia. Chez *R. leguminosarum* par exemple, ils sont localisés sur le plasmide pRL10-488 kb (Buhian & Bensmihen, 2018). Chez d'autres espèces, ces gènes sont regroupés en « îlot symbiotique » localisé sur un chromosome, comme chez *B. japonicum* (681 kb) (Li & Li, 2023 ; Mergaert *et al.*, 2020).

3.4.1.3. Facteurs Nod

Ils constituent les signaux principaux dans le processus d'infection et l'organogenèse des nodules (Sprent *et al.*, 2017). Ce sont des molécules de lipochitooligosaccharides (LCOs), constitués d'un squelette de chitine d'environ 6 résidus de N-acétyl-D-glucosamine avec une extrémité non réductrice N-acétylée par un acide gras (Provorov & Andronov, 2016). Les facteurs Nod de toutes les espèces rhizobiales appartiennent à la même famille chimique. Cependant, la nature de l'acide gras et les substitutions produits sur le squelette de base dépendent de la souche ou de l'espèce de rhizobium (Mergaert *et al.*, 2015) et définissent la spécificité d'hôte de chaque espèce rhizobienne. Ces facteurs, à des concentrations minimales, peuvent initier des réponses symbiotiques chez la plante comme la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2018). Ils agissent également comme régulateurs spécifiques de croissance bactérienne dans les hôtes légumineuses (Chakraborty *et al.*, 2022).

3.4.2. Molécules clés de la fixation biologique de l'azote

3.4.2.1. Nitrogénase

Les rhizobia, sous leur forme bactérienne, utilisent une enzyme spécifique (la nitrogénase) pour couper la triple liaison de l'azote atmosphérique afin de le transformer en azote ammoniacal lors de la fixation symbiotique (Ramdane & Boukarana, 2016). Cette enzyme est constituée de deux protéines : l'une contenant du fer et l'autre contenant du fer et du molybdène qui servent au transport des électrons nécessaires à la réaction de réduction (Threatt & Rees, 2023).

L'azote atmosphérique est réduit en présence de Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate (NADPH) et ferrédoxine (assurent les transferts d'électron) par la nitrogénase. Cette réaction consomme une grande quantité d'énergie (fournie par 16 molécules d'ATP) et produit de l'hydrogène moléculaire, émis sous forme gazeuse (Milton & Minter, 2019). L'énergie requise pour convertir l'azote atmosphérique (N₂) en azote ammoniacal est de l'ordre de 960 KJ/mol d'azote fixé. Cependant, la présence d'azote minéral inhibe aussi le fonctionnement de la nitrogénase et la fixation n'est active que lorsque le milieu est déficient en azote soluble (Augusto *et al.*, 2013).

3.4.2.2. Léghémoglobine

La léghémoglobine est une protéine de couleur rouge foncé (Goyal *et al.*, 2021). C'est une chromoprotéine de 17500 Da, voisine de l'hémoglobine, présente dans les nodosités fixatrices d'azote des légumineuses. L'hème (la partie prosthétique) est codé par un gène de la bactérie alors que la globine (la partie protéique) est codée par un gène de la plante (Signorelli *et al.*, 2020). Elle a pour fonction de fixer l'oxygène gazeux rejeté par la photosynthèse et qui inhiberait l'action de la nitrogénase. Elle assure également l'approvisionnement des bactéroïdes en oxygène (Sonali *et al.*, 2020).

3.5. Fixation d'azote par la symbiose rhizobienne chez le haricot

Le haricot a été décrit par plusieurs auteurs comme étant une légumineuse à faible capacité de fixation d'azote, comparée au soja ou au niébé (Polonia *et al.*, 2016). Ce phénomène est dû en partie aux conditions des sols de la culture. En effet, le haricot produit en agriculture intensive est couramment fertilisé en azote et ces derniers génèrent d'importants reliquats azotés en début de culture (Debarge & Tenaud, 2015 ; Landry *et al.*, 2021). De plus, la pauvreté de certains sols couplée à la minéralisation rapide de la matière organique amène la plante à utiliser l'azote minéral plutôt que sa propre capacité symbiotique. La fixation symbiotique de l'azote nécessite plus de phosphore inorganique que la nutrition azotée minérale. Cette exigence est attribuée au coût énergétique élevée de la fixation symbiotique de l'azote. Elle apparaît particulièrement forte chez le haricot, qui est en effet plus affecté par la déficience en phosphore que d'autres légumineuses. La compétitivité des souches de rhizobium indigènes ineffectives empêche également le haricot d'exprimer au mieux son potentiel de fixation symbiotique (Razafintsalama *et al.*, 2022).

Toutefois, la grande variabilité génotypique pour le potentiel fixateur d'azote du haricot décrit par Chávez-Servia *et al.* (2016) permet de sélectionner des variétés à très fort potentiel fixateur d'azote.

De plus, le haricot fixe l'azote aussi bien que les autres légumineuses cultivées en conditions contrôlées ou lorsqu'il est inoculé par des souches de rhizobia efficaces (Yadav *et al.*, 2018).

L'inoculation consiste à mettre en présence d'une légumineuse les cellules d'une ou de plusieurs souches de rhizobia compétentes sélectionnées pour leur haut potentiel fixateur d'azote avec la plante cible (Altobelli *et al.*, 2016). C'est une pratique ancienne utilisée dans le but de maximiser le rendement potentiel des cultures. Elle permet la colonisation rapide des sols par les rhizobia et a pour but d'optimiser la fixation symbiotique de l'azote par les légumineuses. Cette inoculation est réalisée au cours des tous premiers stades de développement de la plante c'est-à-dire durant la période où elle est susceptible à la nodulation (Zhong *et al.*, 2009). Elle est indispensable dans le cas où les rhizobia compatibles à la plante hôte sont absents dans le milieu ; leur nombre sont faibles dans le sol pour favoriser une nodulation rapide ; les souches présentes sont peu efficaces, voire inefficaces (Chianu *et al.*, 2011). Elle est recommandée pour des sols agricoles qui présentent une déficience en azote et où l'apport d'azote constitue un facteur limitant ou quand la légumineuse est installée pour la première fois dans le système de culture (Zhong *et al.*, 2009). C'est aussi une alternative face à la cherté des engrais azotés minéraux (Chianu *et al.*, 2011).

3.6. Facteurs influençant la symbiose rhizobium-légumineuse

La survie des rhizobia dans le sol, la formation des nodosités et la fixation de l'azote atmosphérique sont des processus très sensibles à l'action directe d'un certain nombre de facteurs écologiques, dits édaphiques ou limitants lorsqu'ils interfèrent avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencent l'activité fixatrice de l'azote après symbiose.

3.6.1. Température

La température a un effet sur la symbiose et intervient dans la nodulation, la différenciation des bactéroïdes, la structure et le fonctionnement nodulaire. Pour la majorité des rhizobia, la température optimale de croissance se situe entre 28 et 31°C. Plusieurs souches sont incapables de persister à 37°C et en dessous de 10°C (Thami-Alami *et al.*, 2010 ; Gulati, 2018).

Chez les rhizobia, les températures élevées peuvent perturber la nodulation et inhiber la fixation de l'azote atmosphérique. En effet, les hautes températures de 35 à 40°C affectent la différenciation des rhizobia en bactéroïdes et le fonctionnement de la nodosité. Elles affectent aussi la synthèse des exopolysaccharides et des lipopolysaccharides ce qui contribue à la fréquence des isolats non infectives dans les sols (Menéndez *et al.*, 2019).

Cela a pour cause d'induire un retard de la nodulation ou limiter celle-ci à la partie profonde du sol où les températures sont moindres (Goyal & Habtewold, 2023).

Quant aux basses températures, elles inhibent l'expression des gènes *nod* empêchant ainsi, l'infection et la nodulation. Cependant, les stress thermiques non extrêmes induisent chez les rhizobia l'expression de protéines de stress thermique qui assurent la protection des enzymes clés de la physiologie microbienne. La production de ces protéines a été avérée chez des rhizobia tolérantes et sensibles aux chaleurs (Sindhu *et al.*, 2020).

3.6.2. Salinité

Les sols salins sont souvent alcalins et peuvent parfois présenter une disponibilité réduite en phosphore, fer, zinc et manganèse. Chez les rhizobia, le stress salin affecte d'une manière délétère leur croissance et leur persistance dans le sol (Arrese-Igor *et al.*, 2011). Il peut aussi affecter certains processus physiologiques de la symbiose légumineuse-rhizobia et le développement des nodules (Sindhu *et al.*, 2020). Cependant, la tolérance des rhizobia à la salinité est plus ou moins importante. En effet, certaines souches sont inhibées en culture pure à des concentrations en sel de 100 mM alors que d'autres tolèrent des concentrations supérieures à 400 mM (Sun *et al.*, 2021). Aussi, la croissance des rhizobia sous des conditions salines varie-t-elle d'une espèce à l'autre et d'un type de sel à l'autre (Rousk, 2022). Le stress salin influence la synthèse des lipopolysaccharides ainsi que des polysaccharides extracellulaires et capsulaires (LPS, EPS et CPS) indispensables dans les étapes de la nodulation (da-Silva *et al.*, 2017). De plus, le sel inhibe aussi l'activité de la nitrogénase et la respiration nodulaire entraînant ainsi, une diminution des teneurs en azote total dans la plante (Faghire *et al.*, 2011). Outre cela, le sel exerce un double effet sur les rhizobia dont un effet spécifique dû à la toxicité des ions et un autre lié au potentiel osmotique. Le stress salin étant permanent, les microorganismes doivent s'y adapter afin de survivre et se reproduire. De nombreuses espèces bactériennes s'adaptent aux conditions salines par l'accumulation intracellulaires des molécules organiques appelées les osmolytes (Rousk, 2021).

3.6.3. Humidité

Le potentiel hydrique du sol peut influencer la survie des rhizobia pendant leur vie saprophyte. Elle peut également influencer la relation symbiotique entre les légumineuses et les rhizobia. Dans les conditions de forte sécheresse, la nodulation peut être inefficace et/ou faible. En effet, elle exerce un effet très marqué sur la quantité de l'azote fixé, car le fonctionnement des nodules est plus sensible à cette contrainte que celui du métabolisme général de la racine et de la tige (Rousk, 2021 ; Fogaça de Freitas *et al.*, 2022).

En outre, la diminution de l'humidité du sol réduit la formation des cordons d'infection inhibant ainsi le processus de nodulation (Kajić *et al.*, 2016).

3.6.4. pH

Le pH du sol joue un rôle prépondérant aussi bien dans la survie et dans tous les aspects de la symbiose, depuis la survie des souches dans le sol jusqu'aux processus d'infection, de nodulation et de fixation d'azote (Dhane-Fitouri, 2011). Il affecte également les deux partenaires symbiotiques. En effet, la majorité des légumineuses préfèrent des pH neutres ou légèrement acides pour établir une symbiose efficace dans le sol. Chez les rhizobia par contre, l'acidité est généralement plus néfaste que l'alcalinité (Hawkins & Oresnik, 2022). Ces bactéries nécessitent un pH optimal compris entre 6,5 et 7,5 pour leur croissance. Toutefois, d'autres auteurs ont indiqué que les rhizobia présentent des réponses variées face aux variations du pH (Kajić *et al.*, 2016). da-Silva *et al.*, (2017) ont montré que l'acidité perturbait plus particulièrement l'adhésion des bactéries à la surface des poils racinaires lors de la phase d'infection.

L'acidité élevée du sol provoque des troubles dans la nutrition minérale. Cette situation affecte d'une part l'efficacité des rhizobia et d'autre part le développement de la plante hôte. Elle engendre par conséquent une diminution de la nodulation. Quant au pH alcalin du sol, il a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le manganèse et le fer autant pour le rhizobium que pour la plante hôte (Dhane-Fitouri, 2011).

3.6.5. Pesticides

L'utilisation des pesticides a pour but d'améliorer la productivité des plantes en les protégeant des nuisibles. Toutefois, leur utilisation anarchique et répétée peut-être défavorable pour les rendements agricoles et pour la santé (Al Abboud, 2014). En effet, l'application massive de ces produits de synthèse provoque un enrichissement des sols en métaux et augmente leur absorption par les cultures entraînant ainsi, un risque potentiel de santé publique (Sharma *et al.*, 2023). L'utilisation de ces produits agrochimiques a aussi un impact sur la communauté des bactéries rhizosphériques impliquées dans la croissance et le développement des plantes. Leur impact sur les bactéries nodulant les légumineuses ont fait l'objet de plusieurs travaux (Mohamad & Al-Naser, 2018).

Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES

1. PRÉSENTATION DES SITES D'ETUDE

Cette partie a pour objectif de présenter les sites d'échantillonnage et d'expérimentation. Elle a aussi contribué à justifier le choix de ces sites pour conduire le travail.

1.1. Présentation des sites d'échantillonnage

L'échantillonnage du sol a été réalisé de novembre 2019 à mars 2020 dans sept (07) grandes régions de la Côte d'Ivoire. Il s'agit des régions du Béliér (Yamoussoukro), de Gbêkê (Béoumi, Botro, Bouaké, Djébonoua et Sakassou), du Gôh (Gagnoa), du Haut Sassandra (Daloa), de la Marahoué (Bouaflé), du Poro (Korhogo et Sinématiali) et du Tchologo (Ferkessedougou). La position géographique des différents sites est indiquée sur la figure 5.

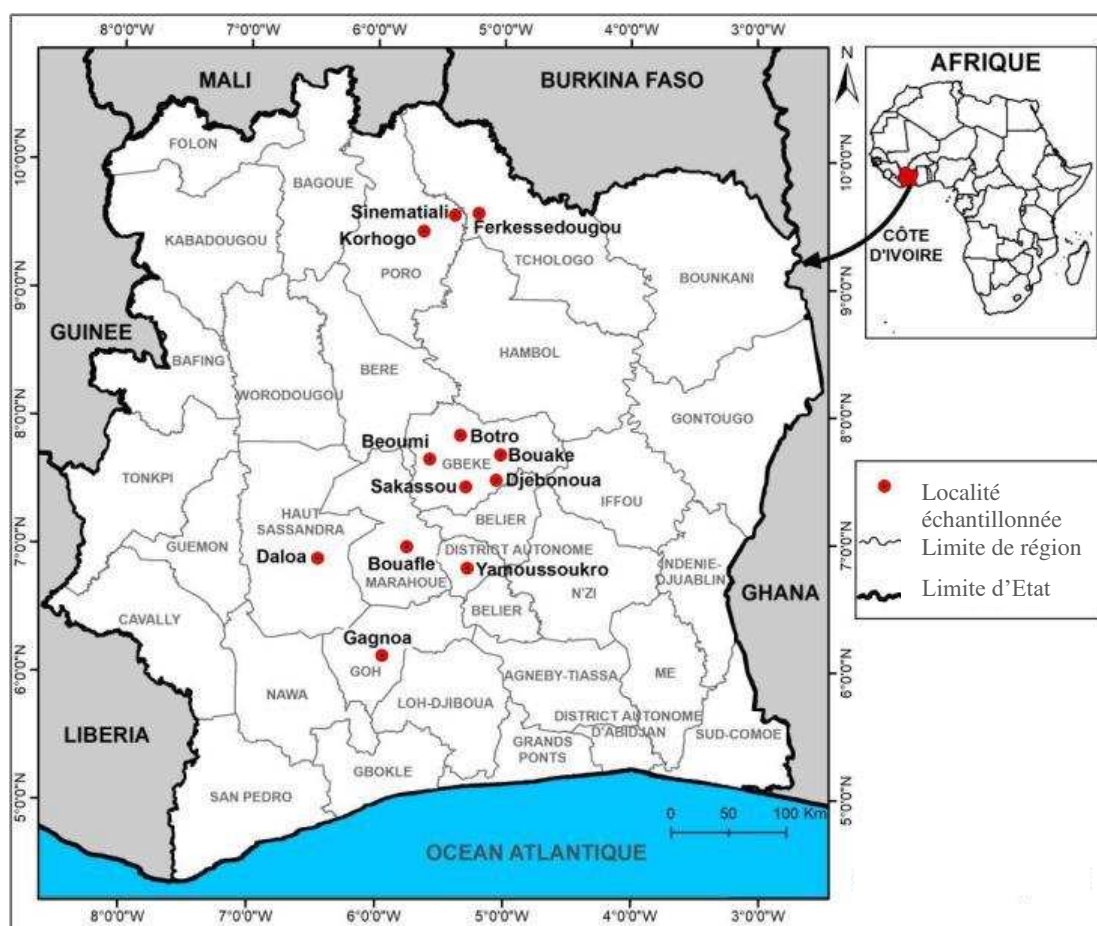


Figure 5 : carte des sites d'échantillonnage de sols

1.2. Description des sites d'expérimentation

Les expérimentations ont été conduites dans les villes de Bouaké et Daloa. L'isolement ainsi que la caractérisation phénotypique des bactéries ont été réalisés au Laboratoire de l'Unité de Production d'Inoculum pour Légumineuses (UPIL) de la Station de Recherche sur les Cultures Vivrières (SRCV) du Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) de Bouaké.

Quant à la caractérisation moléculaire, elle a été effectuée au Laboratoire de l'Unité de Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire (URGEM) de l'Université Jean Lorougnon GUEDE (UJLoG) de Daloa.

La caractérisation agromorphologique des 35 accessions de haricot sec a été réalisée à travers deux (02) essais conduits simultanément à la SRCV du CNRA de Bouaké.

L'évaluation au champ de l'efficacité symbiotique et agronomique des isolats a été effectuée simultanément sur deux (02) sites différents. Ces sites ont été localisés à l'est et à l'ouest de Bouaké respectivement aux Stations de Recherches sur le Coton et les Cultures Vivrières du CNRA de ladite ville (Figure 6). La ville de Bouaké est située au Centre de la Côte d'Ivoire, à environ 367 km d'Abidjan, la capitale économique, avec pour coordonnées géographiques 7°41 latitude Nord, 5°01 longitude Ouest et à 339 m d'altitude (Boa, 2016). Bouaké est le chef-lieu de région de Gbêkê et appartient à la zone de transition entre la savane au Nord et la forêt au Sud. En conséquence, elle est sous l'influence d'un climat de type soudanien assez nuancé où la division de l'année en deux (02) saisons sèches et deux (02) saisons de pluies n'est pas nette (Konan, 2013). L'ensoleillement est constant et l'hygrométrie relativement faible. L'humidité relative, qui fluctue entre 70 et 80 %, en période pluvieuse, peut descendre jusqu'à 55 % en janvier. La température, quant à elle, oscille entre 25 et 38 °C, avec une pluviométrie annuelle moyenne de 1 100 mm (Amani, 2010 ; Konan, 2013).

Les données pluviométriques et thermiques enregistrées au cours de la période de l'expérimentation (2020 à 2022) ont montré que la saison pluvieuse s'est étendue de mars à octobre et la saison sèche, de novembre à février (Figure 7). La saison sèche accompagnée par l'harmattan est intervenue entre les mois de décembre et février ainsi que des pointes de chaleur entre février et avril. Au cours de ces trois années, la pluviométrie et la température annuelle ont varié respectivement de 1090 à 1310 mm et de 26 à 27 °C.

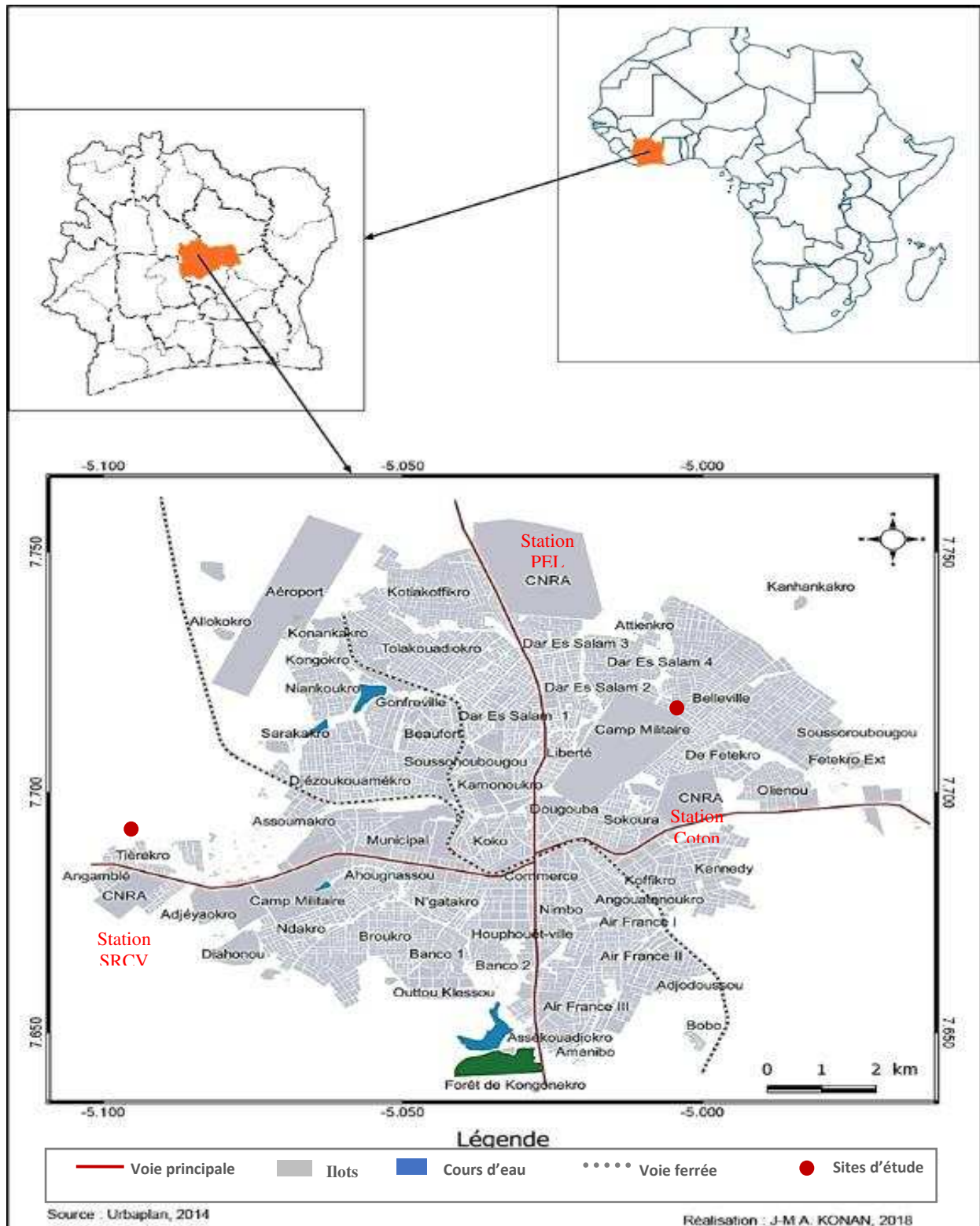


Figure 6 : carte de localisation des sites d'étude

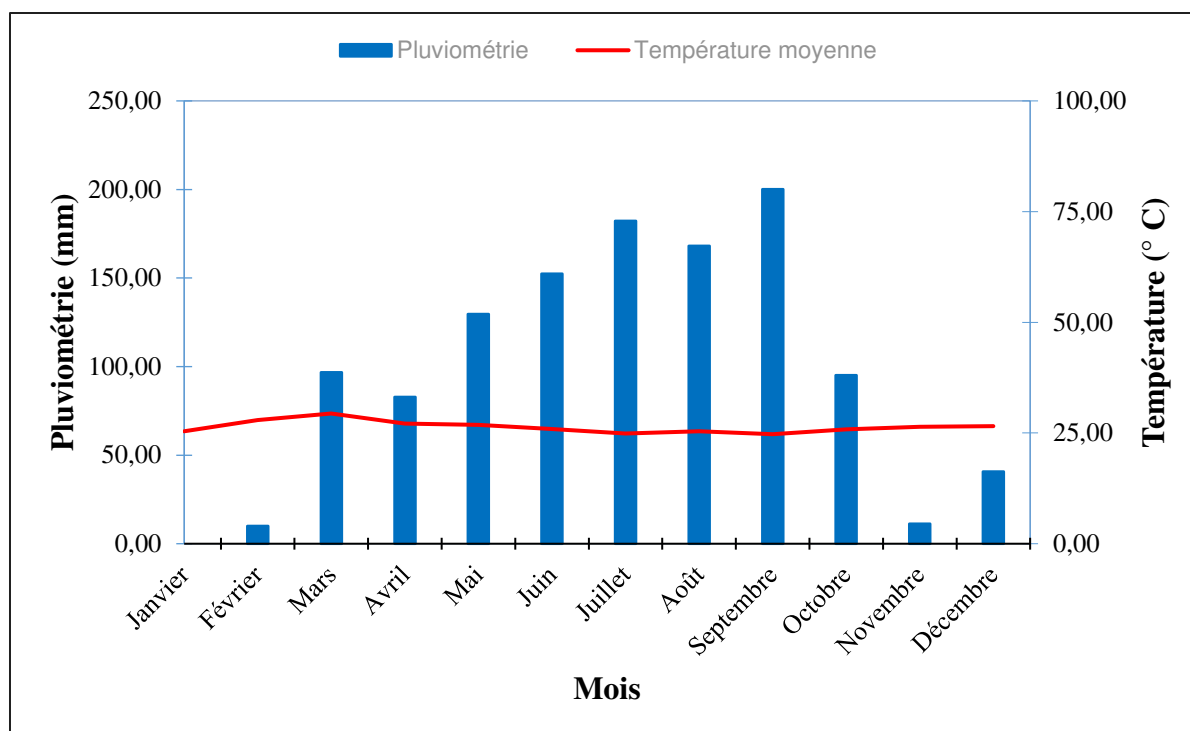


Figure 7 : diagramme ombrothermique de la ville de Bouaké de 2020 à 2022
(CNRA Bouaké)

1.3. Justification du choix des sites d'expérimentation et d'échantillonnage de sols

L'échantillonnage du sol a été effectué dans certaines villes des régions du Centre-Ouest, du Centre et du Nord de la Côte d'Ivoire qui sont les anciennes zones de production du haricot sec. La culture du haricot sec est marginalisée et tend à disparaître dans ces zones. Les résultats de cette étude devraient permettre la relance du haricot et serait ainsi une culture de diversification pour les populations de ces régions. De plus, comparé aux autres cultures de ces régions, le haricot présente des conditions de culture faciles, des rendements importants et surtout de faibles niveaux parasitaires.

Le choix de la ville de Bouaké comme site d'expérimentation a été motivé par la présence du Programme de Recherches sur les Cultures Maraîchères et Protéagineuses du CNRA en ce lieu. Ce programme a ainsi facilité l'accès aux ressources humaines, pédologiques et génétiques.

La réalisation de cette étude a nécessité l'utilisation de divers matériel présenté dans la partie suivante.

2. MATERIEL

Le principal matériel qui a été utilisé pour la réalisation de cette étude a été présenté dans cette partie. Il a été regroupé selon les catégories suivantes : matériel biologique et matériel technique.

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé a été composé de 35 accessions de haricot sec (Tableau II) dont quatre (04) provenant d'une collection locale (une originaire du Nord, une autre du Centre et deux de l'Ouest de la Côte d'Ivoire). Parmi les 31 autres accessions, 29 ont été introduites du Ghana et deux (02) du Kenya. Toutes les accessions ont été nommées avec un code spécifique ; à savoir HARI qui signifie haricot, suivie du numéro de série de la collection (01 à 35), du nom de la localité ou du pays d'origine (BKE pour Bouaké, BON pour Bonon, FER pour Ferkéssédougou, GHA pour Ghana et KEN pour Kenya) et de l'année de collection ou d'introduction (16 pour 2016, 18 pour 2018, 19 pour 2019 et 20 pour 2020).

Pour la conduite des essais sur le piégeage et l'authentification des bactéries, le matériel végétal a été composé de cinq (05) accessions que sont HARI11/GHA18, HARI17/GHA19, HARI22/GHA19, HARI27/GHA19 et HARI35/GHA19. Le choix de ces accessions a été fait selon leur rendement et leur disponibilité en quantité suffisante. Par ailleurs, les essais de détermination du spectre d'hôte ainsi que d'évaluation de l'efficacité symbiotique et agronomique des isolats ont été réalisés avec trois (03) accessions, à savoir HARI11/GHA18, HARI17/GHA19 et HARI35/GHA19. Le choix de ces accessions se justifie par la disponibilité de leur semence en quantité suffisante pour la conduite des essais.

Tableau II : différentes accessions de haricot sec utilisées

Groupes	1	2	3	4	5	6
Accessions						
Codes accessions	HARI01/KEN16 HARI02/KEN18 HARI32/GHA19	HARI04/BKE18	HARI35/GHA19	HARI20/GHA19 HARI21/GHA19	HARI16/GHA19 HARI23/GHA19 HARI24/GHA19	HARI22/GHA19
Groupes	7	8	9	10	11	12
Accessions						
Codes accessions	HARI30/GHA19 HARI31/GHA19	HARI03/FER18 HARI14/GHA19 HARI15/GHA19 HARI17/GHA19 HARI18/GHA18 HARI25/GHA19 HARI26/GHA19 HARI28/GHA19 HARI29/GHA19 HARI34/GHA19	HARI19/GHA19 HARI27/GHA19	HARI05/BON18 HARI06/BON18	HARI07/GHA18 HARI08/GHA18 HARI11/GHA18 HARI12/GHA18 HARI33/GHA19	HARI09/GHA18 HARI10/GHA18 HARI13/GHA18

HARI : Haricot, **BKE** : Bouaké ; **BON** : Bonon ; **FER** : Ferkessédougou ; **GHA** : Ghana ; **KEN** : Kenya. De 01 à 35 : numéros d'accession. 16, 18, 19 et 20 représente respectivement 2016, 2018, 2019 et 2020 les années où ont été introduites les accessions.

Les accessions ayant une ressemblance ont été classées en groupe avec une seule figure montrant la forme et la couleur de ces accessions.

2.1.2. Matériel bactérien

Le matériel bactérien a été constitué des bactéries locales isolées des nodosités de cinq (05) accessions de haricot sec dans cette étude. Il a également été constitué de vingt doses d'inoculum bactérien produits à partir des meilleurs isolats identifiés à l'issue de l'évaluation du spectre d'hôte. Les souches de références de la GenBank a été utilisé au cours de cette étude. C'est une base de données numérique accessible à tous.

2.2. Matériel technique

2.2.1. Matériel chimique

2.2.1.1. Fertilisants et solution nutritive

La fertilisation des plants de haricot lors des essais d'évaluation agromorphologique des accessions de haricot ainsi de l'efficacité symbiotique et agronomique des isolats ont été assurées par l'apport de la fumure minérale sous forme de granulée dont l'urée- $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (46 % N) et le NPK (12-22-22) à savoir de l'azote (N) à 12 %, de phosphore (P) à 22 %, de potassium (K) à 22 %, de soufre (S) à 2 %, de magnésium à 1 % et de Calcium à 5 %.

La solution nutritive de Broughton & Dilworth (1971), (Anexe 1) a été utilisé pour la fertilisation des plants (2 fois par semaine) lors des essais d'authentification et d'évaluation du spectre d'hôte.

2.2.1.2. Pesticides

Les pesticides utilisés pour le test de sensibilité des bactéries ont été constitués de produits couramment utilisés en cultures maraîchères décrits par Yéo *et al.*, 2022. Ils ont été composés d'herbicides (glyphosate, haloxyfop-r méthyle et 2,4-d sels d'amine), d'insecticides (acétamipride+indoxocarbe et spirotetramate+flubendiamide) et de fongicide (oxychlorure de cuivre).

2.2.2. Substrats

Des échantillons de sol ont été prélevés dans différentes zones agro-écologiques de la Côte d'Ivoire. Ces sols ont servi de substrats de culture pour le haricot sec afin de piéger les microorganismes locaux. Le sable blanc de rivière a servi de substrat lors de l'évaluation de l'efficacité symbiotique des isolats en conditions contrôlées.

2.2.3. Milieux de cultures

Les principaux milieux de culture (Annexe 2) utilisés dans cette étude sont constitués de milieux YEM (Yeast Extract Manitol) et YEMA (Yeast Extract Manitol Agar). Ces milieux permettent de sélectionner les bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique (Vincent, 1970).

3. METHODES

Différentes méthodes ont été utilisées pour :

- la caractérisation agromorphologique des accessions de haricot sec,
- l'échantillonnage de sols,
- le piégeage,
- l'isolement des bactéries et
- la caractérisation phénotypique des bactéries symbiotiques.

Par ailleurs, des méthodes d'évaluation ont été utilisées afin d'identifier l'efficacité symbiotique, agronomique ainsi que les caractéristiques moléculaires de ces bactéries.

3.1. Evaluation agromorphologique des 35 accessions de haricot sec

Il s'est agi, dans cette partie, d'évaluer 35 accessions de haricot sec à travers deux (02) essais installés à la Station de Recherche sur les Cultures Vivrières (SRCV) du CNRA de Bouaké.

3.1.1. Dispositif expérimental

L'essai a été mis en place selon un dispositif complètement aléatoire avec un arrangement en blocs de Fischer à trois (03) répétitions (Figure 8). Chaque répétition est constituée de 35 parcelles élémentaires réparties en deux blocs composés respectivement de 18 et 17 parcelles élémentaires soit 105 parcelles élémentaires au total.

Les dimensions de chaque parcelle ont été de 3 m × 2,5 m soit 7,5 m². Les parcelles élémentaires et les répétitions ont été séparées de 1 m et 2,5 m respectivement les unes des autres. Une bordure de 2 m a été laissée comme marge aux alentours des trois répétitions. Chacune des parcelles élémentaires a été représentée par cinq (05) lignes de semis de 3 m distantes de 0,50 m. Chaque ligne a comporté 15 plants espacés de 0,20 m ; soit un total de 75 plants par parcelle élémentaire (Figure 8). La superficie totale de l'essai sans les bordures a été estimée à 1 715 m² (75 m × 23 m).

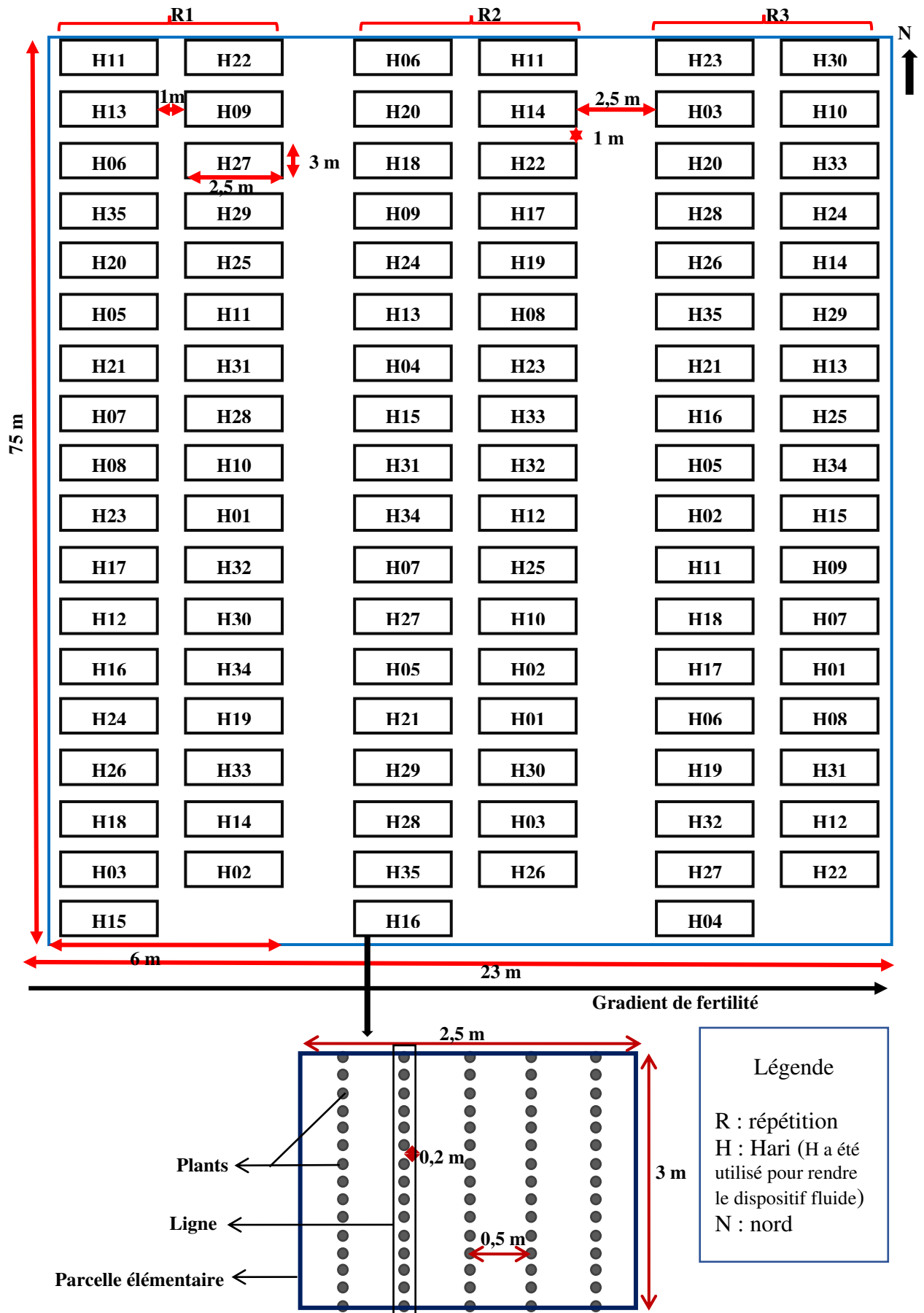


Figure 8 : dispositif expérimental de l'essai de caractérisation agromorphologique

3.1.2. Mise en place des essais, semis et entretien des parcelles

Avant la mise en place des essais, les parcelles ont été nettoyées puis un labour d'environ 30 cm de profondeur a été réalisé à l'aide d'un tracteur. Ensuite, un apport d'engrais de fond a été fait avec l'engrais chimique NPK de formulation 12-22-22 à la dose de 100 kg.ha⁻¹. Ensuite, toutes les accessions ont été semées manuellement à raison de deux (02) graines par poquets, à une profondeur de 3 cm. Enfin, un démariage a été fait 2 semaines après la levée de sorte à avoir un plant par poquet pour une densité de 100 000 plants/ha.

Des opérations d'entretien qui ont consistées aux sarclages et à l'application d'urée (46 % N) à la dose de 50 kg/ha au 19^{ème} jour après le semis, ont été effectuées pour favoriser le bon développement des plantes.

3.1.3. Mesures et observations des paramètres

Afin d'identifier des accessions performantes pour la production du haricot, 16 caractères phénologiques et agronomiques ont été évalués sur la base des recommandations des descripteurs du haricot sec (IBPGR, 1982). Les paramètres mesurés et les méthodes de mesures sont consignés dans le tableau III. Les caractères phénologiques tels que les délais de floraison et de fructification, ont été enregistrés sur l'ensemble des parcelles. En ce qui concerne les caractères agronomiques, 10 plants sélectionnés au hasard par parcelle élémentaire ont été retenus pour la collecte de données.

Sept (07) jours après le semis (JAS), les plants ayant levés ont été dénombrés par parcelle élémentaire pour la détermination du taux de levée. A la floraison, la date 50 % floraison a été déterminée par comptage du nombre de jours écoulés entre le semis et le jour où 50 % des plants ont fleuri. À cette même période, la longueur des tiges et le diamètre au collet des plants ont été mesurés afin de déterminer l'indice de la vigueur végétative par la formule utilisée par Kouassi *et al.* (2019) dans leurs travaux :

$$\text{Indice de la Vigueur végétative (IVV)} = \log \left(\frac{C^2 \times H}{4\pi} \right); C = \pi \times D \quad (1)$$

H : hauteur de la tige (cm) ; *C* : Circonférence au collet (cm) ; *D* : Diamètre au collet (cm),

Puis, le nombre de nœuds sur la tige principale des plants a été déterminé. Dix (10) plants ont été arrachés au stade floraison par parcelle élémentaire et séchés au soleil jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Les plants secs ont été pesés en vue de déterminer la biomasse sèche par plant en faisant le rapport du poids sec de plants arrachés sur le nombre de plants arrachés.

Lorsque 50 % des plants des parcelles élémentaires ont fructifié, la date 50% fructification a été déterminée par comptage du nombre de jours écoulés du semis à cette date. A la fin du cycle de la plante, les gousses ont été récoltées. Après la récolte, le poids sec des gousses a été déterminé suite à leur séchage au soleil. Puis les gousses sèches ont été décortiquées pour la détermination du nombre de graines par gousse. La longueur et le diamètre de 10 graines choisies aléatoirement, pour chaque accession ont été mesurés. Enfin, le poids des graines, de 100 graines, les rendements en gousses, en graines et l'indice de récolte ont été déterminés. Les rendements ont été obtenus par extrapolation à partir des productions parcellaires selon la formule utilisée par Ouedraogo *et al.* (2007).

$$\text{Rendement (t. ha}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Poids (Kg)}}{\text{Surface parcellaire (m}^2\text{)}} \times \frac{10.000 \text{ m}^2}{1.000} \quad (2)$$

Quant à l'indice de récolte, il a été déterminé par le rapport du poids des graines sur la quantité de la biomasse (Tigist *et al.*, 2023). Il a été obtenu par la formule suivante :

$$\text{Indice de recolte} = \frac{\text{Poids des graines (kg)}}{\text{Quantité de la biomasse (kg)}} \quad (3)$$

Tableau III : description des paramètres agro-morphologiques mesurés et observés

Caractères	Codes	Description des méthodes de mesure
Taux de levée	TL	Rapport du nombre de plants levés sur le nombre de graines semées par parcelle élémentaire multiplié par 100
Indice de la vigueur végétative	IVV	Obtenu à partir de la longueur des tiges et diamètres au collet de 10 plants mesurés respectivement à l'aide d'un ruban-mètre et d'un pied à coulisse
Nombre de nœud	NN	Comptage de nœuds sur la tige principale de la base à la première inflorescence axillaire pour les types indéterminés et à l'inflorescence terminale pour les types déterminés.
Biomasse sèche	BS	Mesure du poids moyen de 10 plants secs.
Délai de floraison	DFI	Comptage du nombre de jours séparant le semis au moment où 50% des plants par parcelle élémentaire portent des fruits.
Délai de fructification	DFr	Comptage du nombre de jours séparant le semis au moment où 50% des plants par parcelle élémentaire portent des fruits.
Longueur des gousses	LGs	Mesure de la longueur des plus grosses gousses immatures complètement développées sur 10 plants à l'aide d'une règle graduée.
Diamètre des graines	DGr	Mesure du diamètre de 10 graines pour chaque accession à l'aide d'un pied à coulisse.
Longueur des graines	LGr	Mesure de la longueur de 10 graines pour chaque accession à l'aide d'un pied à coulisse.
Nombre de graines par gousse	NGr/Gs	Comptage de graine par gousses de 10 plants après décortilage.
Poids de gousses par plant	PGsP	Détermination du poids des gousses sèches par plant et par parcelle élémentaire à l'aide d'une balance électronique de précision.
Poids de graines par plant	PGrP	Détermination du poids des graines sèches par plant et par parcelle élémentaire à l'aide d'une balance électronique de précision.
Poids de 100 g	P100G	Détermination du poids de 100 graines par accession et par répétition à l'aide d'une balance de précision.
Rendement en gousses	RGs	Extrapolation à l'hectare du poids des gousses sèches par parcelle élémentaire.
Rendement en graines	RGr	Extrapolation à l'hectare du poids des graines sèches par parcelle élémentaire.
Indice de récolte	IRe	Rapport du poids des graines sur la quantité de la biomasse.

3.2. Constitution d'une collection de rhizobia locaux du haricot sec résistant aux facteurs environnementaux et anthropiques

Pour ce test, cinq (05) accessions de haricot (HARI11/GHA18, HARI17/GHA19, HARI22/GHA19, HARI27/GHA19 et HARI35/GHA19) ont été retenues.

3.2.1. Prospection et collecte des échantillons de sols

Dans le but d'obtenir une collection de bactéries locales nodulant le haricot sec, des échantillons de sols ont été collectés lors des prospections dans différentes zones agroécologiques du Nord, du Centre et du Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire. Le choix des sites d'échantillonnage a été fait en mettant un accent particulier sur les sols sans précédents culturels récents de légumineuses pour s'assurer de l'authenticité des bactéries collectées (Tableau IV). Les prélèvements ont été effectués sur les quatre (04) extrémités et le centre d'une parcelle dont la superficie a été d'au moins 2500 m². Avant tout prélèvement, les points d'échantillonnage géoréférencés ont été nettoyés à la machette. Puis à l'aide de daba, les échantillons de sols ont été prélevés dans les couches supérieures du sol (environ 0-20 cm de profondeur). Trois (03) échantillons de sol de 5 kg chacun ont été collectés par point de prélèvement. Au total 15 sacs de 5 kg, soit 75 kg de sol, ont été obtenus par site d'échantillonnage. Après chaque prélèvement, le matériel a été nettoyé à l'hypochlorite de sodium à 70 % pour éviter la contamination des échantillons entre eux.

Tableau IV : origine des sols échantillonnés et leur précédent cultural

Villes	Coordonnées géographiques	Antécédent cultural
Béoumi	6°54.448' N ; 6°26.190' O ; Alt : 314 m	Jachère
Botro	7° 51' 8 N ; -5° 18' 38 O	Aubergine
Bouaflé	6°59.478' N ; 5°39.811' O ; Alt : 197 m	Maïs
Bouaké	7°46 N ; 5°06 O ; Alt : 376 m	Forêt
Daloa	6°54.448' N ; 6°26.190' O ; Alt : 270 m	Jachère
Djébonoua	7°38.967' N ; 5°01.611' O ; Alt : 311 m	Tomate
Ferkéssédougou	9°27.176' N ; 5°04.870' O ; Alt : 371 m	Tomate
Gagnoa	7°57.666' N ; 6°40.3836' O ; Alt : 350 m	Maïs
Korhogo	7°41.780' N ; 5°01.968' O ; Alt : 369 m	Jachère
Sakassou	7°38.967' N ; 5°01.611' O ; Alt : 257 m	Tomate
Sinématiali	9°35.155' N ; 5°22.488' O ; Alt : 498 m	Tomate
Yamoussoukro	6°53.029' N ; 5°22.343' O ; Alt : 181 m	Tomate

3.2.2. Piégeage des potentiels bactéries nodulant le haricot sec

Le piégeage des bactéries nodulant le haricot sec dans les échantillons de sols prélevés a été réalisé en conditions semi-contrôlées (sous abri avec un régime hydrique dépendant d'un arrosage régulier) à la SRCV. Pour chaque localité, tous les échantillons prélevés sur les différentes parcelles ont été mélangés pour obtenir un échantillon composite. Puis, il a été réparti dans des pots en plastique d'une capacité de 4 litres chacun. Ces pots ont été préalablement forés à leur base pour assurer le drainage des eaux excessives puis désinfectés par une solution d'hypochlorite de sodium. L'ensemble des pots a été disposé sur une bâche noire pour éviter les échanges entre le sol contenu dans les pots et la terre.

Les graines de cinq (05) accessions de haricot ont été stérilisées par immersion dans de l'alcool à 70 % pendant 10 secondes puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 25 % pendant 3 à 5 minutes et rincées six fois avec l'eau distillée stérile (Woomer *et al.*, 2011). Ensuite, trois (03) graines stériles de chaque accession ont été semées à une profondeur de 3 cm dans chacun des pots disposés sous l'abri. L'expérimentation a été effectuée en trois (03) répétitions pour chaque accession et par localité soit 15 pots par bloc et 180 pots pour l'ensemble des sols échantillonnés (Figure 9). Une irrigation a été effectuée manuellement trois (03) fois par semaine à intervalle d'un (01) jour entre les arrosages. Aucun apport d'engrais ou de produit phytosanitaire n'a été réalisé.



Figure 9 : pots plastiques contenant les sols échantillonnés

3.2.3. Collecte et conservation des nodules

La collecte de nodules a été effectuée sur les racines des plantules de haricot en début de la floraison (4 à 6 semaines après semis). Les pots ont d'abord été secoués délicatement afin de les vider de leur contenu. Ensuite, les racines ont été débarrassées manuellement des mottes de terres sans toutefois endommager les nodules. Puis, le système racinaire a été lavé plusieurs fois à l'eau ordinaire afin d'éliminer les restes de terre et examiné pour détecter la présence de nodules. Les nodules obtenus ont été détachés des racines et séchés sur du papier absorbant. Enfin, ces derniers ont été conservés au réfrigérateur à 4 °C pour une conservation de courte durée (allant jusqu'à 2 jours). Une dessiccation a été faite pour une durée de conservation allant de 6 à 12 mois selon la méthode de Vincent (1970). Elle a consisté à déposer les nodules à conserver sur du coton contenu dans des flacons stériles et préalablement remplis de moitié par du chlorure de calcium.

3.2.4. Isolement, purification et conservation des isolats

Pour l'isolement et la purification des isolats, les méthodes adoptées ont été celles préconisées par Vincent (1970). Toutes ces opérations ont été réalisées dans des conditions d'asepsie totale sous une hotte à flux laminaire.

3.2.4.1. Isolement des rhizobia

Les nodules ont été stérilisés en surface avec une solution de chlorure de mercure (HgCl_2) à 0,1 % pendant 3 minutes pour éliminer les contaminants de la rhizosphère. Cette désinfection a été suivie d'un rinçage dans dix (10) bains successifs d'eau distillée stérile afin d'éliminer les traces de HgCl_2 . Le nodule ainsi traité a été écrasé dans 1 mL d'eau distillée stérile.

La gélose YEM (Annexe 1) préalablement coulée en boîte de Pétri a étéensemencée en surface de façon aseptique à l'aide de 0,1 mL soit 100 μL du surnageant issu du broyat. Ce milieu à base d'extrait de levure et de mannitol est strictement dépourvu d'azote.

3.2.4.2. Purification et conservation des isolats bactériens

Les colonies bactériennes présumées appartenir aux rhizobia, reconnaissables par leur aspect gommeux et translucide ont été sélectionnées en fonction de leur taille et leur coloration. Ainsi, ces colonies ont été prélevées par une anse de platine stérile, puis ensemencées par des stries transversales dans le milieu YEMA et incubée à 28 °C pendant 2 à 6 jours. L'opération a été renouvelée jusqu'à l'obtention de la séparation la plus complète possible des colonies bactériennes (colonie pure). Ces isolats ont été codifiés RPC (Rhizobia isolés de *Phaseolus*

vulgaris en Côte d'Ivoire), suivis du numéro de l'accession (1 : HARI17/GHA19, 2 : HARI11/GHA18, 3 : HARI22/GHA19, 4 : HARI27/GHA19 et 5 : HARI35/GHA19) et d'un numéro d'ordre de sélection.

Les isolats purs ont été ensemencés dans des tubes contenant le milieu YEMA coulé en pente. Ils ont été ensuite incubés à 28 °C pendant 72 heures et conservés au réfrigérateur à + 4 °C. Cette technique permet une conservation de courte durée (6 à 12 mois).

3.2.5. Caractérisation morphologique des isolats

3.2.5.1. Examen macroscopique

Cette étude a consisté à l'observation directe à l'œil nu de l'aspect morphologique des colonies obtenues sur milieu YEMA après incubation en prenant en compte des critères suivants : la forme des colonies (circulaire, ovoïde, ...), la couleur, l'élévation (convexe, plate...), l'opacité (opaque, translucide ...), la taille des colonies par mesure de diamètre, la surface (lisse, rugueuse, sèche, dentelée, ...) et la bordure (lobée, régulière, ...).

3.2.5.2. Examen microscopique par la coloration de Gram

La coloration a été réalisée selon le protocole adopté par Denis *et al.* (2007). Une goutte d'eau distillée stérile a été déposée sur une lame de verre sèche et propre. Ensuite, une portion d'une colonie bactérienne a été prélevée d'une boîte de Pétri gélosée et déposée sur la lame à l'aide d'une anse (dans des conditions stériles). Puis un frottis a été réalisé à partir de la colonie prélevée en décrivant avec l'anse des mouvements circulaires de façon à obtenir un étalement mince et homogène en partant du centre de la lame. La lame a été séchée (le frottis) à l'air libre puis fixée au-dessus de la flamme du bec bunsen sans trop la chauffer. Puis, cette lame a été successivement recouverte par le violet de gentiane, lugol et fushine de Ziehl (rose) avec un temps de pause allant de 30 à 60 secondes puis rincée à l'eau distillée après chaque coloration. La lame a été aussi décolorée par un rinçage à l'alcool acétonique après l'application du lugol. Elle a été séchée à l'air libre puis recouverte de quelques gouttes d'huile d'immersion et observée au microscope (Grossissement x 100).

3.2.6. Caractérisation symbiotique et physiologique des rhizobia

3.2.6.1. Authentification des isolats

La capacité d'induire la formation de nodosités sur la racine de la légumineuse hôte est un critère de base dans la caractérisation des rhizobia (Somasegaran & Hoben, 1994). Ainsi, l'efficacité symbiotique des isolats a été réalisée à travers le test d'authentification. Ce test a été conduit sous abri à la Station de Recherche Culture Vivrière (SRCV).

Ainsi, les colonies bactériennes obtenues après purification ont été inoculées à leur plante hôte d'origine dans un milieu (substrat) stérile. Cette étape est nécessaire pour démontrer que les isolats sont capables d'induire la nodulation de leur plante hôte ; ce qui confirme leur appartenance aux rhizobia. L'authentification des isolats a été réalisée avec deux (02) répétitions par isolat et un témoin non inoculé pour s'assurer des conditions d'asepsie de la culture de la plante.

✓ **Préparation du substrat et semis des graines**

Le substrat utilisé a été le sable blanc de rivière rincé plusieurs fois jusqu'à la clarification de la dernière eau de rinçage. Ensuite, le sable rincé a été séché puis stérilisé à 120 °C pendant 6 h à l'étuve. Ce sable a été transféré dans des pots d'une capacité de 4 L préalablement perforés, lavés et désinfectés. Enfin, les graines du haricot ont été stérilisées et semées comme décrites à la section 3.2.2 de la page 49.

✓ **Inoculation**

Une (01) semaine après le semis, les graines ont été inoculées avec 1 ml de la suspension bactérienne de chaque isolat dont la charge a été estimée à 10^9 bactéries/ml. La suspension bactérienne qui a servi d'inoculum a été obtenue par repiquage des isolats bactériens dans 10 ml de milieu YEM coulé en tube à essai suivi d'une incubation à 28 °C pendant 5 jours sous agitation à 120 tours/min. Trois (03) arrosages ont été fait par semaine dont deux (02) à l'eau distillée stérile et un (01) avec de la solution nutritive de Broughton & Dilworth (1971) dépourvu d'azote en annexe 2.

✓ **Vérification de la nodulation et collecte des données**

Trois à quatre semaines après le semis, les plants ont été dépotés afin d'évaluer la capacité des isolats à former des nodosités sur le système racinaire de leur plante hôte respective. Les nodules observés ont été dénombrés et les isolats correspondants ont été classés en fonction de leur infectivité.

3.2.6.2. Evaluation du spectre variétal des bactéries nodulants le haricot sec

L'évaluation du spectre variétale consiste à vérifier la capacité des isolats à induire la formation de nodosités sur la racine d'une légumineuse autre que sa plante hôte. Ainsi, les isolats qui ont induit la formation de nodules sur leurs accessions hôtes ont été retenus et inoculés à trois (03) accessions de haricot sec (HARI11/GHA18, HARI17/GHA19 et HARI35/GHA19). Les expérimentations ont été les mêmes que celles décrites à la section 3.2.6.1. de la page 52. Pour

chacune des accessions, un témoin positif et un autre négatif ont été retenus. Ces deux témoins n'ont pas été inoculés. Le témoin positif a été constitué de plants arrosés avec une solution nutritive enrichi en nitrate de potassium (KNO_3) à une concentration de 0,5 g/L. Par contre, le témoin négatif a été composé de plants arrosés avec solution nutritive sans apport d'azote. Ces témoins ont permis de déterminer l'efficacité symbiotique (ES) des isolats qui a été évaluée par la comparaison de la biomasse des plants inoculés et de la biomasse des plants du témoin azoté. Elle a été déterminée selon la formule de Maâtallah *et al.* (2002) :

$$\text{Efficacité symbiotique} = \frac{\text{poids sec de plantules inoculés (g)}}{\text{poids sec de plantules fertilisé (g)}} \times 100 \quad (4)$$

3.2.6.3. Caractérisation physiologique des isolats

Seuls les isolats ayant présenté un large spectre variétal ont été retenus pour les tests de tolérance au pH, à la salinité et aux pesticides. Pour ces différents tests, le milieu YEMA a été utilisé. Une boîte de Pétri correspondant à une concentration de pH, sel et pesticide a été subdivisée en petits secteurs en fonction du nombre d'isolats à tester (Figure 10). Ces boîtes ont été ensemencées en spot par 10 μl d'une suspension bactérienne de densité voisine à 10^9 cellules/ml de chaque isolat bactérien puis elles ont été incubées à 27 °C pendant trois (03) jours. Après incubation, la croissance des bactéries a été estimée par l'importance du diamètre de la colonie en comparaison à des témoins comme suit : (-) pas de croissance ; (+) faible croissance soit environ 10 à 30 % par rapport au témoin ; (2+), croissance moyenne d'environ 30 à 80 % par rapport au témoin ; 3+, bonne croissance et similaire au témoin (Djedidi *et al.*, 2011). Les isolats bactériens affectés des symboles (3+) et (2+) sont considérés comme tolérants et ceux affectés de (+) ou (-) sont considérés comme étant sensibles.



Figure 10 : boîte de Pétri subdivisée en secteur

✓ **Tolérance au pH des isolats**

La tolérance aux variations du pH a été évaluée selon la méthode de Konaté *et al.* (2014). Le pH du milieu YEMA initialement fixé à 7 a été ajusté aux différentes valeurs de pH testées. Ainsi, les milieux YEMA à pHs acides ont été ajustés avec une solution molaire (1 M) d'acide chlorhydrique (HCl) et ceux à pHs basiques avec une solution molaire (1 M) d'hydroxyde de sodium (NaOH). Les valeurs du pH testées ont été de 3 et 5 pour les acides, 7 pour le témoin ; 9 et 11 pour les basiques. Après ajustement des pHs, les milieux ont été autoclavés à 121°C pendant 20 min. Ces milieux ont ensuite été coulés dans des boîtes de Pétri puis laissés séchés à l'air libre avant leur subdivision.

✓ **Tolérance à la salinité des isolats**

La tolérance des souches à la salinité a été évaluée par la détermination de la croissance sur le milieu YEMA à différentes concentrations de sel [Chlorure de Sodium (NaCl) et Chlorure de potassium (KCl)], (Konaté *et al.*, 2014). Ainsi, le sel du milieu YEMA a été ajustée à différentes concentrations [0 % (témoin), 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % et 10 %] avant autoclavage.

✓ **Effet des pesticides sur les isolats**

Les pesticides utilisés pour ce test sont constitués d'herbicides (glyphosate, haloxyfop-R méthyle et 2,4-D sels d'amine), d'insecticides (cyperméthrine et acétamipride + indoxocarbe) et de fongicide (oxychlorure de cuivre), (Tableau V).

La dose de référence et celle expérimentale de chaque pesticide ont été ajoutées aseptiquement et séparément aux différents milieux YEM gélosés stériles et refroidis à 60 °C (Khan *et al.*, 2006 ; Konaté *et al.*, 2015).

Tableau V : caractéristiques des pesticides utilisés

Pesticides	Nom commercial	Matière active	Dose de référence	Dose expérimentale
Herbicides	Extra	Glyphosate	3,1 µl/ml	1,6 µl/ml
	Halcot	Haloxyfop-R méthyle	2,8 µl/ml	1,4 µl/ml
	Tou_Idjre	2,4-D sels d'amine	9,4 µl/ml	4,7 µl/ml
Insecticides	Thian	Cyperméthrine	0,5 µl/ml	0,25 µl/ml
	Viper	Acétamipride + indoxocarbe	2,7 µl/ml	1,35 µl/ml
Fongicide	Callicuivre	Oxychlorure de cuivre	5 µg/ml	2,5 µg/ml

3.3. Evaluation au champ de l'efficacité symbiotique et agronomique des isolats

La capacité des isolats à améliorer les performances agronomiques des accessions du haricot sec a été évaluée en condition de champ. Pour ce faire, deux (02) expérimentations ont été mise en place à la Station de Recherches sur le Coton et à la SRCV du CNRA de Bouaké. Les parcelles retenues avaient été mises en jachère pendant au moins deux années. Aucune de ces parcelles n'avait pour précédent cultural une légumineuse avant leur mise en jachère. Ce choix a été fait afin d'évaluer l'impact réel des isolats bactériens sur la nodulation et la production du haricot sec.

3.3.1. Traitements

Vingt-deux (22) traitements dont 20 inocula bactériens, un témoin de référence (témoin positif) non inoculé fertilisé à l'engrais NPK de formulation 12-22-22 et un témoin non inoculé non azoté (témoin négatif) ont été appliqués sur HARI11/GHA18, HARI17/GHA19 et HARI35/GHA19 pour optimiser leur production.

3.3.2. Dispositif expérimental

Ces essais ont été conduits selon un dispositif complètement aléatoire avec un arrangement en blocs de Fischer à 3 répétitions pour chacune des accessions (Figure 11). Chaque répétition a été composée de 22 parcelles élémentaires. C'est donc un total de 198 parcelles élémentaires qui ont été mises en place pour chaque essai (soit 66 parcelles x 3 accessions). La distance entre deux parcelles élémentaires adjacentes a été de 1,5 m. Les parcelles des différentes accessions ont couvert une superficie de 1 176,5 m² et ont été séparées par une allée de 4 m. Dans chaque répétition, les parcelles élémentaires mesuraient 3 x 2,5 m et ont été constituées de 5 lignes de semis de 3 m. Les lignes ont été distantes de 0,50 m et les plants de 0,20 m, soit 15 plants par ligne et 75 plants par parcelle élémentaire. Une bordure de 2 m a été laissée comme marge aux alentours des essais. La superficie totale de l'essai a été donc de 4 616 m².

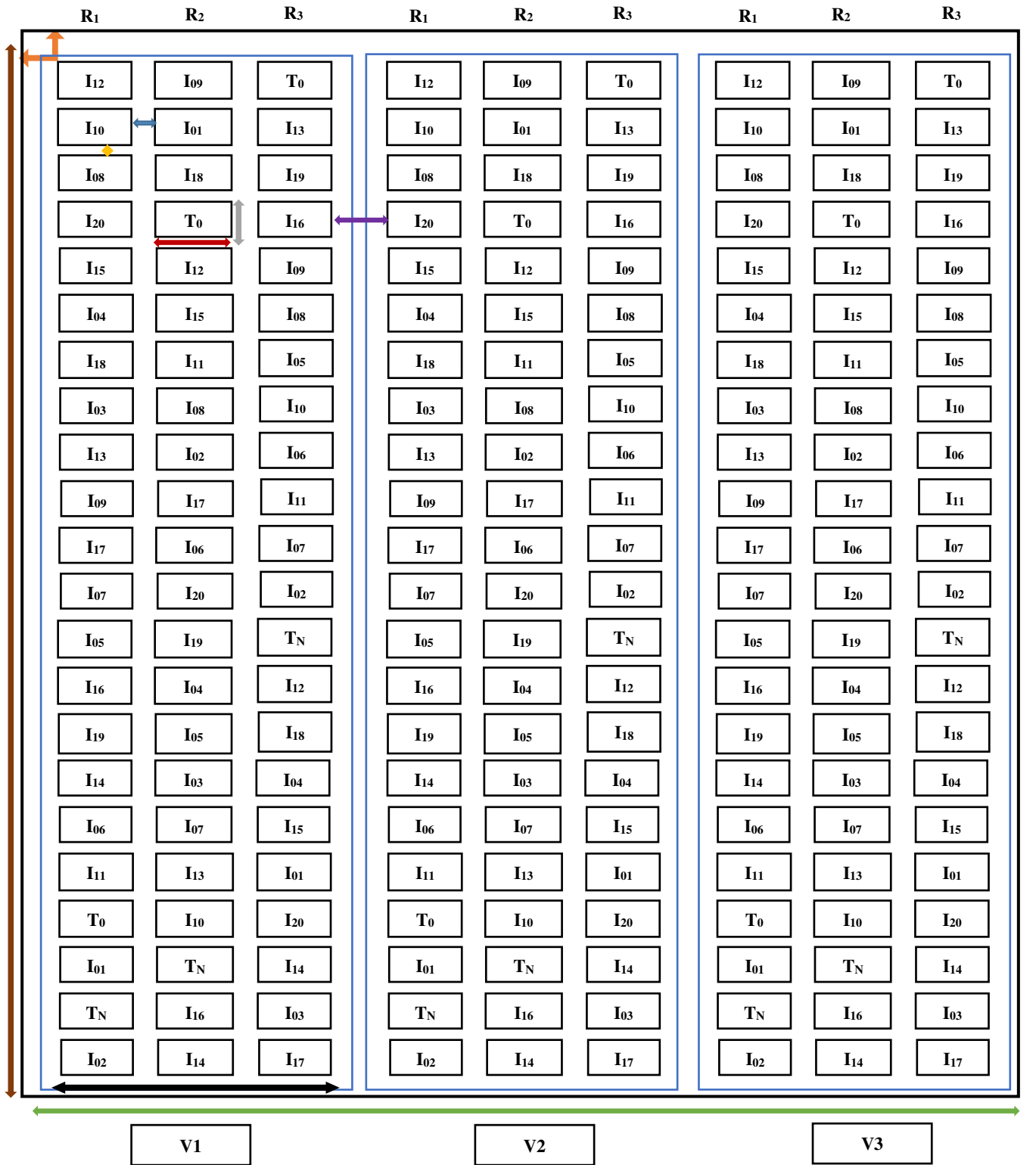


Figure 11 : dispositif expérimental de l'essai en condition de champ

3.3.3. Production d'inoculum

Les isolats bactériens les plus efficaces obtenus à l'issue de la vérification de leur spectre d'hôte variétal ont été utilisés pour produire de l'inoculum expérimental. Ainsi, 50 ml d'une suspension bactérienne de charge estimée à 10^9 bactéries/ml de chacun de ces isolats a été obtenue par repiquage et incubation à 28 °C pendant cinq (05) jours sous agitation à 120 tours/min. Ensuite, 15 ml de ces suspensions ont étéensemencées à 100 g de tourbe stérile chacune (Figure 12). Les inocula ainsi produits ont été incubés à 28 °C pendant une semaine. La densité bactérienne par inoculum a été estimée à 10^9 bactéries/gramme d'inoculum.



Figure 12 : inoculum bactérien contenu dans un sachet de 100 g

3.3.4. Inoculation et semis des graines

Avant le semis, les graines de haricot sec ont été inoculées avec les inocula contenant individuellement chacune des isolats sélectionnés. La méthode d'inoculation par enrobage des semences a été utilisée à raison de 15 kg de semences pour une dose de 100 g d'inoculum. Elle a consisté à la préparation d'une solution sucrée épaisse par dissolution de 120 g de sucre (saccharose) dans 250 mL d'eau. Ensuite, l'inoculum conditionné sous la forme concentrée dans des sachets de 100 g de tourbe a été incorporé à cette solution afin d'obtenir une pâte homogène. Puis, la pâte obtenue a été versée sur les graines et l'ensemble a été mélangé jusqu'à ce que l'inoculum adhère à la totalité des graines. Enfin, celles-ci ont été semées en lignes à raison de 3 graines par poquet à une profondeur de 3 cm ; soit une densité maximale attendue de 300.000 plants à l'hectare. Les parcelles témoins ont étéensemencées les premières afin d'éviter leur contamination par les bactéries présentes dans l'inoculum. Aucun traitement

phytosanitaire n'a été effectué durant tout le cycle de culture. Deux sarclages manuels ont été effectués.

3.3.5. Observations et mesures

3.3.5.1. Effet des isolats sur les paramètres végétatifs et la nodulation du haricot

En début de floraison, 10 plantules par traitement et par répétition ont servi à mesurer les paramètres végétatifs et de nodulation. Les paramètres végétatifs pris en compte sont la hauteur, le diamètre au collet et la biomasse sèche des plants. Les paramètres de nodulation mesurés sont le nombre de nodosités et le poids sec des nodosités par plant. Ces différents paramètres ont permis d'évaluer l'infectivité des isolats bactériens en condition réelle.

3.3.5.2. Effet des isolats sur le rendement et ses composantes

A la maturité, les gousses ont été récoltées et mises à sécher jusqu'à l'obtention d'un poids sec constant. Puis, le poids des gousses par plant, les rendements en gousses et en graines ont été déterminés pour chaque traitement. Les rendements à l'hectare ont été obtenus par la formule 2 de la page 47.

3.4. Caractérisation moléculaire des rhizobia nodulant le haricot sec

La diversité génétique de dix isolats ayant le plus améliorés les performances agronomiques du haricot sec a été déterminée. En outre, un test d'évaluation au champ de l'efficacité symbiotique de ces dix isolats a été réalisé.

3.4.1. Extraction d'ADN génomique des isolats

L'extraction de l'ADN génomique des isolats bactériens a été réalisée au laboratoire URGEM de l'Université JEAN LOROUGNON GUEDE selon le protocole utilisant le phénol/Chloroforme décrit par Javadi *et al.* (2014). Des aliquots de 1 mL de milieu YEM ont étéensemencés avec une colonie bactérienne bien isolée sur boîte de Pétri gélosée puis incubés pendant 48 heures à 28 °C. Après incubation, 350 µL du tampon TE (pH8.0, Tris 50 mM, EDTA 50 mM), 100 µL d'une solution de NaCl (5 M) et 50 µL du détergeant SDS (10 %) ont été ajoutés à la culture bactérienne. Ces derniers ont ensuite été homogénéisés vigoureusement à l'aide d'un vortex pendant 10 minutes pour chaque échantillon. Après ajout de 10 µL de protéinase K (20 mg/mL) et homogénéisation, les échantillons traités ont été portés à incubation au bain marie à 37 °C pendant 2 heures. Les lysats obtenus ont été traités dans un mélange de 500 µL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique dans un rapport de 25 : 24 :1, puis

centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes. Un volume de 500 µL du surnageant (phase aqueuse) prélevés ont été traités dans un mélange de 500 µL de chloroforme/alcool isoamylique dans un rapport de 24 : 1, puis centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes. A 400 µL du surnageant récupéré dans un tube Eppendorf de 1,5 µL, 300 µL d'une solution d'acétate de sodium (3 M) et 500 µL d'isopropanol préalablement placé à -20 °C ont été ajoutés afin de précipiter l'ADN. Ce mélange a été homogénéisé par inversion manuelle et incubé à -20 °C pendant toute une nuit. Après centrifugation à 12000 g pendant 10 minutes, le culot a été suspendu dans 500 µL d'éthanol à 70 % pour un lavage en vue d'éliminer les résidus protéiques. Puis il a été centrifugé pendant 15 minutes à 12000 g. Après cette centrifugation, le surnageant a été éliminé, le culot obtenu a été soumis à un séchage à la température ambiante, puis re-suspendu dans 100 µL de solution de TE (pH 7.4, Tris 10 mM, EDTA 1 mM). La concentration et la pureté de l'ADN extrait ont été déterminées à 260 et 280 nm en utilisant le Nanodrop Spectrophotomètre. L'extrait d'ADN génomique obtenu a été conservé à -20 °C à des fins d'analyse moléculaire.

3.4.2. Amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S

L'amplification par PCR a été effectuée en utilisant la paire d'amorces FD1 (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) et RD1 (5-AAGGAGGTGATCCAGCC-3) comme décrit par Weisburg *et al.* (1991). La réaction de PCR a été réalisée dans un volume total de 25 µL contenant 12,5 µL de MasterMix, 1 µL de chacun des amorces, 9,5 µL d'eau et 1 µL extrait d'ADN matrice. Les mélanges obtenus ont été incubés dans un thermocycleur dans les conditions suivantes : la dénaturation initiale de 3 minutes à 95 °C suivie de 35 cycles composés de la dénaturation à 94 °C pendant 45 secondes, l'hybridation à 60°C pendant 1 minute et l'élongation à 72 °C pendant 1 minute ensuite l'élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes. Les fragments du gène ADNr 16S ont été révélés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1,4 % (p/v) coloré au BET (100 mg/mL) dans le tampon TAE. La migration a été faite pendant 30 min à 100 volts puis les bandes ont été visualisées sous lumière ultraviolette et photographiées à l'aide d'un transilluminateur.

3.4.3. Séquençage et analyse du gène de l'ARNr 16S

Les produits de PCR ont été transférés à la société Inqaba Biotech (Pretoria, Afrique du Sud) pour la purification et le séquençage par la méthode de Sanger automatisée. Les séquences d'ARNr 16S des amplicons ont été déterminées en utilisant le séquenceur ABI 3730 (Applied Biosystems, USA).

3.4.4. Analyse des données de séquençage

Une analyse *in silico* des séquences d'ADN ribosomique a été effectuée afin d'identifier les espèces de rhizobia du haricot sec. Pour ce faire, les séquences Forward et Reverse du gène 16S rRNA ont été alignées avec des séquences de référence de la base de données GenBank (NCBI) en utilisant le programme clustal X et l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool ; <http://www.ncbi.nih.gov>).

3.4.5. Analyse phylogénique

Un alignement multiple des séquences de cette étude et des séquences de référence de la Genbank a été réalisé à l'aide de programme clustal W. L'histoire évolutive des isolats a été présentée sous la forme d'un dendrogramme en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance basée sur le modèle Tamura-Nei (Saitou & Nei, 1987). L'arbre avec la probabilité logarithmique la plus élevée (valeurs bootstraps $\geq 50\%$) a été affiché. Il a été dessiné à l'échelle, avec des longueurs de branches mesurées en nombre de substitutions par site. La proportion de sites où au moins une base non ambiguë est présente dans au moins une séquence pour chaque clade descendant est indiquée à côté de chaque nœud interne de l'arborescence.

3.5. Analyses statistiques des données

Toutes les données brutes collectées ont été saisies sous le tableur Excel 2007. Les diagrammes ont été réalisés grâce à ce tableur. Les valeurs de chaque caractère étudié lors de la caractérisation agromorphologique des 35 accessions de haricot sur les deux (02) essais ont été regroupées avant l'analyse.

Les données recueillies au cours de cette étude ont été analysées à l'aide du logiciel STATISTICA 7.1. En effet, une analyse des variances (ANOVA) à un facteur de classification a été réalisée pour comparer les moyennes des accessions pour l'ensemble des paramètres étudiés. Lorsqu'une différence significative a été observée entre les différents caractères ($p < 0,05$), la comparaison des moyennes a été faite à l'aide des tests LSD de Fisher au seuil de 5%. Toutefois, les données obtenues au cours de la caractérisation agromorphologique des accessions ont fait l'objet d'une estimation des degrés d'association entre les différents caractères étudiés par le coefficient de Pearson. Ces corrélations ont permis d'apprécier le degré d'association entre les variables prises deux à deux. Ces données ont également été soumises à deux méthodes d'analyse multivariées : l'analyse en composantes principales (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH). Le but de l'ACP est de mieux cerner la variabilité existante entre les accessions étudiées. Elle a pour principe de regrouper les variables les plus corrélées entre elles en un nombre réduit de variables synthétiques indépendantes. Ces

nouvelles variables contribuent à la formation des axes de composantes principales qui sont décrites par leur valeur propre et leur taux de variabilité (Palm, 1996). L'ACP permet d'identifier les variables qui contribuent le plus à la différenciation de ces groupes.

La CAH quant à elle a été utilisée pour mettre en évidence et classer des groupes homogènes d'accessions. Son principe est d'agréger de manière successive des objets qui ont un degré de similarité suffisant pour être réuni en une même classe.

La méthode de Ward (1963) comme critère d'agglomération et la distance euclidienne comme indice de similarité ont été utilisés comme méthode de classification. L'analyse évolutive ou phylogénique des espèces de rhizobia a été réalisée avec le logiciel MEGA version 11. Les résultats obtenus à l'issue de ces analyses ont été présentés et discutés dans la troisième partie de cette thèse.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1 : PERFORMANCES AGRONOMIQUES DE 35 ACCESSIONS DE HARICOT SEC

Ce chapitre présente les résultats des performances agronomique des accessions étudiées. L'objectif a été d'identifier des accessions prometteuses dans les programmes de vulgarisation.

1. RESULTATS

1.1. Analyse comparative des accessions

1.1.1. Paramètres de croissance des accessions de haricot sec

Les résultats relatifs aux paramètres de croissance des 35 accessions de haricot sec sont consignés dans le tableau VI. Ces résultats ont révélé qu'il existe une variabilité entre les différentes accessions en tenant compte du taux de levée, de la vigueur des plants, du nombre de nœuds et la biomasse sèche des plants. En effet, concernant le taux de levée, les valeurs les plus importantes (93,2 %) ont été enregistrées chez HARI16/GHA19 ; tandis que HARI4/BKE18 en a produit les plus faibles (62,4 %). L'indice de la vigueur végétative a varié entre 0,68 et 1,27. Les plants les moins vigoureux ont été obtenus chez HARI02/KEN18 tandis que les plus vigoureux ont été observés chez HARI22/GHA19. Les nombres de nœud les plus élevés ont été de 7,3 ; 7,5 et 7,6. Ils ont été produits par, HARI26/GHA19 , HARI35/GHA19 et HARI5/BON18 respectivement. Par contre, c'est chez l'accession HARI30/GHA19 qu'a été noté le nombre de nœud le plus faible avec une moyenne de 4,6 par plant. Quant à la biomasse sèche, la valeur la plus élevée (21,7 g) a été générée par l'accession HARI5/BON18.

Tableau VI : variation des paramètres végétatifs de 35 accessions de haricot sec.

Accessions	Taux de levée (%)	Indice de la vigueur végétative	Nombre de nœuds par plant	Biomasse sèche par plant (g)
HARI1/KEN16	80,3±18abcdefg	0,86±0,35bcdef	5,3±1,9ab	8,58±4,8b
HARI2/KEN18	87,9±13,3abc	0,68±0,26f	6,1±2,9ab	11,86±7,9b
HARI3/FER18	86,6±13abcd	0,92±0,23abcdef	5,6±2,7ab	11,67±9,1b
HARI4/BKE18	62,5±27,4g	0,71±0,16ef	6,3±0,7ab	12,53±8,8b
HARI5/BON18	73,3±15,8bcdefg	1,19±0,17abc	7,6±4,9a	21,65±17a
HARI6/BON18	90,2±6,7abc	1,13±0,36abcd	6,6±3,6ab	12,48±7,8b
HARI7/GHA18	87,3±9,1abc	1±0,27abcdef	5,8±3,1ab	11,98±8,5b
HARI8/GHA18	88,6±7,5abc	0,72±0,38def	4,9±1,4ab	11,95±7b
HARI9/GHA18	90,9±3,8ab	0,88±0,34abcdef	5,9±2,9ab	10,84±4,6b
HARI10/GHA18	88,4±7,6abc	0,82±0,39cdef	4,7±1,6b	10,8±9,8b
HARI11/GHA18	86,4±11,1abcd	0,83±0,29bcdef	5,4±2,3ab	15,11±9,8ab
HARI12/GHA18	87,8±11,8abc	0,74±0,35def	5,1±1,8ab	10,75±5,5b
HARI13/GHA18	86,9±8,5abc	0,93±0,49abcdef	5,8±2,9ab	15,65±9,5ab
HARI14/GHA19	65,5±31,2efg	1,24±0,34ab	6,7±3,4ab	14,43±8,4ab
HARI15/GHA19	89±8,5abc	1,07±0,36abcdef	5±1,9ab	10,95±5b
HARI16/GHA19	93,2±8,4a	0,97±0,45abcdef	5,8±1,7ab	14,3±10ab
HARI17/GHA19	82,2±15,2abcdef	0,94±0,47abcdef	5±1,3ab	12,77±6,9b
HARI18/GHA18	89±10,5abc	1,06±0,27abcdef	6±2,1ab	14,11±7,6ab
HARI19/GHA19	76,5±22,5abcdefg	0,79±0,24def	5,5±2,1ab	9,62±6b
HARI20/GHA19	81,8±13,8abcdef	1,1±0,29abcde	6,6±2,9ab	11,37±8b
HARI21/GHA19	85,8±6,5abcd	1,07±0,45abcdef	6±3,5ab	12,31±7,8b
HARI22/GHA19	68,2±28,6defg	1,27±0,3a	6,2±3,2ab	8,63±0,8b
HARI23/GHA19	83±15,6abcde	1,02±0,48abcdef	5,5±2,4ab	10,8±5,1b
HARI24/GHA19	81,4±12,7abcdef	0,99±0,42abcdef	6,4±3,6ab	12,15±6,2b
HARI25/GHA19	79,5±21,6abcdefg	1,05±0,4abcdef	5,1±1,8ab	13,41±6,5ab
HARI26/GHA19	87,9±11abc	0,96±0,24abcdef	7,3±1,2a	11,62±6b
HARI27/GHA19	78,3±17abcdefg	1,07±0,44abcdef	5,9±2,5ab	12,94±5,9ab
HARI28/GHA19	63,6±31,2fg	0,79±0,35cdef	5,9±3ab	9,97±3b
HARI29/GHA19	71,7±28,3cdefg	1,09±0,32abcde	6,3±3ab	11,94±5,9b
HARI30/GHA19	90,5±8,8ab	1,08±0,52abcdef	4,6±1,8b	13,47±7,7ab
HARI31/GHA19	85,3±12,7abcd	1,06±0,25abcdef	5,7±2,7ab	9,29±2,8b
HARI32/GHA19	78,3±20,9abcdefg	0,91±0,33abcdef	6±3,1ab	12,73±9,8b
HARI33/GHA19	89,5±8,1abc	0,87±0,38bcdef	5,5±2,4ab	14,35±8,4ab
HARI34/GHA19	86,7±13,7abcd	1,09±0,35abcdef	5,6±2,5ab	13,05±7,7ab
HARI35/GHA19	85,6±12,3abcd	0,79±0,31def	7,5±4,5a	9,86±5,1b
Moyenne	82,6±17,02	0,96±0,36	5,9±2,58	28,52±7,4
Probabilité	0,040	0,030	0,010	0,007
CV (%)	20,6	37,5	43,95	74,72

Dans chaque colonne les moyennes affectées de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test de Fisher), CV : coefficient de variabilité.

1.1.2. Paramètres phénologiques

Les paramètres phénologiques des accessions sont présentés dans le tableau VII. Les délais des stades phénologiques (floraison et fructification) ont varié significativement ($P < 0,001$) selon les accessions. En effet, le délai de floraison des accessions est intervenu entre le 30^e et le 45^e Jours Après Semis (JAS) avec une moyenne de 34 jours. Les accessions HARI9/GHA18, HARI26/GHA19, HARI30/GHA19 et HARI34/GHA19 ont été les plus précoces et ont atteint la floraison le 30^e JAS. L'accession HARI6/BON18 a atteint ce stade en 45 jours. Quant à la fructification, elle est intervenue dans un intervalle de 40 à 56 JAS avec une moyenne de 43 jours. Les accessions HARI26/GHA19, HARI30/GHA19 et HARI34/GHA19 ont atteint la fructification dès le 40^e JAS. Les accessions HARI5/BON18, HARI6/BON18 et HARI35/GHA19 ont été les plus tardives et ont atteint ce stade à 56 JAS.

Tableau VII : stades phénologiques (floraison et fructification) de 35 accessions de haricot

Accessions	Délai de floraison (JAS)	Délai de fructification (JAS)
HARI1/KEN16	37±6,7bcde	46,8±6,8b
HARI2/KEN18	36,8±3,2bcde	46,2±5,7b
HARI3/FER18	31,7±1,5de	41,8±1,3b
HARI4/BKE18	32,3±2,2de	41,8±1,3b
HARI5/BON18	40,8±4ab	56,2±7,6a
HARI6/BON18	45,3±5,7a	55,8±7,7a
HARI7/GHA18	32,5±1,2de	41,7±1,2b
HARI8/GHA18	34,7±4,1bcde	43,7±4,7b
HARI9/GHA18	31,3±1,4e	41,3±0,8b
HARI10/GHA18	32,7±1,4de	41,5±1,2b
HARI11/GHA18	31,5±1,6de	41,2±0,4b
HARI12/GHA18	34±4,7cde	43±5,1b
HARI13/GHA18	33,5±1,2de	43,2±3,5b
HARI14/GHA19	33,2±0,4de	42±1,1b
HARI15/GHA19	31,7±1,5de	41,7±1b
HARI16/GHA19	33,5±0,8de	42±1,1b
HARI17/GHA19	32,5±1,2de	41,5±1,2b
HARI18/GHA18	31,8±1,3de	41,3±1,4b
HARI19/GHA19	35,5±4bcde	44,3±4b
HARI20/GHA19	33,2±1,9de	43,2±3,5b
HARI21/GHA19	34,3±2,8bcde	43,7±4,7b
HARI22/GHA19	32,5±1,2de	41,7±1b
HARI23/GHA19	32,7±1,4de	41,7±1b
HARI24/GHA19	37,2±7,3bcde	46,2±8,3b
HARI25/GHA19	31,5±1,6de	41,2±1,5b
HARI26/GHA19	31,3±1,4e	40,7±1,9b
HARI27/GHA19	33,7±1cde	43±2,4b
HARI28/GHA19	33±1,3de	42,2±2,3b
HARI29/GHA19	38±5,5bcd	47±6,6b
HARI30/GHA19	31,3±1,9e	40,5±0,8b
HARI31/GHA19	32±1,5de	41,2±1b
HARI32/GHA19	33,2±1,3de	43,7±3,7b
HARI33/GHA19	33±1,9de	42,7±3,2b
HARI34/GHA19	30,7±1,9e	40±1,5b
HARI35/GHA19	40,2±3,4abc	55,8±6,8a
Moyenne	34±4,15	43,5±5,43
Probabilité	< 0,001	< 0,001
CV (%)	12,2	12,4

Dans chaque colonne les moyennes affectées de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test de Fisher), CV : coefficient de variabilité, JAS : jours après semis.

1.1.3. Composantes du rendement des accessions

1.1.3.1. Composantes liées aux gousses

La longueur des gousses, le nombre de graine par gousse, le poids de gousses plant et le rendement en gousses ont été présentés dans le tableau VIII. Une grande variabilité a été observée entre les accessions en ce qui concerne tous ces paramètres. En effet, la longueur des gousses a varié de 9 à 13 cm avec une moyenne de 10,54 cm. C'est l'accession HARI4/BKE18 qui a présenté les gousses les plus longues avec 13,74 cm contrairement à l'accession HARI27/GHA19 qui a eu les gousses les plus petites (8,99 cm). Pour le nombre de graines par gousse, c'est chez l'accession HARI5/BON18 qu'a été enregistré les plus grandes valeurs (5,1). Les gousses avec les plus petits nombres de grains (2,3) ont été observées chez HARI1/KEN16. Les valeurs relatives au paramètre poids de gousses par plant ont varié de 5 à 36 g. Le poids le plus élevé a été obtenu avec les gousses de l'accession HARI5/BON18. Quant aux poids de gousses les plus faibles, ils ont été notés chez les accessions HARI1/KEN16, HARI6/BON18, HARI19/GHA19, HARI23/GHA19, HARI28/GHA19 et HARI29/GHA19. L'accession HARI11/GHA18 a enregistré le rendement en gousses le plus élevé avec un rendement moyen de 2,04 t.ha⁻¹. L'accession HARI1/KEN16 a été la moins productive avec 0,92 t.ha⁻¹ de rendement.

Tableau VIII : longueur de gousses, nombre de graines par gousse, poids de gousses par plant et rendement en gousses chez 35 accessions

Accessions	Longueur des gousses (cm)	Nombre de graines par gousse	Poids de gousses par plant (g)	Rendement en gousses (t.h ⁻¹)
HARI1/KEN16	10,43±0,2bcde	2,3±1,3f	5,7±3,5b	0,92±0,2g
HARI2/KEN18	10,27±0,6bcde	4±0,6abcd	17,6±8,9ab	1,37±0,5bcdefg
HARI3/FER18	10,33±0,4bcde	3,7±0,8bcde	14,4±3,2b	1,53±0,4abcdefg
HARI4/BKE18	13,73±3,2a	4,1±0,2abcd	24,8±5,4ab	1,20±0,4efg
HARI5/BON18	12,09±0,7ab	5,1±0,9a	36,5±2,1a	1,73±1,4abcde
HARI6/BON18	11,14±1,5bcd	4,7±0,6ab	12,8±7,7b	0,96±0,6fg
HARI7/GHA18	10,74±0,5bcde	4,5±0,7ab	16,0±7,8ab	1,52±0,3abcdefg
HARI8/GHA18	11,35±1,2bc	4,6±0,6ab	21,1±5,4ab	1,98±0,5ab
HARI9/GHA18	10,38±0,7bcde	4,3±0,6abc	18,8±3,8ab	1,72±0,3abcde
HARI10/GHA18	9,57±0,4cde	4,1±0,3abcd	20,9±5,5ab	1,50±0,6abcdefg
HARI11/GHA18	10,93±1,1bcd	4,5±0,4ab	21,9±5,6ab	2,04±0,3a
HARI12/GHA18	11,32±0,8bc	4,6±0,4ab	18,9±4,7ab	1,74±0,6abcde
HARI13/GHA18	9,30±0,7de	3,8±0,3bcde	19,1±6,0ab	1,73±0,4abcde
HARI14/GHA19	11,40±0,6bc	4,1±0,4abcd	24,3±7,4ab	1,93±0,6abc
HARI15/GHA19	10,17±0,4bcde	3,6±0,6bcdef	16,7±3,9ab	1,53±0,6abcdef
HARI16/GHA19	11,11±0,4bcd	4,2±0,3abcd	22,5±1,1ab	1,73±0,8abcde
HARI17/GHA19	10,57±0,7bcde	4,2±0,4abc	22,7±1,4ab	1,90±0,3abc
HARI18/GHA18	10,11±0,8cde	4±0,5abcd	18,7±5,0ab	1,50±0,5abcdefg
HARI19/GHA19	9,76±0,3cde	3±0,5cdef	11,3±1,2b	1,28±0,1defg
HARI20/GHA19	10,11±0,5cde	3,6±0,6bcdef	20,2±1,7ab	1,73±0,4abcde
HARI21/GHA19	10,56±0,4bcde	3,8±0,4abcde	22,0±7,1ab	1,49±0,4abcdefg
HARI22/GHA19	10,54±0,5bcde	4,2±0,3abcd	22,5±3,9ab	1,47±0,4abcdefg
HARI23/GHA19	10,25±0,3bcde	3,6±0,4bcdef	14,9±3,1b	1,46±0,2abcdefg
HARI24/GHA19	10,07±0,3cde	3,7±0,3bcde	18,6±1,7ab	1,33±0,5cdefg
HARI25/GHA19	10,35±0,2bcde	3,6±0,6bcdef	16,1±4,2ab	1,37±0,4bcdefg
HARI26/GHA19	10,07±0,3cde	4±0,3abcd	16,1±4,3ab	1,16±0,3efg
HARI27/GHA19	8,99±1,2e	2,5±0,9ef	24,0±1,4ab	1,37±0,8bcdefg
HARI28/GHA19	10,60±0,7bcde	4±0,2abcd	13,6±4,4b	1,20±0,4efg
HARI29/GHA19	10,78±0,7bcde	2,9±1,3def	12,3±5,1b	1,00±0,6fg
HARI30/GHA19	10,40±0,8bcde	4,4±0,2ab	16,1±4,9ab	1,40±0,3bcdefg
HARI31/GHA19	11,14±0,8bcd	4±0,6abcd	21,9±7,4ab	1,84±0,3abcd
HARI32/GHA19	11,09±0,7bcd	4,6±0,5ab	19,2±1,7ab	1,66±0,7abcde
HARI33/GHA19	9,61±0,6cde	4,5±0,7ab	22,9±6,4ab	1,63±0,5abcde
HARI34/GHA19	10,44±0,5bcde	3,9±0,4abcd	17,6±7,3ab	1,74±0,4abcde
HARI35/GHA19	9,29±0,8de	3,9±0,6abcd	20,9±1,8ab	1,70±0,4abcde
Moyenne	10,54±1,2	4±0,63	18,97±5,03	1,52±0,6
Probabilité	0,001	0,006	0,010	0,018
CV (%)	11,10	20,12	52,89	37,03

Dans chaque colonne les moyennes affectées de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test de Fisher), CV : coefficient de variabilité.

1.1.3.2. Composantes liées aux graines

✓ Longueur et diamètre des graines et poids de graines par plant

Les résultats consignés dans le tableau IX mettent en évidence l'existence d'une variabilité entre les accessions en ce qui concerne les paramètres tels que la longueur et le diamètre des graines ainsi que le poids de graines par plant. En effet, la longueur des graines a varié de 0,83 à 1,5 cm avec une moyenne de 1,1 cm. Les graines les plus longues ont été produites par l'accession HARI4/BKE18 et les plus petites par HARI33/GHA19. Le diamètre des graines quant à lui a varié de 0,42 à 0,57 cm. Les plus grands diamètres de graines ont été obtenus chez HARI4/BKE18 et HARI12/GHA18 tandis que les plus petits ont été générés par HARI01/KEN16. Pour ce qui concerne le poids des graines par plant, il a varié de 2,8 à 15,1 g. HARI17/GHA19 a été l'accession qui a généré le poids de graines par plant le plus élevé.

Tableau IX : dimension des graines et poids de graines par plant de 35 accessions de haricot

Accessions	Longueur des graines (cm)	Diamètre des graines (cm)	Poids de graines par plant (g)
HARI1/KEN16	1,01±0,1efghi	0,42±0,09b	2,8±0,7c
HARI2/KEN18	1,12±0,06bcdef	0,48±0,08ab	7,5±1,2abc
HARI3/FER18	1,17±0,07bcde	0,51±0,01ab	8,0±0,8abc
HARI4/BKE18	1,53±0,06a	0,57±0,04a	10,5±3,0abc
HARI5/BON18	1,12±0,03bcdef	0,46±0,05ab	12,7±1,0ab
HARI6/BON18	1,11±0,03bcdef	0,48±0,08ab	8,2±1,9abc
HARI7/GHA18	1,04±0,06cdefgh	0,48±0,05ab	10,5±4,8abc
HARI8/GHA18	1,01±0,03defghi	0,51±0,02ab	11,8±2,8abc
HARI9/GHA18	0,91±0,04hij	0,47±0,05ab	11,5±1,0abc
HARI10/GHA18	0,86±0,05ij	0,48±0,06ab	8,8±3,5abc
HARI11/GHA18	0,97±0,08fghij	0,5±0,01ab	12,9±2,5ab
HARI12/GHA18	0,94±0,19ghij	0,57±0,14a	12,7±3,5ab
HARI13/GHA18	0,87±0,08ij	0,49±0,05ab	8,8±2,3abc
HARI14/GHA19	1,17±0,11bcd	0,53±0,09ab	11,8±3,5abc
HARI15/GHA19	1,11±0,08bcdef	0,47±0,05ab	9,5±3,3abc
HARI16/GHA19	1,2±0b	0,5±0ab	11,1±3,1abc
HARI17/GHA19	1,16±0,1bcde	0,49±0,07ab	15,1±2,3a
HARI18/GHA18	1,12±0,03bcdef	0,51±0,01ab	10,4±2,2abc
HARI19/GHA19	1,22±0,02b	0,5±0ab	4,7±1,5bc
HARI20/GHA19	1,21±0,05b	0,53±0,06ab	9,8±3,0abc
HARI21/GHA19	1,21±0,08b	0,54±0,05ab	10,0±3,3abc
HARI22/GHA19	1,14±0,07bcde	0,52±0,11ab	10,2±2,9abc
HARI23/GHA19	1,19±0,05bc	0,49±0,04ab	7,6±2,0abc
HARI24/GHA19	1,22±0,05b	0,5±0,06ab	8,3±1,6abc
HARI25/GHA19	1,11±0,02bcdef	0,48±0,04ab	8,2±3,9abc
HARI26/GHA19	1,11±0,04bcdef	0,49±0,03ab	10,0±4,3abc
HARI27/GHA19	1,13±0,03bcdef	0,45±0,05ab	7,8±3,9abc
HARI28/GHA19	1,1±0,05bcdefg	0,48±0,05ab	7,7±3,9abc
HARI29/GHA19	1,11±0,11bcdef	0,45±0,05ab	5,7±2,3abc
HARI30/GHA19	1,14±0,07bcde	0,49±0,04ab	12,3±3,3ab
HARI31/GHA19	1,15±0,09bcde	0,51±0,09ab	11,6±2,5abc
HARI32/GHA19	1,14±0,08bcde	0,5±0,06ab	9,6±4,4abc
HARI33/GHA19	0,83±0,06j	0,44±0,06ab	12,6±3,4ab
HARI34/GHA19	1,14±0,09bcde	0,47±0,07ab	11,3±2,6abc
HARI35/GHA19	0,93±0,04hij	0,45±0,05ab	7,5±1,9abc
Moyenne	1,1±0,15	0,49±0,06	9,7±2,7
Probabilité	0,001	0,010	0,001
CV (%)	13,29	13,19	47,99

Dans chaque colonne les moyennes affectées de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test de Fisher), CV : coefficient de variabilité.

✓ **Poids de 100 graines, rendement en graine et indice de récolte**

Les résultats relatifs à la masse de 100 graines, au rendement en graine et à l'indice de récolte sont indiqués dans le tableau X. Une différence significative a été observée entre les accessions de haricot sec en rapport avec les descripteurs utilisés. En effet, au niveau du poids de 100 graines, il a été de 35,6 g pour le poids le plus élevé et a été noté chez l'accession HARI4/BKE18. Par contre, le plus faible poids de 100 graines (16,1 g) a été enregistré chez HARI6/BON18. Quant au rendement en graines, il a varié de 0,45 t.ha⁻¹ (HARI1/KEN16) à 1,46 (HARI17/GHA19). Concernant l'indice de récolte, le meilleur a été généré par HARI12/GHA18 (0,59) alors que HARI01/KEN16 a obtenu les plus faibles (0,21).

Tableau X : variation du poids de 100 graines, du rendement en graine et de l'indice de récolte chez 35 accessions de haricot sec

Accessions	Poids de 100 g (g)	Rendement en graines (t.h ⁻¹)	Indice de récolte
HARI1/KEN16	26,3±0,7bcdefg	0,45±0,3c	0,21±0,22c
HARI2/KEN18	21,1±2,1hijkl	0,92±0,4abc	0,35±0,09abc
HARI3/FER18	27,4±1,4bcd	1,05±0,3abc	0,34±0,14abc
HARI4/BKE18	35,6±0,8a	1,04±0,3abc	0,45±0,06abc
HARI5/BON18	17,4±4,2kl	1,07±0,9abc	0,36±0,19abc
HARI6/BON18	16,1±5,2l	0,65±0,6bc	0,39±0,26abc
HARI7/GHA18	22,4±2,6efghijk	1,13±0,1abc	0,44±0,12abc
HARI8/GHA18	22,6±1,9cdefghij	1,31±0,4ab	0,52±0,07ab
HARI9/GHA18	21,0±2,0hijkl	1,19±0,2abc	0,49±0,11abc
HARI10/GHA18	21,4±2,6ghijk	0,89±0,3abc	0,46±0,04abc
HARI11/GHA18	21,6±1,3fghijk	1,32±0,3ab	0,47±0,05abc
HARI12/GHA18	22,6±1,2cdefghij	1,13±0,4abc	0,59±0,09a
HARI13/GHA18	20,7±1,3ijkl	1,08±0,2abc	0,28±0,15abc
HARI14/GHA19	28,8±1,4b	1,21±0,3abc	0,4±0,1abc
HARI15/GHA19	25,3±1,6bcdefghi	0,99±0,3abc	0,42±0,11abc
HARI16/GHA19	29,5±2,3b	1,27±0,6ab	0,43±0,09abc
HARI17/GHA19	29,8±1,3b	1,46±0,3a	0,52±0,04ab
HARI18/GHA18	25,9±2,5bcdefgh	1,00±0,2abc	0,34±0,1abc
HARI19/GHA19	27,1±0,1bcde	0,77±0,1abc	0,24±0,03bc
HARI20/GHA19	25,4±2,0bcdefghi	1,03±0,2abc	0,49±0,34abc
HARI21/GHA19	26,7±2,3bcde	0,92±0,2abc	0,41±0,07abc
HARI22/GHA19	25,5±1,5bcdefghi	1,00±0,3abc	0,42±0,1abc
HARI23/GHA19	28,4±2,6b	1,16±0,2abc	0,36±0,12abc
HARI24/GHA19	28,1±2,9b	0,82±0,4abc	0,35±0,11abc
HARI25/GHA19	26,5±2,6bcdef	0,97±0,3abc	0,29±0,1abc
HARI26/GHA19	28,3±2,0b	0,89±0,1abc	0,41±0,09abc
HARI27/GHA19	29,6±4,4b	0,71±0,4abc	0,35±0,26abc
HARI28/GHA19	27,2±1,6bcde	0,82±0,3abc	0,37±0,2abc
HARI29/GHA19	26,9±1,5bcde	0,60±0,4bc	0,26±0,16bc
HARI30/GHA19	26,9±1,5bcde	0,91±0,2abc	0,48±0,14abc
HARI31/GHA19	27,9±3,5b	1,27±0,5ab	0,49±0,12abc
HARI32/GHA19	27,5±1,3bc	1,12±0,5abc	0,43±0,15abc
HARI33/GHA19	22,5±1,8defghij	1,02±0,3abc	0,47±0,08abc
HARI34/GHA19	26,7±1,1bcde	0,98±0,4abc	0,39±0,07abc
HARI35/GHA19	20,0±0,7jkl	1,09±0,2abc	0,38±0,05abc
Moyenne	25,3±4,4	1,01±0,4	0,4±0,15
Probabilité	0,001	0,001	< 0,001
CV (%)	17,38	38,87	37,53

Dans chaque colonne les moyennes affectées de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test de Fisher), CV : coefficient de variabilité.

1.2. Structuration de la variabilité agromorphologique

1.2.1. Corrélation entre les paramètres agro-morphologiques

Une matrice de corrélation de Pearson a été générée pour déterminer le niveau de relation entre les variables agromorphologiques étudiées tels que : taux de levée (TL), délais de floraison (DFI), délai de fructification (DFr), indice de la vigueur végétative (IVV), nombre de nœuds (NN), biomasse sèche (BS), longueur des gousses (LGs), diamètre des graines (DGr), longueur des graines (LGr), nombre de graine par gousse (NGr/Gs), poids de gousse par plant (PGsP), poids de graine par plant (PGrP), rendement en gousse (RGs), rendement en graine (RGr), poids de 100 graines (P100G) et indice de récolte (IRe), (Tableau XI). Cette matrice a montré une relation linéaire entre les caractères par des corrélations significatives entre plusieurs couples de variables. Seules les corrélations significatives ($P < 0,05$) ont été mises en relief dans le tableau XI.

La plus forte corrélation positive ($r = 0,95$) a été notée entre le délai de floraison (DFI) et le délai de fructification (DFr) tandis que la plus forte corrélation négative ($r = -0,57$) a lié le même délai de fructification (DFr) au poids de 100 graines (P100G). Par ailleurs, l'analyse de la corrélation a permis d'identifier une corrélation positive entre la BS et le PGsP ($r = 0,63$). La corrélation entre ces deux (02) variables a montré que lorsque la biomasse sèche des plants est élevée, ces derniers produisent des poids de gousse par plant importants. De même, cette matrice a indiqué des corrélations positives entre le PGsP et le NGr/Gs ($r = 0,53$), le PGrP ($r=0,67$), le RGs ($r = 0,60$) et le RGr ($r = 0,55$). Ce qui se traduit par le fait que lorsque le poids de gousses par plant est élevé, le nombre de graines par gousse, le poids de graines par plant, les rendements en gousses et en graines le sont également.

Tableau XI : matrice de corrélation de Pearson (r) entre les paramètres agromorphologiques de 35 accessions de haricot sec

Paramètres	TL	IVV	NN	BS	DFI	DFr	LGs	DGr	LGr	NGr/Gs	PGsP	PGrP	P100G	RGs	RGr	IRe
TL	1,00															
IVV	-0,16	1,00														
NN	-0,32	0,27	1,00													
BS	0,02	0,27	0,25	1,00												
DFI	-0,06	0,04	0,50	0,13	1,00											
DFr	-0,06	0,05	0,59	0,22	0,95	1,00										
LGs	-0,40	-0,02	0,14	0,24	0,08	0,07	1,00									
DGr	-0,19	-0,04	-0,01	-0,04	-0,27	-0,32	0,51	1,00								
LGr	-0,48	0,22	0,21	-0,02	-0,05	-0,10	0,52	0,48	1,00							
NGr/Gs	0,20	-0,03	0,09	0,42	0,03	0,11	0,44	0,32	-0,16	1,00						
PGsP	-0,15	0,21	0,32	0,63	-0,02	0,13	0,31	0,25	0,07	0,53	1,00					
PGrP	0,20	0,14	-0,10	0,46	-0,36	-0,27	0,35	0,38	-0,06	0,76	0,67	1,00				
P100G	-0,42	0,05	-0,14	-0,23	-0,51	-0,57	0,22	0,33	0,70	-0,42	-0,08	-0,04	1,00			
RGs	0,24	0,00	-0,14	0,33	-0,35	-0,22	0,06	0,28	-0,25	0,50	0,60	0,72	-0,15	1,00		
RGr	0,19	-0,09	-0,13	0,25	-0,41	-0,30	0,26	0,40	-0,05	0,60	0,55	0,77	0,02	0,88	1,00	
IRe	0,28	-0,12	-0,23	-0,01	-0,31	-0,28	0,29	0,45	-0,11	0,67	0,43	0,81	-0,06	0,59	0,65	1,00

Seules les valeurs en gras ont été les plus significatives au seuil de 5%. TL = taux de levée ; DFI = délais de floraison ; DFr = délai de fructification ; IVV = indice de la vigueur végétative ; NN = nombre de nœuds ; BS = biomasse sèche ; LGs = longueur des gousses ; DGr = diamètre des graines ; LGr = longueur des graines ; NGr/Gs = nombre de graine par gousse ; PGsP = poids de gousse par plant ; PGrP = poids de graine par plant ; RGs = rendement en gousses ; RGr = rendement en graines ; P100G = poids de 100 graines ; IRe = indice de récolte.

1.2.2. Variables contribuant à la différenciation des groupes d'accessions

L'analyse en composantes principales réalisée pour décrire la diversité des accessions de haricot sec a montré que les quatre premiers axes ont eu leur valeur propre supérieure à 1. Ces axes ont permis d'expliquer 77,45 % de la variance présente dans les variables. Cependant, le test d'accumulation de variance a montré que les deux (02) premiers axes ont été les plus pertinents. Ces axes ont expliqué respectivement 31,33 et 19,86 % soit 51,19 % de la variabilité totale, elles ont aussi été utilisés pour décrire et analyser la variabilité agromorphologique des accessions. Le tableau XII présente les vecteurs, les valeurs propres, le pourcentage de variance totale et la variance cumulée totale pour les caractères utilisés dans cette étude.

Le premier axe a exprimé le rendement et ses composantes. Les caractères qui contribuent à la formation de cet axe y sont négativement corrélés. Ce sont le diamètre des graines (DGr), le nombre de graine par gousse (NGr/Gs), le poids de gousse par plant (PGsP), le poids de graines par plant (PGrP), le rendement en gousse (RGs), le rendement en graines (RGr) et l'indice de récolte (IRe). Le deuxième axe quant à lui, définit les paramètres végétatifs et phénologiques et est de ce fait corrélé négativement au nombre de nœuds (NN), à la biomasse sèche (BS), aux délais de floraison (DFI) et de fructification (DFr). Cet axe a décrit les accessions à nombre de nœuds et biomasse sèche faible ainsi qu'à floraison et fructification précoces.

La projection dans le plan factoriel formé par les axes 1 (Fact. 1) et 2 (Fact. 2) des accessions de haricot sec illustrée par la figure 13 a mis en évidence deux (02) groupes. Le groupe 1 (G1) est constitué des accessions dont les plantes sont précoces en termes de délai de floraison et de fructification avec un bon développement végétatif et des composantes de rendement élevées. A ce groupe d'accessions, l'axe 2 oppose les accessions du groupe 2 (G2) qui se sont caractérisées par un cycle de culture long. Les accessions de ce groupe sont aussi discriminées par de faibles valeurs des variables nombre de graine par gousse, poids de graine par plant, rendement en gousse, nombre de nœuds et biomasse sèche.

Tableau XII : valeurs propres et pourcentage de variation

Composantes principales	Axe 1	Axe 2	Axe 3	Axe 4
Valeur propre	5,01	3,18	2,82	1,38
Variance totale (%)	31,33	19,86	17,63	8,64
Cumul de la variance totale (%)	31,33	51,19	68,82	77,45
Caractères définissant les axes et leurs valeurs propres				
TL	-0,17	-0,16	-0,74	-0,04
IVV	-0,01	-0,14	0,34	0,68
NN	0,13	-0,54	0,56	0,10
BS	-0,40	-0,52	0,24	0,43
DFI	0,41	-0,77	0,23	-0,30
DFr	0,32	-0,86	0,22	-0,22
LGs	-0,40	0,01	0,67	-0,42
DGr	-0,52	0,36	0,42	-0,34
LGr	0,02	0,39	0,81	-0,04
NGr/Gs	-0,77	-0,41	0,01	-0,27
PGsP	-0,69	-0,36	0,33	0,27
PGrP	-0,95	-0,07	-0,01	0,10
P100G	0,02	0,80	0,45	0,15
RGs	-0,83	-0,08	-0,23	0,19
RGr	-0,89	0,05	-0,09	0,01
IRe	-0,82	0,07	-0,17	-0,30

Seules les valeurs en gras ont été les plus significatives au seuil de 5%. TL = taux de levée ; DFI = délais de floraison ; DFr = délai de fructification ; IVV = indice de la vigueur végétative ; NN = nombre de nœuds ; BS = biomasse sèche ; LGs = longueur des gousses ; DGr = diamètre des graines ; LGr = longueur des graines ; NGr/Gs = nombre de graine par gousse ; PGsP = poids de gousse par plant ; PGrP = poids de graine par plant ; RGs = rendement en gousses ; RGr = rendement en graines ; P100G = poids de 100 graines ; IRe = indice de récolte.

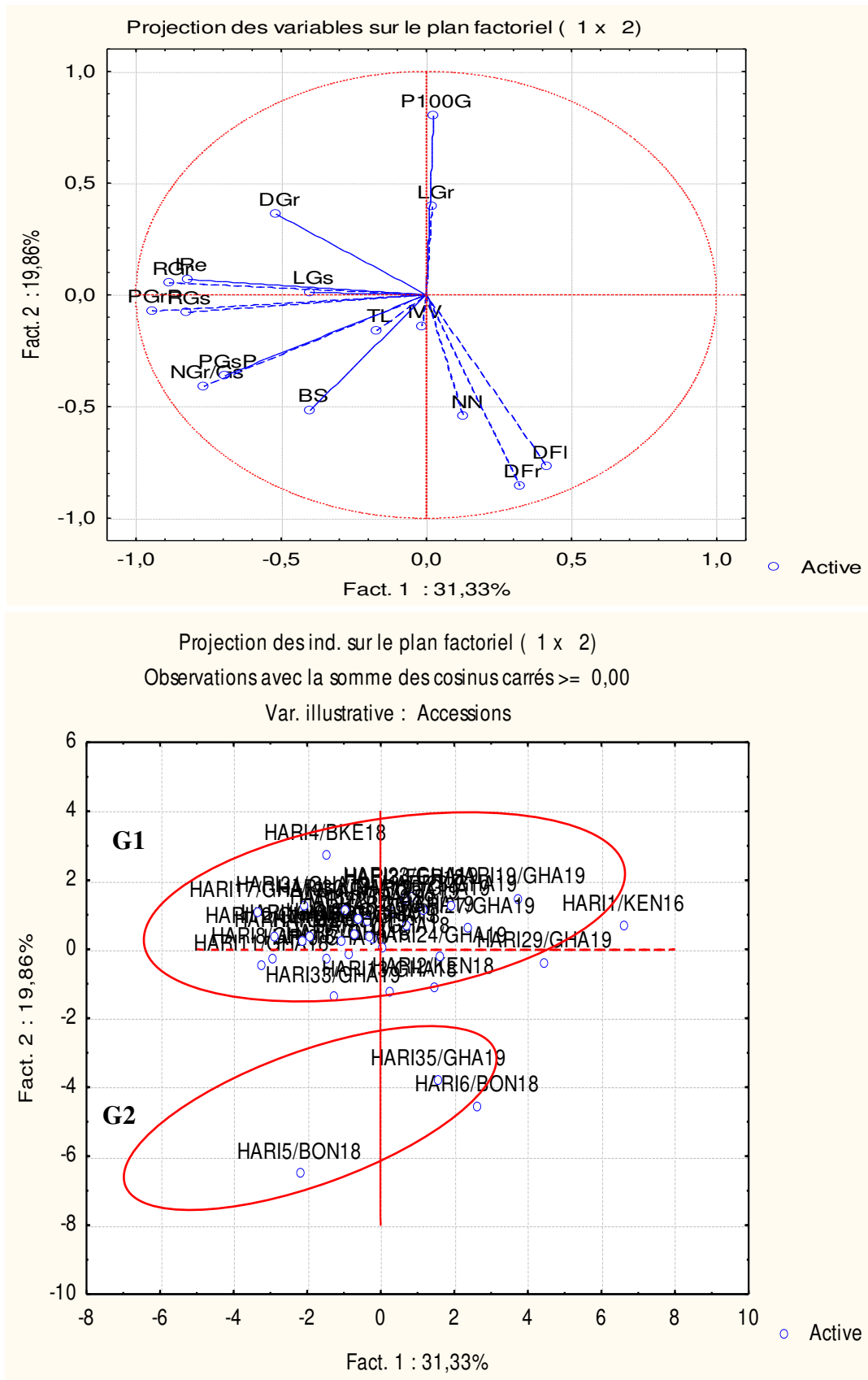


Figure 13 : représentation des individus dans le plan des axes 1-2 de l'ACP

1.2.3. Typologie des accessions de haricot sec

Pour analyser la structuration de la variabilité au sein des accessions, une classification hiérarchique ascendante a été effectuée selon la méthode de Ward (1963). Le dendrogramme obtenu montre une nette séparation des accessions en quatre (04) groupes (Figure 14). Les valeurs moyennes des différents groupes sont résumées dans le tableau XIII. Dix (10) paramètres ont permis de classer les accessions en groupes homogènes. Cependant, aucun de ces paramètres ne permet une distinction complète des groupes d'accessions.

Le groupe 1 (G1) a représenté 54,28 % de l'ensemble des accessions. Il est composé des accessions HARI2/KEN18, HARI3/FER18, HARI7/GHA18, HARI8/GHA18, HARI9/GHA18, HARI10/GHA18, HARI11/GHA18, HARI12/GHA18, HARI13/GHA18, HARI15/GHA1, HARI16/GHA19, HARI17/GHA19, HARI18/GHA18, HARI21/GHA19, HARI26/GHA19, HARI30/GHA19, HARI31/GHA19, HARI33/GHA19 et HARI34/GHA19. La majorité de ces accessions est originaire du Ghana. Les plantes de ce groupe se caractérisent par un petit nombre de nœud (5,57), une biomasse sèche par plant moyen (12,65 g), un nombre élevé de graine par gousse (4,15), de petites gousses (10,38 cm), un poids de gousses par plant faible (18,72 g) et un poids de 100 graines moyen (24,13 g).

Le groupe 2 (G2) quant à lui est constitué de trois (03) accessions (8,57 %) dont deux originaires de la Côte d'Ivoire (HARI5/BON18 et HARI6/BON18) et une (HARI35/GHA19) du Ghana. Les individus de ce groupe ont un nombre de nœud (7,21), une biomasse sèche (14,66 g), un nombre de graine par gousse (4,57) et un poids de gousses par plant (23,4 g) élevés avec des gousses plus longues (10,84 cm) et un poids de 100 graines faible (17,86 g).

Le groupe 3 (G3) est constitué de quatre (04) accessions (11,43 %) dont trois (04) sont originaires du Ghana (HARI14/GHA19, HARI22/GHA19 et HARI28/GHA19) et une de la Côte d'Ivoire (HARI4/BKE18). Les individus de ce groupe se sont caractérisés en moyenne par 6 nœuds par plant, une biomasse sèche de 11,39 g par plant, 4 graines par gousse, une longueur de gousse, un poids de gousses par plant et un poids de 100 graines estimés à 11,57 cm, 21,3 g et 29,27 g respectivement.

Le groupe 4 (G4) est constitué de neuf (09) accessions soit 25,71 % dont 11 accessions originaires du Ghana (HARI19/GHA19, HARI20/GHA19, HARI23/GHA19, HARI24/GHA19, HARI25/GHA19, HARI27/GHA19, HARI29/GHA19 et HARI32/GHA19) et une du Kenya (HARI11/KEN16). Ce groupe est composé des accessions dont le nombre de nœud (5,79) et la biomasse sèche (11,49 g) par plant sont faibles, les gousses sont de petites tailles (10,34 cm) avec un poids de gousses par plant faible (3,49).

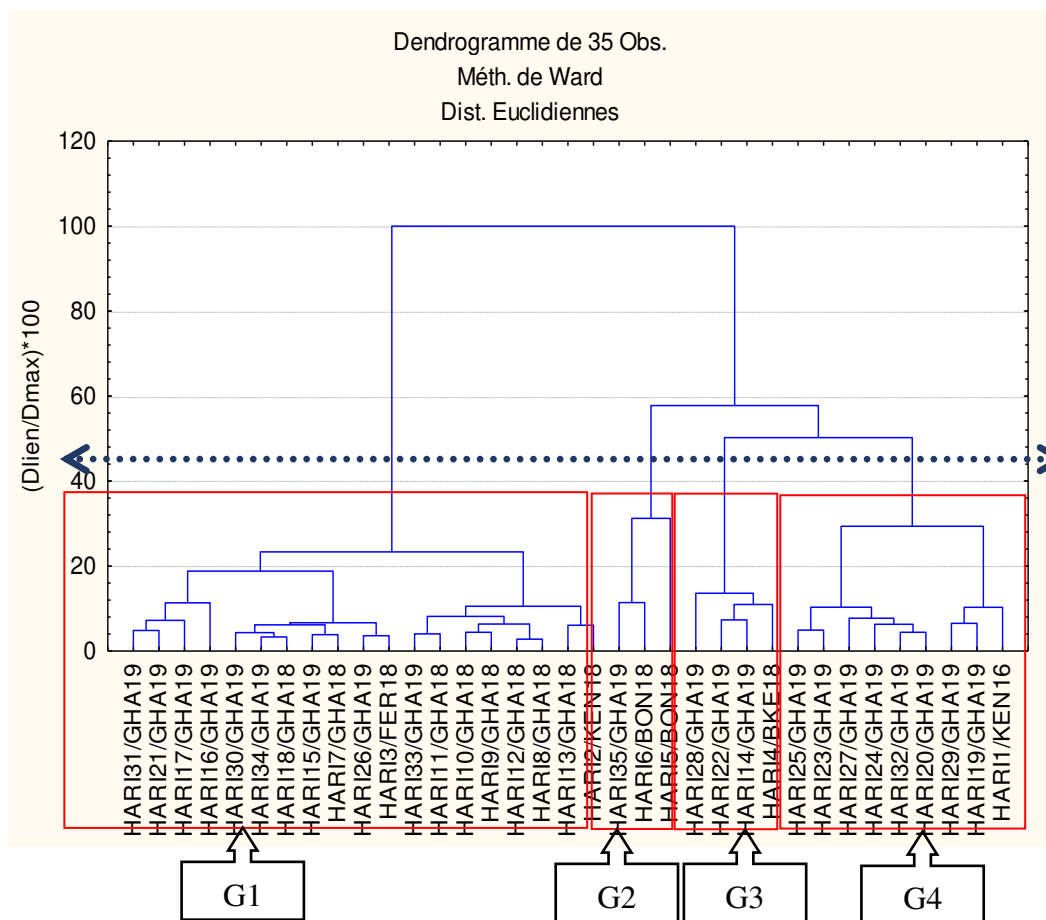


Figure 14 : classification ascendante hiérarchique de 35 accessions de haricot sec

Tableau XIII : caractéristiques principales des différents groupes formés par la CAH

Paramètres	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Probabilité
TL	88,54±1,82a	83,04±8,73b	64,95±2,51c	80,33±3,89b	< 0,001
DFI	32,63±1,59c	42,11±2,81a	32,75±0,4c	34,22±2,19b	< 0,001
DFr	42,02±1,48bc	55,94±0,19a	41,92±0,22c	43,61±2,13b	< 0,001
IVV	0,91±0,13a	1,04±0,22a	1±0,29a	1±0,1a	0,370
NN	5,57±0,65c	7,21±0,53a	6,25±0,33b	5,79±0,51bc	< 0,001
BS	12,65±1,64b	14,66±6,19a	11,39±2,59c	11,49±1,58c	0,015
LGs	10,38±0,6b	10,84±1,42a	11,57±1,49a	10,34±0,59b	0,043
DGr	0,49±0,03a	0,46±0,01a	0,52±0,04a	0,49±0,03a	0,080
LGr	1,03±0,12c	1,05±0,1bc	1,23±0,2a	1,16±0,06ab	0,007
NGr/Gs	4,15±0,33a	4,57±0,58a	4,08±0,1a	3,49±0,68b	0,002
PGsP	18,72±2,56b	23,4±12,02a	21,3±5,23a	17,41±5,51b	0,025
PGrP	10,6±1,71a	9,44±2,81b	10,03±1,71ab	8,44±3,23b	0,160
P100G	24,13±2,96b	17,86±1,98c	29,27±4,41a	27,52±1,32a	< 0,001
RGs	1,61±0,22a	1,46±0,43a	1,45±0,34a	1,45±0,3a	0,410
RGr	1,07±0,15a	0,94±0,25a	1,02±0,16a	0,94±0,29a	0,450
IRe	0,43±0,08a	0,38±0,02a	0,41±0,03a	0,37±0,1a	0,250

Sur chaque ligne, les moyennes affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % (test de Fisher), CV : coefficient de variabilité. TL = taux de levée ; DFI = délais de floraison ; DFr = délai de fructification ; IVV = indice de la vigueur végétative ; NN = nombre de nœuds ; BS = biomasse sèche ; LGs = longueur des gousses ; DGr = diamètre des graines ; LGr = longueur des graines ; NGr/Gs = nombre de graine par gousse ; PGsP = poids de gousse par plant ; PGrP = poids de graine par plant ; RGs = rendement en gousses ; RGr = rendement en graines ; P100G = poids de 100 graines ; IRe = indice de récolte.

2. DISCUSSION

L'analyse des performances agromorphologiques des 35 accessions de haricot sec a mis en évidence une forte variabilité entre ces dernières pour tous les paramètres étudiés. Cette variabilité indique la présence d'une importante hétérogénéité au sein des accessions collectées qui serait due à des facteurs génétiques (transmissibles de génération en génération) et environnementaux tels que la pluviométrie, la température et l'humidité relative. Tigist *et al.*, (2023) ont également reconnu les composantes du génotype et de l'environnement comme les principales sources de variabilité sur les performances agromorphologiques et physiologiques des génotypes de haricot sec éthiopien. De plus, plusieurs études menées sur le vouandzou, le maïs et la tomate ont montré que les facteurs environnementaux entraînent des effets variables sur le développement végétatif et physiologique ainsi que sur le rendement des plantes (Touré *et al.*, 2013 ; N'da *et al.*, 2014 et Coulibaly *et al.*, 2019). Cette étude a aussi montré que les accessions de haricot se sont comportées différemment les unes des autres indépendamment de leur origine géographique. En effet, les accessions les plus et les moins performantes ont été identifiées pour le matériel végétal de même origine. Il en a été de même pour les accessions d'origine différente. Des observations similaires ont été faites par Nkanza *et al.* (2021) sur des variétés de haricot sec introduites au Congo. Ces résultats ont indiqué que les paramètres évalués ne dépendent pas de l'origine des accessions. Dans ce contexte, il semblerait que les gènes qui gouvernent les caractères évalués dans cette étude seraient intrinsèques à chaque accession. Ainsi, ces accessions bien qu'appartenant à l'espèce *Phaseolus vulgaris* L. pourraient provenir de variétés différentes. Le rendement moyen obtenu au cours de cette étude a été relativement faible. Ce résultat serait lié non seulement aux accessions utilisées et aux facteurs environnementaux qui prévalaient dans les zones d'expérimentation mais aussi à la fertilité des sols des sites de cultures.

L'étude des corrélations a permis d'observer des associations significatives entre plusieurs couples de variables. Ainsi, la biomasse sèche a été positivement corrélée au poids de gousses par plant corrélé positivement à son tour au rendement et à ses composantes. Ce résultat indique que le poids de gousse par plant pourrait être un bon indicateur dans la détermination de la biomasse sèche et du rendement car les caractères fortement corrélés seraient sous l'influence des mêmes gènes. Kumar *et al.* (2016) et Yohannes *et al.* (2020) ont rapporté l'association positive du poids de gousses avec la biomasse sèche et le rendement.

Ces auteurs ont estimé qu'une sélection basée sur ce caractère pourrait être utilisée comme critère de sélection indirect pour l'amélioration du rendement en grains et en fanes du haricot.

En outre, ces corrélations permettent à l'agriculteur d'utiliser la même accession pour la production de graines et de fanes sèches (Coulibaly *et al.*, 2020). Aussi, l'existence d'une corrélation significative entre la biomasse sèche et les paramètres du rendement indiquerait-elle qu'une bonne biomasse pourrait induire des rendements élevés. Selon Emishaw *et al.* (2007), cette corrélation serait probablement due à l'augmentation des produits photosynthétiques qui se retrouvent finalement dans les fruits et graines du haricot sec améliorant ainsi leur poids. Par ailleurs, la corrélation entre les stades phénologiques, les paramètres végétatifs et de rendement n'a pas été significative. Cela signifierait que le développement végétatif, la fructification et la production des accessions évaluées ne dépendent pas de la précocité ou de la tardiveté des plants de haricot sec.

L'analyse en composantes principales (ACP) a révélé quatre (04) axes avec une valeur propre supérieure à 1, représentant un total 77,45 % de variabilité. Cependant, environ 50 % de la variation phénotypique ont été expliquées par les deux premiers axes. Les travaux de Marzoughian *et al.* (2013) et Fisseha *et al.* (2015) ont rapportés des résultats similaires sur les caractères agro-morphologiques du haricot sec. L'évaluation agromorphologique des accessions de haricot a mis en évidence l'existence de plusieurs caractères discriminants. En effet, les résultats analytiques dérivés de ces axes ont suggéré la biomasse sèche, le nombre de nœuds, le délai de floraison, le délai de fructification, le diamètre des graines, le nombre de graines par gousse, le poids de gousse par plant, le poids de graine par plant, le poids de 100 graines, les rendements en gousses et en graines et l'indice de récolte comme les principaux caractères qui pourraient être utilisés le plus efficacement pour caractériser les populations de haricot sec. Cela traduit l'existence d'une grande diversité morphologique au sein de la collection étudiée. Des études antérieures ont par ailleurs révélé ces caractères comme principaux contributeurs à la diversité des haricots communs (Yeken *et al.*, 2019 ; Nadeem *et al.*, 2020).

Les classes obtenues à partir des 16 caractères ont permis de déterminer les performances des accessions de haricot sec. Ainsi, la classification hiérarchique (CAH) a généré quatre groupes d'accessions distincts les uns des autres. L'analyse de ces groupes a révélé que les accessions des groupes 2 et 3 (HARI4/BKE18, HARI5/BON18, HARI6/BON18, HARI14/GHA19, HARI22/GHA19, HARI28/GHA19 et HARI35/GHA19) ont été les plus performantes en termes de rendement.

La CAH a aussi révélé que le regroupement des accessions s'est fait indépendamment des origines géographiques. Ces résultats corroborent ceux de Kausnik *et al.* (2007) et Sunil *et al.*

(2010) qui ont indiqué que la diversité géographique ne représente pas nécessairement la diversité génétique entre les accessions. Ce regroupement s'expliquerait par le fait que les individus étudiés pourraient être issus d'un ancêtre commun qui ont gardé les mêmes caractères.

Conclusion partielle

L'analyse des performances agro-morphologiques de 35 accessions de haricot sec a permis de noter la présence d'une diversité entre ces dernières au regard de 16 paramètres phénologiques, végétatifs et rendement. Par ailleurs, la structuration de la diversité agro-morphologique des accessions a identifié la biomasse sèche, le nombre de nœuds, les délais de floraison et de fructification, le diamètre des graines, le nombre de graines par gousse, le poids de gousse par plant, le poids de graines par plant, le poids de 100 graines, les rendements en gousses et en graines puis l'indice de récolte comme les caractères les plus discriminants. Sept (07) accessions prometteuses HARI4/BKE18, HARI5/BON18, HARI6/BON18, HARI14/GHA19, HARI22/GHA19, HARI28/GHA19 et HARI35/GHA19 ont été identifiées sur la base de leurs performances agro-morphologiques et phénologiques.

Les rendements obtenus au cours de cette étude ont été relativement faibles (1,1 t/ha). Ces rendements pourraient être améliorés par l'emploi de bactéries symbiotiques. Ainsi, pour contribuer à l'amélioration de la production du haricot sec en Côte d'Ivoire, une collection de rhizobia locaux nodulant cette plante et adaptée aux conditions environnementales et anthropiques a été constitué et a fait l'objet du chapitre 2.

CHAPITRE 2 : COLLECTION DE RHIZOBIA LOCAUX NODULANT LE HARICOT

Ce chapitre présente les résultats du piégeage, de l'isolement et de la caractérisation phénotypique des rhizobia locaux nodulant le haricot sec.

1. RESULTATS

1.1. Nodulation des accessions de haricot en fonction de l'origine du sol

La présence de bactéries symbiotiques locales (Figure 15) matérialisée par la formation de nodules fonctionnels (de couleur rouge à l'intérieur) sur les racines du haricot a été observée (Figure 16). Ces nodules ont été influencés par l'origine et l'antécédent cultural des sol échantillonnés (Tableau XIV). Tous les plants ont nodulé sur les différents échantillons de sol à l'exception de ceux cultivés sur les sols issus de jachère. En effet, hormis HARI17/GHA19 qui a nodulé sur le sol de Bouaké, aucun nodule n'a été observé sur les plants des sols collectés à Beoumi, Daloa et Korhogo. De même, le nombre de nodules a varié d'un sol à un autre pour la même accession et d'une accession à une autre pour le même sol (Tableau XIV). Sur le sol de Botro, le nombre de nodules a varié de 14 à 72,2 avec une moyenne de 32 respectivement chez les accessions HARI11/GHA18 et HARI17/GHA19. Sur le sol de Djébonoua, l'accession qui a produit le nombre le plus important de nodules est HARI27/GHA19 avec 140 nodules. Sur le sol de Ferkéssédougou par contre, c'est chez l'accession HARI11/GHA18 qu'a été observée le nombre de nodules le plus important (83,3). Le plus petit nombre de nodules (10,3) a été obtenu chez l'accession HARI27/GHA19. Il en est de même dans les sols de Sakassou où le plus faible nombre de nodules (44,7) a été observé chez l'accession HARI27/GHA19 contre 82,3 chez HARI11/GHA18, qui a eu avec le nombre de nodules le plus élevé. En revanche, c'est l'accession HARI17/GHA19 qui a produit le plus de nodules sur le sol de Yamoussoukro. Elle a induit en moyenne 71,7 nodules par plant. Le nombre de nodules le plus important observé chez les plants cultivés sur les sols de Gagnoa était de 33,3 générés par HARI17/GHA19. En ce qui concerne les nombres les plus faibles, ils ont été observés chez HARI11/GHA18 (7,7) et HARI22/GHA19 (10,3). Cependant, sur le sol de Bouaflé, HARI11/GHA18 a donné des nodules. HARI27/GHA19, quant à lui a produit des nodules sur les deux types de sol (Bouaflé et Sinématiali).

Dans l'ensemble, l'accession HARI11/GHA18 a été la plus compatible avec les rhizobia locaux sur les échantillons de sols par rapport aux quatre (04) autres accessions.

L'accession qui a le moins répondu au piégeage a été HARI22/GHA19 avec une moyenne de 10,53 nodules produits contre 34,1 généré par HARI11/GHA18.

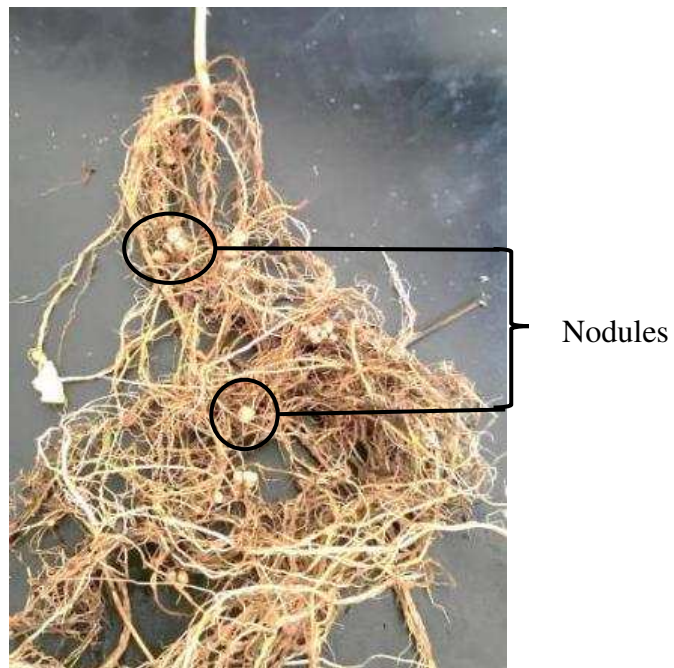


Figure 15 : racines de plantes de haricot présentant des nodules

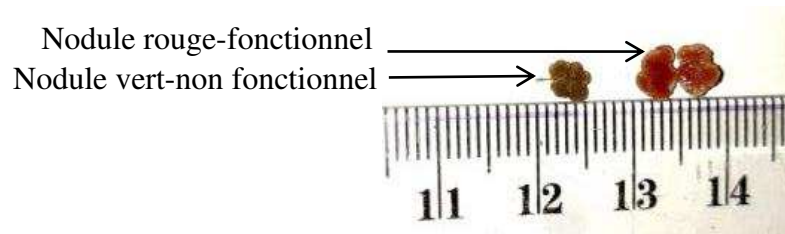


Figure 16 : coupe transversale de nodules de haricot

Tableau XIV : nombre de nodules obtenus en fonction des sols échantillonnés

Localités	Accessions					Moyenne	Probabilité	CV (%)
	HARI11/GHA18	HARI17/GHA19	HARI22/GHA19	HARI27/GHA19	HARI35/GHA19			
Béoumi	00	00	00	00	00	0±0	00	00
Botro	14±4,2b	72,7±24,6a	24±6,2b	20,7±7,9b	29±6,5b	32,1±9,9	0,044	65,1
Bouaflé	183,3±26,4a	0±0b	0±0b	5±2,7b	0±0b	37,7±5	< 0,001	45,2
Bouaké	0±0b	49±10,1a	0±0b	0±0b	0±0b	9,8±2	< 0,001	20,7
Daloa	00	00	00	00	00	0±0	00	00
Djébonoua	11,3±1,6c	47±7,9b	31,7±10,4b	140±26,5a	55±13,2b	57±11,9	< 0,001	27,2
Ferkéssédougou	83,3±3,8a	16,7±15,6b	29,3±11,8b	10,3±1,9b	19,3±5,3b	31,8±7,	0,004	53,1
Gagnoa	7,7±3,3c	33,3±17,6a	10,3±2,5c	21,3±11,5b	22,3±8,7b	19±8,7	0,008	96,3
Korhogo	00	00	00	00	00	0±0	00	00
Sakassou	82,3±8,6a	51,7±4,9ab	0±0ab	44,7±18,5ab	62,3±20,5a	48,2±10,5	0,009	34,2
Sinématiali	0±0a	0±0a	0±0a	2±0,5a	0±0a	0,4±0,1	0,452	25
Yamoussoukro	26,7±4,6b	71,7±23,8a	31,7±7,6b	25,7±6b	26,7±8,8b	36,5±10,2	0,011	33,4
Moyenne	34,1±4	28,5±8,7	10,6±3	22,5±7,2	17,88±5,25			

Sur chaque ligne, les moyennes affectées de la même lettre sont significativement identiques au seuil de 5 % (test de Fisher), CV : coefficient de variabilité.

1.2. Caractéristiques phénotypiques des isolats

1.2.1. Caractéristiques morphologiques et biochimiques des isolats

Des colonies bactériennes ont été obtenues sur milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) après l'isolement des bactéries contenues dans les nodules des différentes accessions (Figure 17). L'observation macroscopique de ces colonies a permis de sélectionner 108 isolats. Ces dernières ont présenté divers aspects morphologiques (Annexe 3). Elles ont été composées de colonies opaques ou transparentes à la lumière, de formes circulaires et bombées ou plates avec des bordures lisses ou en dentelles. Les colonies ont aussi présenté des colorations blanchâtre, crème ou jaunâtre avec des tailles variables comprises entre 1 et 7 mm de diamètre ainsi que des temps de génération compris entre 2 et 3 jours. L'aspect microscopique observé après coloration de Gram, a permis de révéler que la collection d'isolats est composée de bacilles de coloration rose (Gram négatif), (Figure 18).



Figure 17 : colonies bactériennes obtenues après purification des isolats sur milieu YEMA

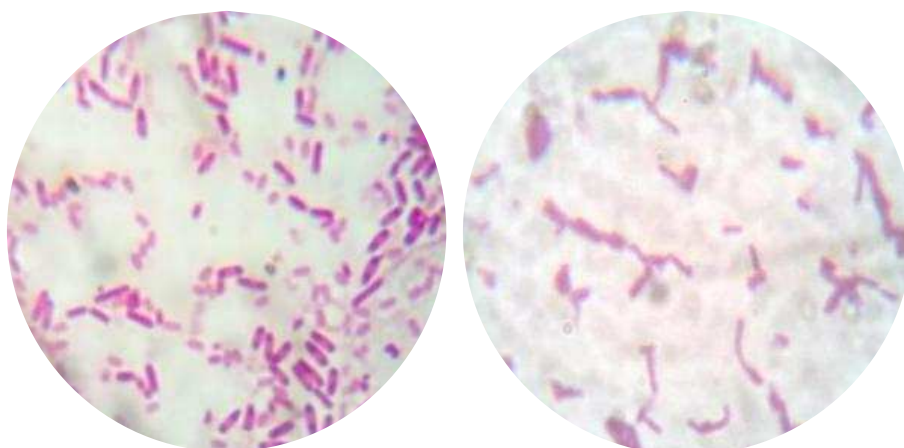


Figure 18 : aspect microscopique des isolats après la coloration de Gram (G×100).

1.2.2. Caractéristiques symbiotiques des isolats bactériens

1.2.2.1. Isolats bactériens authentifiés du haricot sec

La capacité à induire la formation de nodosités sur la racine de la légumineuse hôte est l'un des critères de base dans la caractérisation des rhizobia. Ainsi, celle des 108 isolats a été évaluée et a montré que la totalité des isolats testés a été capable de réinfecter leur plante hôte. De même, l'infectivité bactérienne a été variable car le nombre de nodules formés a évolué en fonction des isolats qui ont induit la formation de 2 à 37 nodules par plant. Aussi, aucun nodule n'a-t-il été observé sur les racines des témoins non inoculés.

A l'issue de ce test, deux groupes d'isolats bien distincts ont été obtenus. Le premier groupe est constitué des isolats les moins infectifs (86 isolats). Ils ont induit la formation d'un nombre de nodules par plant inférieur à 25. Le second groupe quant à lui a regroupé les isolats les plus infectifs. Ils sont au nombre de 22 et ont eu une infectivité supérieure ou égale à 25 nodules par plant (Tableau XV). Ce sont les isolats RPC108, RPC109, RPC114, RPC115, RPC204, RPC208, RPC210, RPC218, RPC304, RPC404, RPC406, RPC408, RPC410, RPC424, RPC426, RPC430, RPC431, RPC504, RPC508, RPC509, RPC516 et RPC517. Toutefois, ce sont les isolats RPC304 (32), RPC108 (33), RPC408 (33), RPC426 (33), RPC431 (33), RPC509 (34) et RPC404 (37) qui ont induit les nombres les plus élevés de nodules avec leurs plantes hôtes.

Tableau XV : nombre de nodules par plant induits par 22 isolats locaux évalués sur quatre accessions de haricot sec

Isolats	Nombre de nodules par plant	Accessions hôtes
RPC108	33	HARI17/GHA19
RPC109	28	HARI17/GHA19
RPC114	31	HARI17/GHA19
RPC115	25	HARI17/GHA19
RPC204	26	HARI11/GHA18
RPC208	29	HARI11/GHA18
RPC210	26	HARI11/GHA18
RPC218	27	HARI11/GHA18
RPC304	32	HARI22/GHA19
RPC404	37	HARI27/GHA19
RPC406	28	HARI27/GHA19
RPC408	33	HARI27/GHA19
RPC410	27	HARI27/GHA19
RPC424	27	HARI27/GHA19
RPC426	33	HARI27/GHA19
RPC430	30	HARI27/GHA19
RPC431	33	HARI27/GHA19
RPC504	30	HARI35/GHA19
RPC508	29	HARI35/GHA19
RPC509	34	HARI35/GHA19
RPC516	26	HARI35/GHA19
RPC517	28	HARI35/GHA19

1.2.2.2. Infectivité symbiotique des isolats

✓ Capacité d'induction de nodosités sur différentes accessions de haricot

La capacité des 22 isolats les plus infectifs à noduler des accessions autres que celles dont ils sont originaires a été évaluée. Ainsi, le nombre de nodules formés a été hautement influencé ($P < 0,01$) par les isolats et les accessions testées. La totalité des isolats a pu induire la formation de nodosités chez d'autres accessions de haricot à l'exception de RPC406 qui n'a réinfecté aucune d'entre elles (Tableau XVI). Aucun nodule n'a également été observé chez les plants issus des témoins négatifs et positifs.

Chez l'accession HARI17/GHA19, ce sont les isolats RPC115, RPC426 et RPC431 qui ont induit la formation du plus grand nombre de nodules par plant avec une valeur de 31. Les isolats les moins infectifs de cette accession ont été RPC204, RPC410, RPC424, RPC430 et RPC517 qui ont donné entre 6,3 et 8,3 nodules par plant.

Au niveau de l'accession HARI11/GHA18 l'isolat le plus infectifs a été RPC516 avec 31,7 nodules. Le plus petit nombre (1) quant à lui a été généré par RPC109.

En ce qui concerne l'accession HARI35/GHA19, le plus grand nombre de nodules formé a été de 37,7 et a été induit par l'isolat RPC404. Ce sont les isolats RPC109 et RPC430 qui ont été les moins infectifs avec cette accession et ont induit la formation de 2 nodules par plant en moyenne.

En somme HARI17/GHA19 a été l'accession la plus réceptive à l'inoculation parmi les trois évaluées avec un nombre moyen de 18,31 nodules obtenus contre 13 nodules chez les deux autres. Chez les isolats, le plus infectif a été RPC516 avec 25,6 nodules induits en moyenne. En revanche, RPC210 s'est révélé être l'isolat le moins infectif avec une production moyenne de 5 nodules par plant.

Tableau XVI : nombre de nodules par plant induits par 22 rhizobia locaux évalués sur trois accessions de haricot sec

Isolats	Nombre de nodules			Moyenne
	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19	
RPC108	13,3±1,5g	1±1,2j	24,3±1,2c	10,5
RPC109	29±1,7abc	15,3±1,2de	2±1lm	17,6
RPC114	25±1,7def	13,3±2,1efg	12±2,6gh	16,8
RPC115	31±1,7a	22±1,7c	4,3±0,6kl	19,1
RPC204	7,7±1,5h	25,3±2,1bc	26,3±1,5c	19,8
RPC208	26±2,6cde	10±4,4gh	20±2,6d	18,7
RPC210	2,7±1,5i	5±2,6i	7,7±1,5ij	5,1
RPC218	27±1bcde	15,7±4,2de	6,3±1,5jk	16,3
RPC304	22,3±1,5f	18±2,6d	13,7±1,5fg	18,0
RPC404	27,7±3,8bcd	10±1,7gh	36,7±1,5a	24,8
RPC406	0±0i	0±0j	0±0m	00
RPC410	7,7±1,5h	18±2,6d	10±2,6hi	11,9
RPC422	27,7±1,5bcd	25,3±1,5bc	16,3±1,5ef	23,1
RPC424	7±2,6h	4,7±1,5i	12,7±1,5gh	8,1
RPC426	31±2,6a	11±1,7fgh	26±2,6c	22,7
RPC430	6,3±1,5h	18±3,6d	2,3±0,6lm	8,9
RPC431	31±1,7a	16,7±2,5de	12,7±1,5gh	20,1
RPC504	30±1ab	14,7±2,5def	13±2g	19,2
RPC508	24±1,7ef	28,7±2,5ab	13,7±1,5fg	22,1
RPC509	27,7±2,3bcd	10±2,6gh	32,7±1,5b	23,4
RPC516	27±2,6bcde	31,7±1,5a	18±2,6de	25,6
RPC517	8,3±1,5h	9±1,7h	12,7±0,6gh	10
T0	0±0i	0±0j	0±0m	00
TN	0±0i	0±0j	0±0m	00
Moyenne	18,31±1,7	13,46±2,2	13,47±1,6	
Probabilité	< 0,001	< 0,001	< 0,001	
CV (%)	63,8	68,34	75,47	

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre sont significativement identiques au seuil de 5 % selon le test de LSD de Fisher ; T0 : témoin non fertilisé et non inoculé ; TN : témoin fertilisé non inoculé, CV : coefficient de variabilité.

✓ Effet des isolats sur le poids sec nodulaire

Le poids sec nodulaire tout comme le nombre de nodules a été influencé significativement ($P < 0,01$) par l'inoculation (Tableau XVII). De plus, l'effet des isolats a varié en fonction des accessions de haricot. Chez HARI17/GHA19, le poids sec des nodules a varié de 0,015 à 0,138 g et a été induit par les isolats RPC118, RPC517 et RPC115. Par contre, chez HARI11/GHA18, il a varié de 0,052 à 0,152 g respectivement chez RPC424 et RPC516. En ce qui concerne la biomasse nodulaire chez l'accession HARI35/GHA19, la plus importante a été de 0,237 g et a été induite par l'isolat RPC404 contre 0,011 ; 0,013 et 0,017 g chez les isolats RPC109, RPC115

et RPC430 respectivement. Aucun poids n'a été obtenu avec les nodules des plants issus des accessions HARI17/GHA19 et HARI11/GHA18 inoculées avec les isolats RPC210 et RPC109 respectivement en raison du faible nombre de nodules observé chez ces derniers.

Tableau XVII : effet des rhizobia locaux sur le poids sec des nodules chez trois accessions de haricot sec

Isolats	Poids sec des nodules (g)			
	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19	Moyenne
RPC108	0,015±0,003hi	0±0c	0,13±0,026de	0,048
RPC109	0,06±0,004cd	0,062±0,03bc	0,011±0,01jk	0,044
RPC114	0,045±0,012def	0,06±0,036bc	0,057±0,021h	0,054
RPC115	0,138±0,003a	0,104±0,028ab	0,017±0,006jk	0,086
RPC204	0,031±0,034fgh	0,108±0,017ab	0,131±0,012d	0,090
RPC208	0,052±0,003de	0,056±0,03bc	0,122±0,007def	0,076
RPC210	0±0i	0,053±0,026bc	0,023±0,007i	0,025
RPC218	0,057±0,005cd	0,073±0,031bc	0,018±0,009j	0,049
RPC304	0,022±0,003gh	0,102±0,026ab	0,101±0,01g	0,075
RPC404	0,059±0,003cd	0,056±0,026bc	0,237±0,01a	0,117
RPC406	-	-	-	-
RPC410	0,047±0,035def	0,073±0,017bc	0,057±0,006h	0,059
RPC422	0,058±0,003cd	0,116±0,026ab	0,107±0,021fg	0,094
RPC424	0,02±0,01gh	0,052±0,03bc	0,061±0,009h	0,044
RPC426	0,073±0,003c	0,059±0,034bc	0,18±0,013c	0,104
RPC430	0,033±0,018efg	0,073±0,031bc	0,013±0,009jk	0,040
RPC431	0,111±0,003b	0,068±0,014bc	0,057±0,008h	0,079
RPC504	0,071±0,003c	0,067±0,025bc	0,07±0,013h	0,069
RPC508	0,05±0,004de	0,111±0,028ab	0,092±0,009g	0,084
RPC509	0,06±0,003cd	0,058±0,007bc	0,203±0,009b	0,107
RPC516	0,056±0,003cd	0,152±0,198a	0,111±0,011efg	0,106
RPC517	0,015±0,003hi	0,055±0,03bc	0,06±0,013h	0,043
T0	-	-	-	-
TN	-	-	-	-
Moyenne	0,04±0,03	0,06±0,05	0,08±0,06	
Probabilité	< 0,001	0,020	< 0,001	
CV (%)	78,50	84,00	85,03	

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre sont significativement identiques au seuil de 5 % selon le test de LSD de Fisher ; T0 : témoin non fertilisé et non inoculé ; TN : témoin fertilisé non inoculé.

1.2.2.3. Effet des isolats sur la biomasse

L'inoculation a aussi influencé significativement ($P < 0,01$) la biomasse sèche des plants quel que soit l'accession de haricot utilisée (Tableau XVIII).

De plus, l'effet de l'inoculation a varié en fonction de l'isolat et l'accession de haricot. La biomasse sèche de toutes les accessions a été améliorée par l'ensemble des isolats testés par rapport au témoin non fertilisé (T0).

Outre cela, tous les isolats ont occasionné des biomasses supérieures à celles produites par le témoin azoté (TN) à l'exception de RPC210 inoculé aux accessions HARI17/GHA19 et HARI11/GHA18. Les isolats RPC426 et RPC431 ont augmenté la production de la biomasse sèche de l'accession HARI17/GHA19 par rapport à l'ensemble des traitements. Ils ont induit une production de 0,75 g de matière sèche contre 0,39 g pour le témoin azoté. Concernant l'accession HARI11/GHA18, la production de biomasse sèche a été améliorée par RPC516. Ainsi, la plus importante biomasse a été de 0,95 g. La biomasse obtenue avec le témoin azoté a été de 0,43 g. L'isolat RPC404 inoculé au niveau de l'accession HARI35/GHA19 a occasionné la production de matière sèche la plus élevée (0,82 g) par rapport à l'ensemble des isolats locaux testés et du témoin azoté. Le témoin azoté quant à lui a augmenté la biomasse de 0,38 g.

Tableau XVIII : matière végétale sèche générée par 21 isolats évalués sur trois accessions de haricot sec

Source d'azote	Biomasse sèche par plant (g)			
	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19	Moyenne
RPC108	0,56±0,05fgh	0,61±0,06efg	0,72±0,03abcd	0,63
RPC109	0,67±0,02abc	0,75±0,26abcde	0,41±0,17efgh	0,61
RPC114	0,6±0,07cdef	0,72±0,11bcde	0,47±0,04cdefgh	0,59
RPC115	0,71±0,1ab	0,8±0,02abcde	0,45±0,23defgh	0,65
RPC204	0,48±0,03ijk	0,83±0,33abcd	0,75±0,22abc	0,69
RPC208	0,62±0,01cdef	0,65±0,01def	0,63±0,06abcdef	0,63
RPC210	0,25±0,02m	0,37±0,11hi	0,5±0,17bcdefgh	0,38
RPC218	0,64±0,02bcdef	0,75±0,26abcde	0,52±0,16bcdefgh	0,64
RPC304	0,58±0,02efgh	0,77±0,12abcde	0,6±0,13abcdefg	0,65
RPC404	0,64±0,01bcde	0,65±0,06cdef	0,82±0,23a	0,7
RPC410	0,52±0,02hij	0,78±0,01abcde	0,49±0,07bcdefgh	0,6
RPC422	0,65±0,01bcde	0,86±0,22abc	0,65±0,13abcdef	0,72
RPC424	0,45±0,02jkl	0,48±0,01fgh	0,43±0,07efgh	0,45
RPC426	0,75±0,03a	0,72±0,14bcde	0,73±0,4abcd	0,73
RPC430	0,43±0,03kl	0,79±0,01abcde	0,53±0,16bcdefgh	0,58
RPC431	0,75±0,1a	0,77±0,01abcde	0,56±0,11abcdefgh	0,69
RPC504	0,7±0,09ab	0,74±0,21abcde	0,58±0,24abcdefg	0,67
RPC508	0,58±0,1defgh	0,88±0,01ab	0,62±0,24abcdef	0,69
RPC509	0,66±0,01bcd	0,71±0,07bcde	0,77±0,08ab	0,71
RPC516	0,64±0,01bcde	0,95±0,01a	0,68±0,02abcde	0,76
RPC517	0,55±0,03ghi	0,62±0,01defg	0,46±0,23defgh	0,54
T0	0,29±0,04m	0,26±0,02i	0,32±0,03h	0,29
TN	0,39±0,01l	0,43±0,01ghi	0,38±0,16fgh	0,4
Moyenne	0,56±0,14	0,67±0,21	0,56±0,20	
Probabilité	< 0,001	< 0,001	0,010	
CV (%)	25	31,3	35,71	

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre sont significativement identiques au seuil de 5 % selon le test de LSD de Fisher ; T0 : témoin non fertilisé et non inoculé ; TN : témoin fertilisé non inoculé.

1.2.2.4. Efficacité symbiotique

L'évaluation de l'efficacité symbiotique a permis de montrer que la quasi-totalité des isolats testés a induit le gain en matière sèche des accessions comparativement au témoin azoté (Figure 19). En effet, à l'exception de RPC210, l'ensemble des isolats a induit un gain en matière sèche supérieur à celui produit par le témoin azoté sur les accessions évaluées.

Les isolats RPC426 et RPC431 ont augmenté de 192,3 % la biomasse sèche totale des plants de l'accession HARI17/GHA19. Chez l'accession HARI11/GHA18 par contre, le gain de biomasse le plus élevé a été obtenu avec les isolats RPC422, RPC508 et RPC516

respectivement avec 220,9 ; 204,7 et 200,9 %. En ce qui concerne l'accession HARI35/GHA19, les gains les plus élevés ont été de 202,6 et 215,8 %. Ils ont été induits par RPC509 et RPC404 respectivement.

Les isolats RPC108, RPC109, RPC114, RPC115, RPC204, RPC208, RPC218, RPC304, RPC404, RPC410, RPC422, RPC424, RPC426, RPC430, RPC431, RPC504, RPC508, RPC509, RPC516 et RPC517 ayant le mieux amélioré la production de biomasse végétale en condition contrôlée ont été retenus pour l'évaluation de leur efficacité au champ.

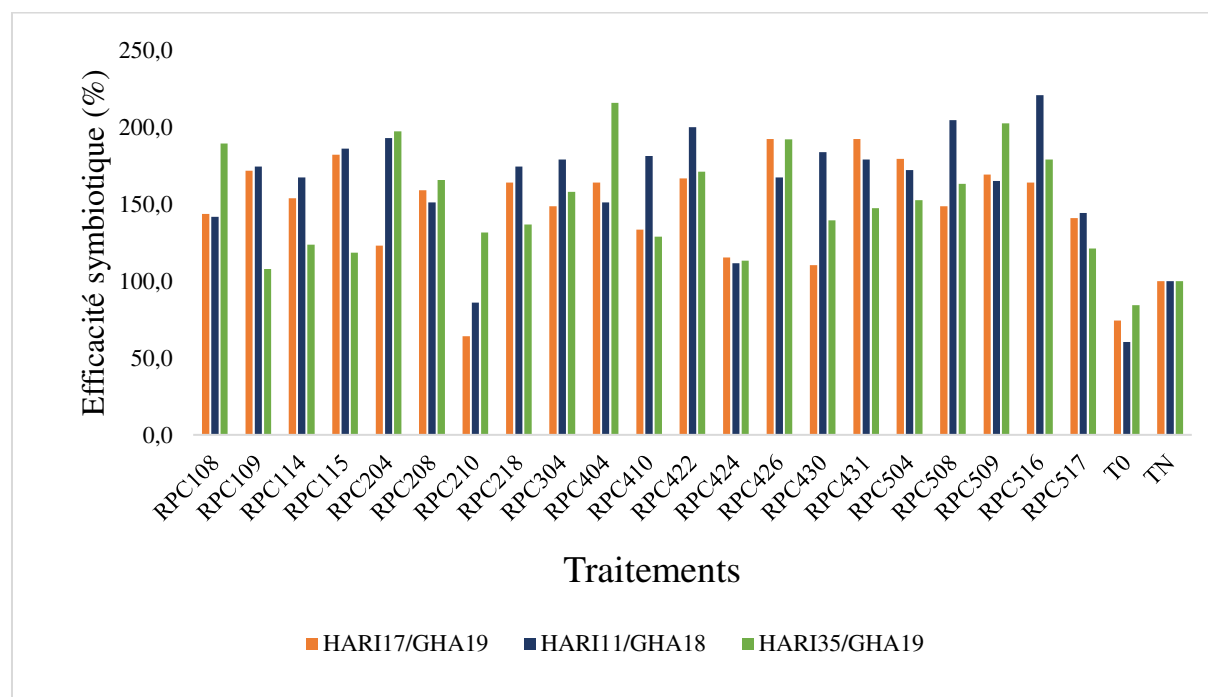


Figure 19 : efficacité symbiotique des isolats testés sur différentes accessions de haricot

1.2.2.5. Corrélation entre la biomasse sèche totale et le nombre de nodules

Les corrélations entre la biomasse sèche totale et le nombre de nodules ont été présentées à la figure 20. Ces corrélations ont montré que le nombre de nodules a influencé positivement la biomasse végétale sèche de l'ensemble des accessions testées au cours de leur croissance.

En effet, les corrélations entre la biomasse sèche totale et le nombre de nodules ont été fortes chez toutes les accessions. Les coefficients ont été de 0,92 chez HARI17/GHA19 ; 0,9 chez HARI11/GHA18 et 0,94 chez HARI35/GHA19.

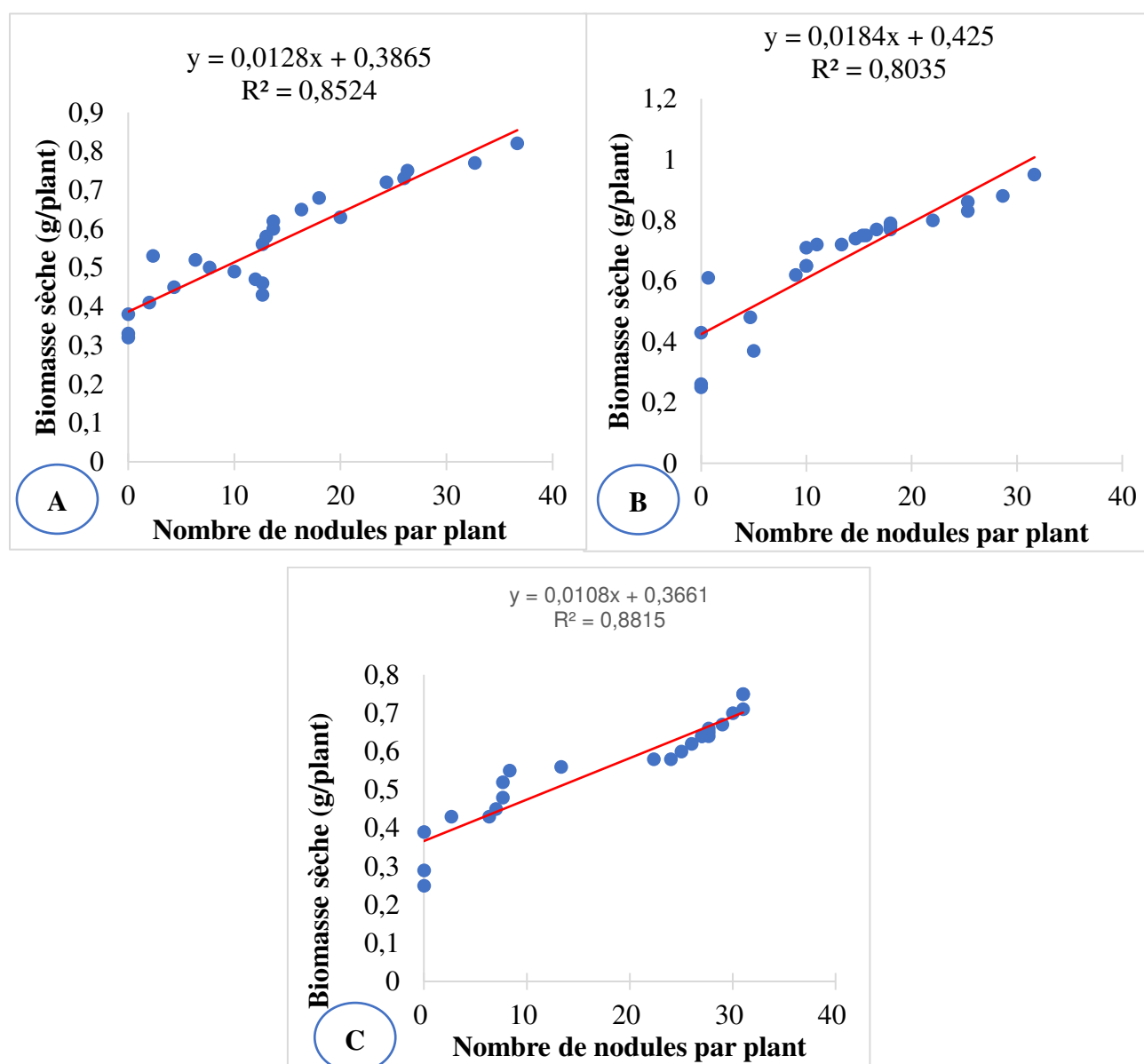


Figure 20 : corrélations entre le nombre de nodules et la biomasse sèche chez trois accessions de haricot sec

A : HARI17/GHA19 ; B : HARI11/GHA18 et C : HARI35/GHA19

1.2.3. Caractéristiques physiologiques des isolats

1.2.3.1. Effet du stress acido-basique sur la survie des rhizobia

La survie des bactéries a été fonction des valeurs de pH auxquelles elles ont été soumises (Tableau XIX). L'ensemble des bactéries (100 %) a pu croître à des pH alcalins (pH = 9) et neutres (pH = 7).

Ce pourcentage a baissé à 45 % lorsque les bactéries ont été confrontées à des milieux à pH acide (pH = 5) et à 25 % pour les milieux à pH plus alcalin (pH = 11). Cependant, aucune bactérie n'a pu croître à pH très acide (pH = 3). Les bactéries qui ont supporté les pH acides

dans cette étude sont RPC108, RPC204, RPC218, RPC304, RPC410, RPC424, RPC426, RPC431 et RPC508 (Tableau XIX). Les bactéries RPC204, RPC404, RPC406, RPC408, RPC430 et RPC504 sont celles qui ont pu croître en milieu très alcalins. RPC204 est le seul isolat à avoir présenté un spectre large pour le pH car il a pu croître aux pH compris entre 5 et 11.

Tableau XIX : effet du pH sur la croissance des isolats locaux du haricot sec.

Isolats	pH				
	3	5	7	9	11
RPC108	-	3+	3+	2+	-
RPC109	-	-	3+	3+	-
RPC114	-	-	3+	3+	-
RPC115	-	-	3+	3+	-
RPC204	-	3+	3+	3+	2+
RPC208	-	-	3+	3+	-
RPC218	-	3+	3+	3+	-
RPC304	-	3+	3+	3+	-
RPC404	-	-	3+	3+	2+
RPC408	-	-	3+	3+	2+
RPC410	-	3+	3+	3+	-
RPC424	-	1+	3+	3+	-
RPC426	-	3+	3+	3+	-
RPC430	-	-	3+	3+	1+
RPC431	-	3+	3+	3+	-
RPC504	-	-	3+	3+	1+
RPC508	-	1+	3+	3+	-
RPC509	-	-	3+	3+	-
RPC516	-	-	3+	3+	-
RPC517	-	-	3+	3+	-
Taux d'isolats tolérants (%)	0	45	100	100	25

- : aucune croissance ; 1+ : faible croissance ; 2+ : croissance moyenne ; 3+ : bonne croissance

1.2.3.2. Effet de la salinité sur la croissance des rhizobia

✓ Chlorure de sodium

L'évaluation de la survie des bactéries *vis-à-vis* du chlorure de sodium (NaCl) *in vitro* a montré que le sel a influencé la croissance des rhizobia (Tableau XX).

Le sel a eu un effet délétère sur la croissance des isolats car seulement cinq (05) isolats, soit 25 % ont pu croître à la plus petite concentration de NaCl. Ce sont : RPC108, RPC109, RPC424, RPC431 et RPC516. L'impact du sel sur les isolats a varié en fonction de la concentration utilisée. En effet, la plupart des isolats ont montré une croissance proportionnellement inverse

à l'augmentation de la concentration de sel du milieu. Ainsi, la tolérance des isolats bactériens est passée de 25 % dans les milieux de culture à 1 % de NaCl à 5 % lorsqu'ils ont été soumis à des concentrations de sel plus élevées (9 %). RPC108 a été l'isolat le plus halotolérant car il a pu croître jusqu'à 9 % de NaCl puis sa croissance a été inhibée à 10 % (Tableau XX).

Tableau XX : effet du chlorure de sodium sur la croissance des isolats locaux du haricot

Isolats	Concentration en NaCl (%)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RPC108	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	-
RPC109	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	1+	-	-
RPC114	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC115	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC204	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC208	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC218	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC304	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC404	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC410	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC424	3+	3+	3+	2+	1+	1+	-	-	-	-	-
RPC426	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC430	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC431	3+	3+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-
RPC504	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC508	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC509	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC516	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+		-	-	-
RPC517	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taux d'isolats tolérants (%)	100	25	25	25	20	20	15	10	10	5	0

✓ - : aucune croissance ; 1+ : faible croissance ; 2+ : croissance moyenne ; 3+ : bonne croissance

✓ Chlorure de potassium

Le test d'évaluation de la tolérance des bactéries sur milieu YEMA additionné de chlorure de potassium (KCl) à différente concentration a montré que ce sel a influencé la survie des rhizobia locaux (Tableau XXI).

En effet, l'addition du sel dans le milieu a fortement inhibée la croissance des isolats. Seulement 15 % des isolats a pu croître à la plus petite concentration. Ce sont les isolats RPC204, RPC404 et RPC408 (Tableau XXI). Cette valeur est restée constante jusqu'à 8 % de sel où seule la présence des isolats RPC204 et RPC405 a été observée sur la surface du gel. Ces isolats ont cru jusqu'à 10 % de KCl.

Tableau XXI : effet du chlorure de potassium sur la croissance des isolats

Isolats	Concentration en KCl (%)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RPC108	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC109	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC114	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC115	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC204	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	1+
RPC208	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC218	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC304	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC404	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+
RPC408	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	-	-	-
RPC410	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC424	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC426	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC430	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC431	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC504	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC508	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC509	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC516	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC517	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taux d'isolats tolérants (%)	100	15	15	15	15	15	15	15	10	10	10

- : aucune croissance ; 1+ : faible croissance ; 2+ : croissance moyenne ; 3+ : bonne croissance

1.2.3.3. Effet des pesticides sur la croissance des bactéries nodulant le haricot

Ce test a démontré que la sensibilité des rhizobia a été fonction de la nature du pesticide et de la dose d'application (Figure 21).

Le fongicide à l'oxychlorure de cuivre a été très toxique pour la quasi-totalité des isolats. En effet, la croissance de 95 % des isolats a été inhibée par ce fongicide indépendamment de la dose d'application (Tableau XXII).

Au niveau des herbicides, 40 % des isolats bactériens mis en culture sur le milieu YEMA additionné de glyphosate ont pu croître lorsque le milieu de culture contenait la moitié de la dose de référence. Ce taux de survie des isolats a chuté à 25 % lorsque le milieu de culture a

été additionné de la dose de référence de cet herbicide. La tolérance des isolats a été stationnaire à 80 et 35 % indépendamment de la dose d'application pour les milieux comportant du 2,4-D sel d'amine et de l'haloxyfop-R-méthyle (respectivement).

Les insecticides à base d'Acétamipride+indoxocarbe et spirotetramate+flubendiamide ajoutés au milieu YEMA ont eu des niveaux de toxicité variables *vis-à-vis* des isolats testés. Le spirotetramate+flubendiamide a été le moins toxique des deux (02) insecticides et a inhibé la croissance de seulement 15 % des isolats quel que soit la dose d'application. En revanche, l'acétamipride+indoxocarbe a été plus toxique pour les isolats. Seuls 25 % des isolats bactériens ont toléré la dose expérimentale. Ce taux a régressé avec la dose de référence et est passé de 25 % à 15 %.

L'isolat RPC408 a été très sensible à ces pesticides car il n'a toléré la présence d'aucun d'entre eux dans les milieux de culture. En revanche, RPC430 a toléré la quasi-totalité des pesticides à l'exception de l'acétamipride+indoxocarbe.

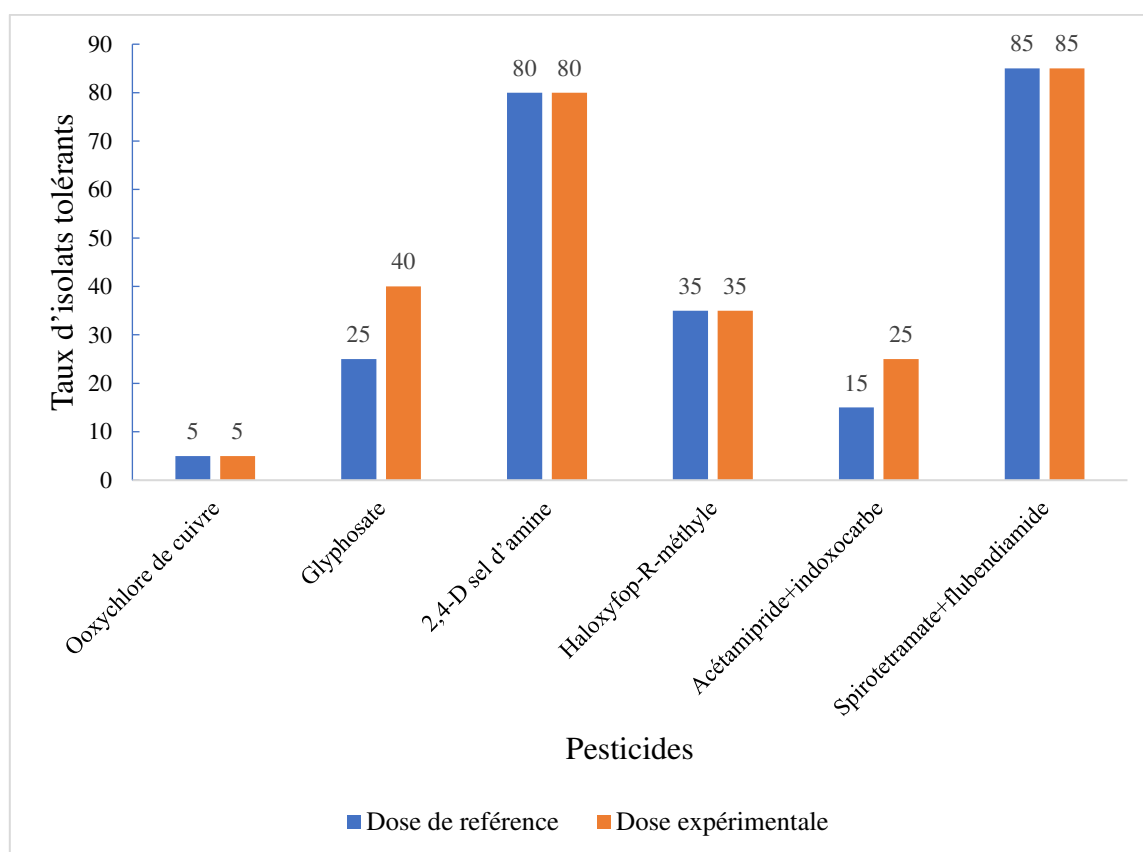


Figure 21 : taux d'isolats tolérants aux pesticides

Tableau XXII : impact des pesticides sur la croissance des isolats

Isolats	Témoin	Oxychl. Cuivre		Glyph.		Halox.		2,4-D.		Spiro+flub		Acéta.,indox.	
		DR	DD	DR	DD	DR	DD	DR	DD	DR	DD	DR	DD
RPC108	3+	-	-	3+	3+	3+	2+	3+	3+	-	-	3+	3+
RPC109	3+	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	-	-
RPC114	3+	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	-	-
RPC115	3+	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	-	-
RPC204	3+	-	-	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	-	3+
RPC208	3+	-	-	1+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	-	-
RPC218	3+	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	-	-
RPC304	3+	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	-	-
RPC405	3+	-	-	-	3+	2+	3+	-	-	3+	3+	-	3+
RPC408	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPC410	3+	-	-	-	-	3+	3+	-	-	3+	3+	-	-
RPC424	3+	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	-	-
RPC426	3+	-	-	2+	3+	2+	3+	-	-	-	-	3+	3+
RPC430	3+	1+	2+	3+	3+	1+	2+	3+	3+	3+	3+	-	-
RPC431	3+	-	-	-	2+	-	-	3+	3+	3+	3+	-	3+
RPC504	3+	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	2+	-
RPC508	3+	-	-	-	3+	-	-	3+	3+	3+	3+	-	-
RPC509	3+	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	-	-
RPC516	3+	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	-	-
RPC517	3+	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	-	-

- : aucune croissance ; 1+ : faible croissance ; 2+ : croissance moyenne ; 3+ : bonne croissance

DR : dose de référence, DE : dose expérimentale ; Oxychl. Cuivre : oxychlorure de cuivre ; Glyph. : Glyphosate ;

Halox. : Haloxyfop-R-méthyle ; 2,4-D. : 2,4-D sel d'amine ; Spiro+flub : spirotetramate+flubendiamide ;

Acéta.,indox. : Acétamipride+indoxocarbe

2. DISCUSSION

L'objet de cette étude a été de constituer une collection de rhizobia locaux nodulant le haricot sec adapté aux conditions environnementales. Pour ce faire, un test de piégeage des rhizobactéries a été effectué sur des sols de diverses localités, suivi de l'étude de la diversité phénotypique des bactéries abritées par les nodules du haricot sec. Ce test a permis de notifier la présence de rhizobiums nodulant le haricot sec dans les sols échantillonnés sans antécédent de culture de haricot ni d'inoculation. Cette observation démontre la présence des rhizobia symbiotes du haricot dans certains sols de Côte d'Ivoire en particulier et de l'Afrique en générale. La présence des rhizobia du haricot dans les sols africains a également été démontré par Kawaka *et al.* (2014) au Kenya. La propriété des légumineuses de pouvoir recruter à partir du pool rhizobien local des souches capables de les noduler leur permet de se développer convenablement (Leary *et al.*, 2006). Ainsi, la promiscuité symbiotique de ces légumineuses leur confère un avantage adaptatif qui serait en grande partie responsable de leur caractère invasif (Susana *et al.*, 2007).

L'étude de la capacité de nodulation a permis de noter que les nodules sont dans l'ensemble de couleur rouge. Cette couleur est la signalétique de la présence de l'égghémoblobine ; une protéine essentielle pour le processus de fixation de l'azote. Les nodules présentant cette couleur sont connus pour contenir et exprimer activement les gènes *nifH* qui codent pour la synthèse des enzymes nitrogénases responsables de la réduction de l'azote atmosphérique (Farid & Navabi, 2015).

Il y a eu une variabilité dans les réponses des plantes sur les différents sols testés. En effet, le nombre de nodules a différé d'un sol à un autre pour une même accession et d'une accession à une autre sur un même sol. La différence de nodulation observée pourrait s'expliquer par la densité de la population rhizobienne vivant dans les différents sols. Plus un sol est riche en rhizobia, plus ces derniers pourront initier la symbiose donc la formation de nodules. Une autre raison pouvant expliquer cette différence est la compatibilité des rhizobia vivant dans le sol *vis-à-vis* des plants. En d'autres termes, une importante compatibilité entre le rhizobium et la plante engendre une nodulation élevée.

Les plants issus des sols en jachère des localités de Béoumi, Daloa et Korhogo ont été exemptes de nodules. Cette absence de nodulation pourrait révéler le fait que les sols en jachères sont des sols dont la fertilité (carbonée, azotée...) est en voie de restauration. Selon Voisin *et al.* (2015), la présence du nitrate dans la solution du sol inhibe la fixation symbiotique.

En effet, la fixation symbiotique est un processus biologique régulé par la plante car énergétiquement très coûteux pour celle-ci.

De ce fait, la légumineuse prélève d'abord l'azote minéral disponible dans le sol puis initie la fixation symbiotique quand cet élément se raréfie. Par ailleurs, l'absence de nodulation sur ces sols pourrait aussi être due à des facteurs biotiques et abiotiques tels qu'une faible disponibilité de phosphore, la salinité du sol ou une carence en micronutriments ainsi que la compétition des souches de rhizobium et/ou la prédation des rhizobiums par les protozoaires ou les phages. Ces facteurs sus-cités pourraient avoir eu une incidence sur la nodulation des plants cultivés sur les sols de Béoumi, Daloa et Korhogo.

Seules HARI11/GHA18 et HARI27/GHA19 ont nodulé sur le sol de Bouaflé. Sur les sols de Bouaké et de Sinématiali, ce sont respectivement HARI17/GHA19 et HARI27/GHA19 qui ont produit des nodules. Ce fait serait dû à la spécificité de la légumineuse qui est l'une des caractéristiques principales de la symbiose rhizobium-légumineuse. En effet, une légumineuse donnée ne peut être compatible qu'avec un type de rhizobium bien précis. Cette spécificité est généralement dépendante de la composition des exsudats racinaires de la plante, ainsi que de la nature de déterminants moléculaires sécrétés par les rhizobia appelés facteurs Nods (Gunnabo *et al.*, 2019 ; Chakraborty *et al.*, 2022). Cette raison pourrait également expliquer la différence de nodulation observée chez les différentes accessions sur le même sol.

L'isolement des bactéries symbiotiques a permis l'obtention de 108 isolats bactériens. Lors de leur caractérisation morphologique, ces bactéries ont présenté sur le milieu YEM, des colonies de forme opaque, circulaire ou transparente et bombée. Elles avaient dans l'ensemble, une coloration blanchâtre, crème ou jaunâtre. L'analyse microscopique a révélé que tous les isolats sont des bacilles à Gram négatif. La croissance des bactéries sur milieu dépourvu d'azote montre que ces isolats sont autotrophes *vis-à-vis* de l'azote. De plus, les caractéristiques morphologiques des isolats de la présente étude révèlent qu'ils appartiennent aux rhizobia. En effet, des caractéristiques similaires ont été observées par plusieurs auteurs sur les rhizobia isolés de la même plante à travers le monde (Kawaka *et al.*, 2014 ; Muthini *et al.*, 2014 ; Koskey *et al.*, 2018). Ainsi, les observations de cette étude confirment les traits caractéristiques des rhizobia tels que décrits par Vincent (1970). Les colonies bactériennes obtenues ont également présenté des aspects gommeux signe d'une production d'exopolysaccharides (EPS). Kartnik *et al.*, (2017) ont identifié l'EPS comme une caractéristique adaptative fournissant aux bactéries une protection contre des facteurs environnementaux tels que : la température, la salinité et les fluctuations du pH dans le sol.

Les isolats obtenus ont été visibles à l'œil nu après deux à trois jours d'incubation. Ces bactéries pourraient appartenir à la catégorie de celles à croissance rapide.

Des études antérieures ont montré que le haricot nodule principalement avec des rhizobiums à croissance rapide regroupés sous *R. gallicum* et *R. giardini* (Amarger *et al.*, 1997), *R. leguminosarum biovar phaseoli*, (Jordan, 1984), *R. tropici* (Martinez-Romero *et al.*, 1991) et *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993).

Bien que les isolats aient présenté sur le plan morphologique les attributs des rhizobia, ils ne peuvent être considérés comme tels que s'ils sont capables d'infecter leur légumineuse d'origine ou toute autre légumineuse (Remigi *et al.*, 2016). Ainsi, l'évaluation de l'infectivité a montré que les 108 isolats de la collection ont été capables de réinfecter leur accession d'origine. Ces derniers ont alors été authentifiés comme des rhizobia locaux nodulant le haricot. Argaw (2007) et Muindi *et al.* (2021) ont utilisé ce test comme référence dans la caractérisation des rhizobia isolés du haricot au Kenya et en Ethiopie respectivement. L'observation de la couleur rose à l'intérieur des nodules, s'expliquerait par la présence de la leghémoglobine, hémoprotéine fixatrice de dioxygène nécessaire pour la fixation d'azote. En revanche, aucun nodule n'a été observé sur les plantes non-inoculées sur le substrat stérile. L'absence de nodulation des plants non inoculés démontre que les conditions d'asepsie ont été remplies dans la mise en place expérimentale et l'entretien des plantes (Bala *et al.*, 2013). Aussi est-il important de signaler que les isolats authentiques du haricot ont différés en fonction de leur capacité à induire la nodulation chez l'accession de haricot hôte. En effet, les nodules dénombrés par plant dans cette étude ont oscillé entre 2 et 37. Cette variation de l'infectivité des isolats serait parfois due à la densité des bactéries contenues dans les inocula ou plutôt à des facteurs environnementaux (Habtegebrial & Singh, 2006).

Vingt-deux isolats ont été présélectionnés sur la base de leur infectivité. Ces bactéries ont induit la formation d'un nombre de nodules supérieur ou égale à 25. Ce sont les isolats RPC108, RPC109, RPC114, RPC115, RPC204, RPC208, RPC210, RPC218, RPC304, RPC404, RPC406, RPC408, RPC410, RPC424, RPC426, RPC430, RPC431, RPC504, RPC508, RPC509, RPC516 et RPC517. La reconnaissance de la performance d'une bactérie débute par sa capacité à noduler plusieurs accessions et de fixer efficacement l'azote atmosphérique. En effet, l'infectivité est une caractéristique très recherchée et place les isolats comme meilleurs candidats pour leur usage comme biofertilisants du haricot. Ainsi, la vérification du spectre d'hôtes des isolats a montré que 95 % de ces derniers ont été plus infectants et plus efficaces. Le spectre d'hôte des bactéries de cette étude a été à l'image de celui des 10 souches de Ensifer

isolées de *Melilotus indicus* et qui ont été capable de noduler *Medicago ciliaris* par Baba-Arbi (2016). L'isolat RPC406 quant à lui a présenté un spectre d'hôte très étroit car il n'a induit la formation de nodule chez aucune autre accession de haricot.

Dans l'ensemble, une variation considérable de nodulation a été observée dans la réponse de chaque accession. En effet, l'accession HARI17/GHA19 a induit plus de nodosités par rapport aux accessions HARI11/GHA18 et HARI35/GHA19. La spécificité des facteurs génétiques entre la plante et le symbionte serait la raison qui pourrait expliquer la variabilité de nodulation observée. Selon Gunnabo *et al.* (2019), cette spécificité est la résultante de l'interaction entre le gène Sym2 de la plante et le gène nodX de l'espèce rhizobiale. Koskey *et al.* (2018) ont fait des observations similaires sur deux cultivars de haricot grimpant (MAC 13 et MAC 64) cultivés dans des conditions contrôlées en serre au Kenya. Le nombre élevé de nodules enregistrés par HARI17/GHA19 refléterait également une fixation symbiotique plus efficace de l'azote chez cette accession.

L'inoculation a aussi influencé le poids sec des nodules car leur matière sèche a varié de 0,011 à 0,237 g/plant. Des observations similaires ont été faites par Amani *et al.* (2020) en Côte d'Ivoire sur des cultivars de soja inoculés avec 16 rhizobia locaux.

A l'instar du poids sec nodulaire, les analyses de biomasse sèche ont révélé que l'inoculation des rhizobia a influencé le poids sec des plants. Elle a aussi augmenté la biomasse sèche des plants. En effet, la quasi-totalité des plantes inoculées a enregistré une biomasse sèche significativement supérieure à celle des plantes non inoculées. Ce résultat est en accord avec l'observation d'Argaw (2007) qui a révélé que l'inoculation de rhizobia isolés du haricot sec a amélioré le poids sec des pousses et la nodulation des plantes en Afrique du Sud. Les avantages pouvant être obtenus grâce à l'inoculation des rhizobia locaux ont été également révélés par Mhamdi *et al.* (1999). Ces avantages sont entre autres, l'amélioration de la biomasse et du rendement.

Quant à l'efficacité symbiotique (ES), elle a différencié significativement parmi les isolats testés en serre. L'ES a varié de 64,1 % à 220,9 %. Muindi *et al.* (2021) ont mené une étude similaire au Kenya sur neuf isolats de rhizobia locaux provenant de nodules de haricots communs et l'ES rapporté des isolats variait de 12,85 % à 82,49 %. Sur la base de l'échelle d'évaluation utilisée par Lalande *et al.* (1990), il ressort de cette étude que les isolats locaux étaient très efficaces (ES > 80 %) dans la fixation symbiotique de l'azote. Ces résultats montrent que ces isolats ont amélioré la fixation de l'azote, ce qui a par conséquent augmenté le poids sec des biomasses. Ils révèlent l'existence d'isolats de rhizobia locaux efficaces en Côte d'Ivoire.

Il a été noté que la capacité de nodulation (infectiosité) et la réponse à la matière sèche végétale (efficacité) des isolats inoculés ont été variables. Cette variabilité dans la réponse des isolats démontre également la plasticité des rhizobia dans leur capacité à fixer l'azote. Cette idée soutient l'étude réalisée par Muthini *et al.* (2014) qui a démontré qu'il existe une disparité dans l'efficacité symbiotique entre les souches de rhizobium locaux liées à des espèces hôtes particulières. Selon Karaca & Uyanöz (2012), l'efficacité des symbioses fixatrices d'azote peut varier de celles qui fixent peu ou pas l'azote à celles qui fixent à des niveaux équivalents, voire supérieurs à ceux des plantes fournies en azote minéral.

Une caractérisation physiologique des rhizobia a été effectuée afin d'évaluer la diversité existant entre ces derniers. Les résultats de ce test ont montré une variabilité de la sensibilité des isolats aux différents pH. La majorité des bactéries symbiotiques étudiées a toléré beaucoup plus les pH basiques que les pH acides. En effet, 100 % des isolats ont pu croître dans la plage de pH comprise entre 7 et 9. La tolérance des isolats aux pH basiques confirme les résultats de Saoussen *et al.*, (2022) obtenu avec les rhizobia isolés du haricot sec en Tunisie qui ont toléré des pH alcalins allant de 8 à 9. Contrairement à ces derniers, Zablotowicz & Focht (1981) ont isolés de *Vigna unguiculata* des bradyrhizobia, bactéries à croissance lente qui tolèrent moins les pH alcalins. Selon les études menées par Van Rossum *et al.*, (1994) les rhizobiums à croissance lentes sont plus sensibles à l'alcalinité ce qui n'est pas le cas des isolats évalués dans cette étude qui ont démontré des taux de croissance rapide, d'où leur tolérance à l'alcalinité. La tolérance des bactéries à cette gamme de pH pourrait aussi être liée aux pH des différents sites sur lesquels ces bactéries ont été piégées. Pour Cheriet (2016), la tolérance des souches à une certaine gamme de pH serait plutôt en rapport avec le pH du site d'où elles auraient été isolées. Il existe peu d'information sur le mécanisme d'adaptation des rhizobia aux pH acide ou alcalin. Toutefois, selon Graham *et al.* (1994), la tolérance des isolats aux pH acides pourrait être liée à la structure et à la composition de la membrane externe du rhizobium.

La salinité est l'un des stress environnementaux les plus importants et limitants pour la croissance des rhizobia (da-Silva *et al.*, 2017 ; Sun *et al.*, 2021). La détermination de la tolérance à la salinité devrait donc faire partie des procédures de présélection lors de l'isolement des rhizobia à des fins de commercialisation. Ainsi, l'évaluation de l'effet de la salinité sur la croissance des isolats a montré que le sel a influencé leur survie. En effet, seulement 25 % et 15 % des isolats ont pu croître à 1 %, la plus petite concentration de sels (NaCl et KCl respectivement). L'halophobie de ces isolats confirment les études de Faghire *et al.* (2011) qui ont montré que la croissance de la majorité des bactéries isolés du haricot commun au Maroc a

été inhibée à moins de 1 % de sel. Aouni *et al.* (1986), ont aussi observé que les bactéries collectées à partir de nodules du haricot sec pouvaient tolérer jusqu'à 3 g.L⁻¹ de NaCl (0,3 %) et étaient incapables de se développer à 11 g.L⁻¹ (1 %). Cette étude a également montré que la tolérance des bactéries au sel a été variable. Ce constat a été traduit par le fait que la tolérance à la salinité des isolats baissait au fur et à mesure qu'augmentait la concentration en sel des milieux de culture. Ces observations corroborent celles d'Amani *et al.* (2020) qui ont isolé des nodules du soja en Côte d'Ivoire des isolats dont la tolérance au sel a chuté de 81,25 % (5 % de sel) à 12,5 % (10 % de NaCl). Rai (2012) a affirmé que les limites de tolérance à la salinité entre les rhizobia pouvait varier considérablement d'une espèce à une autre et même entre les souches de la même espèce. Les bactéries RPC108, RPC204 et RPC404 ont toléré jusqu'à 9 % de sel et au-delà. La forte tolérance au sel de ces isolats est similaire à celle qu'ont observé Ibny *et al.* (2019) ainsi que Hmaeid *et al.* (2019) dans leurs différentes études sur l'évaluation des effets du stress salin sur les rhizobia. Les rhizobia capables de supporter les fortes concentrations de sel sont dotés d'osmoprotecteurs représentés par un mécanisme d'accumulation intracellulaire de solutés organiques de faibles poids moléculaires. La présence et l'accumulation de ces osmolytes permettent aux bactéries de surmonter l'effet du stress salin et est l'une des caractéristiques des souches rhizobiennes halotolérantes (Essendoubi *et al.*, 2007). Hung *et al.* (2005) quant à eux ont attribué la tolérance à la salinité des souches rhizobiales à la synthèse des EPS. En effet, les exopolysaccharides synthétisés par certaines bactéries peuvent se lier aux cations atténuant ainsi le stress de salinité. Cette atténuation serait liée à la réduction de la teneur en Na⁺ disponible pour l'absorption des plantes (Arora *et al.*, 2013). Cette capacité des rhizobia locaux à croître dans des concentrations élevées de chlorure de sodium et potassium leur confère une importante valeur compétitive pour survivre dans la rhizosphère et noduler leurs plantes hôtes, en particulier dans les sols à forte salinité.

Outre le pH et la salinité, l'utilisation de pesticides chimiques constitue un des facteurs entravant le bon fonctionnement de la symbiose. L'utilisation de pesticides en agriculture permet d'augmenter la production et la qualité agricole. Cependant, leurs actions ne se limitent pas seulement qu'aux plantes cibles mais affectent également la survie et la diversité des populations microbiennes du sol notamment les bactéries essentielles pour la restauration de leur fertilité (Mohamad & Al-Nasser, 2018). Alors, les pesticides à utiliser dans la culture du haricot peuvent être sélectionnés en fonction de leur degré de tolérance par la bactérie utilisée comme inoculum. La présente étude a montré que la survie des isolats variait en fonction du type de pesticides et de la dose d'application.

En effet, le fongicide à base d'oxychlore de cuivre a inhibé la croissance de l'ensemble des isolats quelle que soit la dose d'application. La sensibilité au fongicide des rhizobia de l'étude a été évoquée par Gueï *et al.* (2020) qui ont rapporté l'inhibition de la croissance des isolats du pois bambara par différents types de fongicides en Côte d'Ivoire. Comme eux, plusieurs auteurs ont affirmé que les bactéries fixatrices d'azote ont une grande sensibilité *vis-à-vis* des fongicides (Drouin *et al.*, 2010). Ces résultats sont contraires à ceux de Moawad *et al.* (2014) quant à eux attribuent cette tolérance à l'aptitude des bactéries à contourner les réactions inhibitrices des pesticides en empruntant de nouvelles voies métaboliques. Cette divergence de résultats est due à la capacité qu'ont certaines bactéries à produire d'EPS pour se protéger des perturbateurs environnementaux. Ces EPS agissent en enrobant les résidus de pesticides afin d'éviter la dessiccation de la bactérie. Les herbicides additionnés au milieu YEM ont eu des effets plus ou moins toxiques sur l'ensemble des isolats testés indépendamment de la dose utilisée. En effet, 40 % des isolats bactériens ont pu croître en présence de la dose expérimentale de glyphosate. Ce taux a chuté à 25 % en présence de la dose de référence de cet herbicide. Quant au 2,4-D sel d'amine et l'haloxyfop-R-méthyle, la tolérance des isolats a été stationnaire à 80 et 35 % (respectivement) quel que soit la dose d'application. Plusieurs auteurs ont démontré les diverses sensibilités des rhizobactéries telles que les rhizobia à une large gamme d'herbicides (Patil *et al.*, 2012 ; Konaté *et al.*, 2015). Les isolats ont été plus sensibles au glyphosate et à l'haloxyfop-R-méthyle qu'aux 2,4-D sels d'amine. Ces différences de toxicité seraient dues aux mécanismes d'action du type d'herbicides sur les isolats. Zablotowicz & Reddy (2004) ont attribué la toxicité du glyphosate à sa capacité à inhiber la synthèse de l'acide 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (EPSP- synthétase), essentielle dans la formation des acides aminés aromatiques. Selon Yu *et al.* (2010), la toxicité du glyphosate aurait pour conséquence d'entraîner le déséquilibre trophique du sol par la diminution de la concurrence pour les nutriments parmi les microorganismes. Quant au 2-4 D sels d'amines, Fabra *et al.* (1997) affirment qu'il agit en provoquant des changements biochimiques et en altérant la fluidité membranaire des cellules bactériennes.

Le spirotetramate+flubendiamide a été le moins toxique des deux insecticides évalués dans cette étude car il n'a inhibé que la croissance de seulement 15 % des isolats. Les études menées par Faizah *et al.* (1980) ont révélés que les insecticides ont des effets moindres sur la survie des rhizobia contrairement aux autres types de pesticides.

Il existe aussi plusieurs rapports relatifs aux effets favorables des insecticides sur la croissance et l'activité des microorganismes dans le sol. Das & Mukhejee (2000), par exemple ont montré

que les insecticides ont stimulé la prolifération des microorganismes aérobiques non symbiotique qui fixe l'azote en favorisant leurs activités biochimiques. Cependant, les expériences réalisées dans ce domaine sont souvent contradictoires parce que d'une part la sensibilité des rhizobia diffère d'une espèce à une autre et varie parfois entre les souches d'une même espèce. D'autre part, la toxicité des pesticides change selon la classe, la formulation chimique et les doses d'applications (Moëz, 2003). Cela pourrait donc expliquer l'effet toxique de l'acétamipride+indoxocarbe sur la survie des bactéries et les différences dans la réponse des isolats RPC408 et RPC430 *vis-à-vis* des pesticides testés.

Conclusion partielle

Cette étude a révélé la présence des bactéries symbiotiques du haricot sec dans certains sols de la Côte d'Ivoire. Tous les plants ont nodulé sur les différents échantillons de sols à l'exception de ceux issus des sols en jachère des localités de Béoumi, Daloa et Korhogo. Sur les cinq accessions évaluées, seules deux (02) ont nodulé sur le sol de Bouaflé (HARI27/GHA19 et HARI21/GHA19) et une seule sur les sols de Bouaké (HARI17/GHA19) et de Sinématiali (HARI27/GHA19). Cent huit (108) isolats ont été isolés sur milieu YEM à partir des nodules obtenus. Ces isolats ont présenté dans l'ensemble des colonies de forme circulaire, opaque ou transparente et bombée avec une coloration blanchâtre, crème et jaunâtre. L'analyse microscopique a indiqué que toutes ces bactéries étaient des bacilles à Gram négatif. Ces caractéristiques sont typiques des rhizobiums et ont confirmé la norme morphoculturelle caractérisant les Rhizobia. La totalité de ces isolats a été capable de réinfecter leur plante hôte. Toutefois, les isolats RPC108, RPC109, RPC114, RPC115, RPC204, RPC208, RPC218, RPC304, RPC404, RPC410, RPC422, RPC424, RPC426, RPC430, RPC431, RPC504, RPC508, RPC509, RPC516 et RPC517 ayant été les plus infectifs et efficaces ont été retenus pour leur caractérisation physiologique. Les stress dus aux facteurs abiotiques tels que le pH, la salinité et les pesticides ont eu des effets inhibiteurs plus ou moins prononcé sur la croissance des bactéries qui a varié en fonction des isolats et des composés ajoutés dans le milieu de culture. Les isolats ont plus toléré les pH basiques que les pH acides. Une tolérance de 100 % a été observée aux pH variant entre 7 et 9. Par ailleurs, RPC204 est le seul isolat à avoir présenté un spectre large pour le pH. Quant au stress dû au sel, l'ensemble des isolats a montré une sensibilité bien marquée à la salinité excepté RPC108, RPC204 et RPC405 qui ont été les plus halotolérants. En ce qui concerne les stress dus aux pesticides, c'est RPC430 qui a présenté le spectre de tolérance le plus élevé car il a toléré la quasi-totalité des pesticides à l'exception de l'acétamipride+indoxocarbe.

Les 20 isolats présélectionnés pour leur infectivité et leur efficacité en conditions contrôlées ont été testés en plein champ. Ce test a consisté à évaluer l'effet des rhizobia locaux du haricot sur la nodulation, la croissance et la production des accessions HARI17/GHA19, HARI11/GHA18 et HARI35/GHA19 à travers deux (02) essais à l'est et à l'ouest de la ville de Bouaké notamment sur les stations de recherches sur le coton et des cultures vivrières du CNRA de ladite ville. Les résultats obtenus au cours de ces essais ont été détaillés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 3 : SELECTION DES RHIZOBIA LOCAUX PERFORMANTS, COMPÉTITIFS ET CAPABLES DE BOOSTER LA PRODUCTION DU HARICOT

Dans cette partie du travail, les effets de RPC108, RPC109, RPC114, RPC115, RPC204, RPC208, RPC218, RPC304, RPC404, RPC410, RPC422, RPC424, RPC426, RPC430, RPC431, RPC504, RPC508, RPC509, RPC516 et RPC517 ont été évalués sur la nodulation et les aspects agromorphologiques des accessions HARI17/GHA19, HARI11/GHA18 et HARI35/GHA19.

1. RESULTATS

1.1. Effet des rhizobia locaux sur les paramètres végétatifs du haricot sec

1.1.1. Effet des rhizobia locaux sur le diamètre au collet des plants du haricot sec

Les bactéries testées ont influencé significativement ($P \leq 0,05$) le diamètre au collet des plants en début de floraison. L'efficacité de chaque bactérie a varié en fonction de l'accession et du lieu de l'expérimentation (Tableau XXIII).

Sur la Station Coton, l'association des bactéries aux plants de haricot a favorisé une augmentation du diamètre au collet des plants de HARI17/GHA19 par rapport au témoin non traité. Sur ce site, le diamètre au collet le plus élevé (0,56 cm) a été observé chez les plants inoculés avec l'isolat RPC516. Chez l'accession HARI11/GHA18, ce sont les plants de la parcelle témoin de référence (engrais azoté) qui ont été enregistrés les diamètres au collet les plus élevés (0,41 cm). Les diamètres au collet les plus élevés enregistrés chez les plants de l'accession HARI35/GHA19 à la Station Coton ont été ceux induits par l'isolat RPC108 (0,73 cm).

A la Station CV, les isolats locaux n'ont pas plus augmenté le diamètre des plants que ceux de la parcelle témoin de référence (engrais azoté). En effet, sur cette station, les diamètres au collet les plus élevés ont été obtenus avec les plants fertilisés à l'engrais chimique chez toutes les accessions.

Tableau XXIII : effet des rhizobia locaux sur le diamètre au collet de trois accessions de haricot sec

Isolats	Diamètre au collet par plant (cm)					
	Station Coton			Station CV		
	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19
RPC108	0,45±0,06 ^{bc}	0,35±0,03 ^b	0,73±0,09^a	0,35±0,08 ^{bc}	0,29±0,11 ^b	0,46±0,12 ^{bcd}
RPC109	0,47±0,03 ^{abc}	0,38±0,04 ^{ab}	0,61±0,09 ^{ab}	0,38±0,04 ^{bc}	0,36±0,12 ^{ab}	0,5±0,05 ^{bcd}
RPC114	0,51±0,06 ^{abc}	0,36±0,03 ^{ab}	0,62±0,11 ^{ab}	0,38±0,1 ^{bc}	0,31±0,13 ^{ab}	0,49±0,05 ^{bcd}
RPC115	0,53±0,05 ^{ab}	0,37±0,03 ^{ab}	0,66±0,06 ^{ab}	0,48±0,08 ^b	0,31±0,06 ^{ab}	0,48±0,02 ^{bcd}
RPC204	0,48±0,06 ^{abc}	0,35±0,03 ^{ab}	0,63±0,01 ^{ab}	0,37±0,04 ^{bc}	0,3±0,09 ^b	0,4±0,19 ^{cd}
RPC208	0,55±0,08 ^{ab}	0,38±0,05 ^{ab}	0,64±0,07 ^{ab}	0,38±0 ^{bc}	0,31±0,06 ^{ab}	0,55±0,04 ^{ab}
RPC218	0,49±0,07 ^{abc}	0,33±0,03 ^b	0,62±0,04 ^{ab}	0,33±0,06 ^c	0,34±0,07 ^{ab}	0,41±0,09 ^{bcd}
RPC304	0,5±0,06 ^{abc}	0,38±0,05 ^{ab}	0,61±0,07 ^{ab}	0,31±0,14 ^c	0,31±0,12 ^{ab}	0,41±0,08 ^{bcd}
RPC404	0,53±0,03 ^{abc}	0,37±0,05 ^{ab}	0,54±0,05 ^b	0,35±0,08 ^{bc}	0,32±0,16 ^{ab}	0,53±0,1 ^{abc}
RPC410	0,46±0,09 ^{bc}	0,35±0,01 ^{ab}	0,62±0,05 ^{ab}	0,34±0,07 ^{bc}	0,32±0,07 ^{ab}	0,4±0,11 ^{cd}
RPC422	0,49±0,01 ^{abc}	0,39±0,05 ^{ab}	0,63±0,01 ^{ab}	0,35±0,03 ^{bc}	0,31±0,1 ^{ab}	0,38±0,07 ^{cd}
RPC424	0,48±0,05 ^{abc}	0,37±0,03 ^{ab}	0,62±0,09 ^{ab}	0,33±0,06 ^{bc}	0,37±0,1 ^{ab}	0,43±0,03 ^{bcd}
RPC426	0,52±0,07 ^{abc}	0,35±0,03 ^b	0,58±0,12 ^b	0,35±0,13 ^{bc}	0,41±0,13 ^{ab}	0,43±0,06 ^{bcd}
RPC430	0,54±0,02 ^{ab}	0,35±0,04 ^{ab}	0,58±0,12 ^b	0,35±0,05 ^{bc}	0,31±0,09 ^{ab}	0,48±0,03 ^{bcd}
RPC431	0,46±0,03 ^{bc}	0,35±0,02 ^{ab}	0,57±0,08 ^b	0,38±0,09 ^{bc}	0,34±0,07 ^{ab}	0,41±0,08 ^{bcd}
RPC504	0,51±0,13 ^{abc}	0,35±0,05 ^b	0,63±0,07 ^{ab}	0,39±0,05 ^{bc}	0,33±0,1 ^{ab}	0,38±0,09 ^{cd}
RPC508	0,51±0,09 ^{abc}	0,35±0,04 ^b	0,57±0,03 ^b	0,38±0,12 ^{bc}	0,29±0,14 ^b	0,43±0,08 ^{bcd}
RPC509	0,51±0,05 ^{abc}	0,37±0,04 ^{ab}	0,59±0,14 ^b	0,38±0,05 ^{bc}	0,33±0,1 ^{ab}	0,43±0,09 ^{bcd}
RPC516	0,56±0,05^a	0,35±0,03 ^{ab}	0,61±0,14 ^{ab}	0,34±0,08 ^{bc}	0,28±0,09 ^b	0,39±0,1 ^{cd}
RPC517	0,52±0,02 ^{abc}	0,36±0,03 ^{ab}	0,61±0,05 ^{ab}	0,32±0,04 ^c	0,33±0,06 ^{ab}	0,39±0,04 ^{cd}
Témoin azoté	0,52±0,02 ^{abc}	0,41±0,04^a	0,59±0,05 ^b	0,65±0,22^a	0,47±0,13^a	0,67±0,15^a
Témoin zéro	0,43±0,01 ^c	0,33±0,05 ^b	0,54±0,04 ^b	0,3±0,08 ^c	0,27±0,12 ^b	0,36±0,11 ^d
Moyenne	0,5±0,05	0,36±0,04	0,61±0,08	0,37±0,1	0,33±0,1	0,45±0,1
Probabilité	0,048	0,026	0,015	0,030	0,043	0,030
CV (%)	11,67	10,26	12,88	27,39	29,56	22,93

Dans chaque colonne les moyennes affectées de la même lettre significativement identiques au seuil de 5 % (test de Fisher), CV : coefficient de variabilité.

1.1.2. Effet des rhizobia locaux sur la hauteur des plants du haricot sec

La hauteur des plants a été significativement influencée ($P \leq 0,05$) par les bactéries utilisées (Tableau XXIV). Elle a aussi varié en fonction de l'accession et du site de l'essai. En effet, A la Station Coton, c'est l'isolat RPC404 qui a induit la hauteur de plants la plus importante (56,83 cm) avec l'accession HARI17/GHA19. L'ensemble des inocula et le témoin fertilisé ont amélioré la hauteur des plants de l'accession HARI11/GHA18 par rapport au témoin non fertilisé sur ce même site. Cependant, la hauteur la plus importante (33,8 cm) a été induite par l'isolat RPC115. En ce qui concerne la hauteur des plants de l'accession HARI35/GHA19 à la Station Coton, les plus importantes ont été observées chez le témoin fertilisé avec une moyenne de 82,97 cm.

A la Station CV, ce sont les plants du témoin fertilisé qui ont présenté les plus grandes valeurs chez les accessions HARI17/GHA19 (71,9 cm) et HARI11/GHA18 (36,62 cm). Chez HARI35/GHA19 ce sont plutôt les plants inoculés par l'isolat RPC208 qui ont générés les hauteurs les plus grandes (77,67 cm) sur ce site.

Tableau XXIV : effet des rhizobia locaux sur la hauteur des plants de trois accessions de haricot sec

Isolats	Hauteur des plants (cm)					
	Station Coton			Station CV		
	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19
RPC108	38,6±3,3 ^b	27,6±6,72 ^{ab}	58,55±44,97 ^{ab}	35,01±5,74 ^b	25,74±5,77 ^b	53,27±26,62 ^{abc}
RPC109	36,93±10,04 ^b	28,43±4,15 ^{ab}	82,14±2,43 ^a	35,07±8,31 ^b	25,5±6,66 ^b	71,17±13,97 ^{abc}
RPC114	41,93±3,32 ^{ab}	29,87±3,01 ^{ab}	79,34±16,08 ^a	41,21±13,78 ^b	28,62±6,89 ^{ab}	61,53±15,97 ^{abc}
RPC115	44,67±3,88 ^{ab}	33,8±2,55^a	72,13±9,77 ^{ab}	44,73±10,62 ^b	29,41±5,3 ^{ab}	69,43±3,36 ^{abc}
RPC204	42,13±15,21 ^{ab}	25,6±5,44 ^{ab}	74,07±2,28 ^{ab}	35,83±4,49 ^b	25,61±6,86 ^b	52,7±24,55 ^{abc}
RPC208	44±8,19 ^{ab}	29,33±1,27 ^{ab}	80,69±7,73^a	43,03±6,44 ^b	28,51±4,92 ^{ab}	77,67±8,45 ^a
RPC218	39,83±13,59 ^{ab}	27,2±0,92 ^{ab}	74,77±4,98 ^{ab}	32,82±8,47 ^b	29,46±2,88 ^{ab}	58,67±17,31 ^{abc}
RPC304	41,87±14,4 ^{ab}	29,87±3,61 ^{ab}	66,87±18,45 ^{ab}	33,59±13,29 ^b	30,05±9,43 ^{ab}	52,17±13,61 ^{abc}
RPC404	56,83±9,76^a	31,97±6,62 ^{ab}	60,97±6,21 ^{ab}	37,02±11,8 ^b	27,39±6,53 ^{ab}	71,97±9,35 ^{abc}
RPC410	42,91±13,79 ^{ab}	27,83±3,69 ^{ab}	82,17±14,81 ^a	35,65±8,63 ^b	27,25±4,77 ^{ab}	64,83±15,8 ^{abc}
RPC422	46,33±10 ^{ab}	29,1±5,43 ^{ab}	75,96±8,48 ^a	32,93±10,72 ^b	25,42±3,87 ^b	57,5±8,57 ^{abc}
RPC424	43,33±8,43 ^{ab}	28±2,62 ^{ab}	71,73±9,97 ^{ab}	38,17±4,06 ^b	30,73±6,82 ^{ab}	50,43±6,04 ^{abc}
RPC426	43,03±12,07 ^{ab}	25,83±6,96 ^{ab}	72,25±12,94 ^{ab}	39,53±8,26 ^b	37,03±11,83 ^a	59,57±15,64 ^{abc}
RPC430	49,78±12,49 ^{ab}	25,15±8,23 ^b	67,23±12,08 ^{ab}	41,13±5 ^b	30,47±3,84 ^{ab}	68,3±18,35 ^{abc}
RPC431	37,2±7,1 ^b	25,93±7,64 ^{ab}	75,13±17,53 ^{ab}	40,03±7 ^b	24,6±7,61 ^b	56,97±13,57 ^{abc}
RPC504	43,2±4,52 ^{ab}	27,03±1,72 ^{ab}	73,99±7,65 ^{ab}	41,43±9,16 ^b	26,71±4,6 ^{ab}	52,13±25,5 ^{abc}
RPC508	45,77±12,13 ^{ab}	29,77±2,81 ^{ab}	64,74±4,18 ^{ab}	38,15±13,52 ^b	26,3±9,9 ^{ab}	44,6±14,93 ^{bc}
RPC509	38,53±17,31 ^b	30±0,87 ^{ab}	66,3±21,6 ^{ab}	42,27±3,23 ^b	33,43±3,02 ^{ab}	42,87±38,91 ^c
RPC516	47,23±2,91 ^{ab}	26,57±3,96 ^{ab}	73,13±13,75 ^{ab}	35,17±1,99 ^b	28,74±3,1 ^{ab}	52,93±17,59 ^{abc}
RPC517	46,87±15,54 ^{ab}	27,13±5,1 ^{ab}	72,16±6,6 ^{ab}	33,41±7,65 ^b	33,07±6,13 ^{ab}	55,97±21,52 ^{abc}
Témoin azoté	51,63±10,58 ^{ab}	29,3±7,33 ^{ab}	82,97±21,19^a	71,9±31,84^a	36,62±6,04^a	75,8±36,56 ^{ab}
Témoin zéro	36±9 ^b	24±7,35 ^b	47,03±40,24 ^b	31,13±3,18 ^b	24,51±8,51 ^b	43,73±13,32 ^c
Moyenne	43,57±10,14	28,15±4,7	71,56±16,68	39,06±12,03	28,87±6,45	58,83±18,79
Probabilité	0,008	0,007	0,048	0,006	0,049	0,017
CV (%)	23,28	16,71	23,3	30,82	22,33	31,95

Dans chaque colonne les moyennes affectées de la même lettre significativement identiques au seuil de 5 % (test de Fisher), CV : coefficient de variabilité.

1.1.3. Effet des rhizobia locaux sur la biomasse sèche des plants du haricot sec

Les bactéries testées ont influencé significativement ($P \leq 0,05$) la production de la biomasse sèche des différentes accessions. De plus, l'efficacité de chaque bactérie a varié en fonction de l'accession et du lieu de l'expérimentation (Tableau XXV).

A la station coton, l'ensemble des bactéries testées a accru la biomasse sèche des plants de l'accession HARI17/GHA19 par rapport au témoin non fertilisé à l'exception de l'isolat RPC108. Sur ce site, la biomasse sèche la plus importante a été induite par l'isolat RPC516 et a été de 6 g. Tous les isolats testés ont également amélioré la biomasse sèche des plants de l'accession HARI11/GHA18 par rapport au témoin non fertilisé sur la Station Coton. La biomasse la plus élevée sur ce site a été observée chez les plants inoculés par l'isolat RPC509 avec une moyenne de 2,93 g. L'ensemble des isolats ainsi que le témoin fertilisé ont également amélioré la biomasse des plants de l'accession HARI35/GHA19 par rapport au témoin absolu sur le site de la Station Coton. Ainsi, les biomasses les plus importantes ont été obtenues grâce aux isolats RPC108 (13,87 g), RPC114 (12,47 g), RPC208 (12,47 g) au témoin fertilisé (12,93 g).

A la station CV, l'ensemble des bactéries a augmenté le poids sec des plants HARI17/GHA19 par rapport au témoin non fertilisé et l'isolat RPC517. Toutefois, aucune d'elle n'a pu accroître le poids sec des plants comparativement au témoin fertilisé (15,73 g) sur ce site. Sur cette Station, seulement le témoin fertilisé a le plus augmenté la biomasse sèche des plants de HARI11/GHA18 (13,2 g). Cependant, l'isolat qui a induit le poids de biomasse le plus élevé est RPC509 avec une moyenne de 5,93 g contre 2,47 pour le témoin non fertilisé. Seul le témoin fertilisé a amélioré la biomasse sèche des plants de HARI35/GHA19 sur ce site. Par contre, c'est l'isolat RPC404 qui a induit le poids de biomasse le plus élevé avec une moyenne de 9,33 g parmi les 20 testés.

Tableau XXV : effet des rhizobia locaux sur la biomasse sèche de trois accessions de haricot sec

Isolats	Biomasse sèche par plant (g)					
	Station Coton			Station CV		
	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19
RPC108	3,13±0,5 ^d	1,93±0,23 ^{bcd}	13,87±2,43^a	3,53±0,31 ^b	3±0,87 ^b	5,4±1,8 ^b
RPC109	4,07±0,23 ^{abcd}	2,67±0,5 ^{ab}	11,4±2,21 ^{ab}	5,87±1,3 ^b	3,6±0,35 ^b	6,33±1,22 ^b
RPC114	4,2±1,2 ^{abcd}	2,33±0,31 ^{abc}	12,47±3,04^a	4,47±1,92 ^b	4,6±1,93 ^b	5,4±1,03 ^b
RPC115	5,4±0,6 ^{abc}	2,6±0,2 ^{abc}	8,93±2,73 ^{ab}	7,33±2,06 ^b	3,53±0,42 ^b	6,73±2,8 ^b
RPC204	3,6±0,8 ^{bcd}	1,73±0,12 ^{cd}	12,07±5,62 ^{ab}	4,6±1,03 ^b	3,8±0,2 ^b	5,93±1,3 ^b
RPC208	4,2±0,53 ^{abcd}	2,47±0,58 ^{abc}	12,47±4,6^a	4,87±1,13 ^b	4,07±1,92 ^b	8,67±1,17 ^b
RPC218	4,27±0,31 ^{abcd}	2,2±0,6 ^{abcd}	11,73±4,39 ^{ab}	4,13±0,42 ^b	3,27±0,3 ^b	4,4±0,22 ^b
RPC304	4,13±1,92 ^{abcd}	2,27±0,12 ^{abcd}	10,13±2,55 ^{ab}	5,87±1,66 ^b	3,73±0,57 ^b	4,53±0,11 ^b
RPC404	5,33±1,94 ^{abc}	1,93±1,4 ^{bcd}	9,47±3,97 ^{ab}	4,93±1,34 ^b	4,2±1,56 ^b	9,33±3,51^b
RPC410	3,73±1,4 ^{bcd}	1,73±0,12 ^{cd}	9,2±0,4 ^{ab}	4,33±1,4 ^b	3,8±1,64 ^b	6,87±1,5 ^b
RPC422	4,8±0,53 ^{abcd}	2,27±0,5 ^{abcd}	8,87±2,87 ^{ab}	4,4±0,72 ^b	3,87±0,99 ^b	5,2±1,43 ^b
RPC424	3,47±1,92 ^{cd}	2±0,53 ^{bcd}	10,53±2,37 ^{ab}	4,67±1,14 ^b	4,67±0,72 ^b	5,8±0,72 ^b
RPC426	4,4±1,31 ^{abcd}	2,07±0,58 ^{abcd}	10,33±4,5 ^{ab}	5,6±1,62 ^b	3,67±1,81 ^b	7,6±3,27 ^b
RPC430	5,53±0,5 ^{abc}	2,13±0,23 ^{abcd}	10,13±2,6 ^{ab}	7,6±1,33 ^b	4±0,8 ^b	6,8±1,44 ^b
RPC431	4,07±1,27 ^{abcd}	2,4±0,53 ^{abc}	10,67±3,72 ^{ab}	5,4±1,06 ^b	3,67±0,42 ^b	6±2,65 ^b
RPC504	3,73±2,44 ^{bcd}	2,07±0,7 ^{abcd}	8,8±3,29 ^{ab}	5,87±1,45 ^b	4,53±1,36 ^b	4,53±1,2 ^b
RPC508	4,37±1,79 ^{abcd}	2,07±0,46 ^{abcd}	7,73±0,42 ^{ab}	5,2±1,31 ^b	3,27±0,23 ^b	7,6±2,31 ^b
RPC509	3,93±0,76 ^{abcd}	2,93±0,64^a	10,67±0,31 ^{ab}	5±1,93 ^b	5,93±0,41^b	4,93±0,42 ^b
RPC516	6±1,39^a	2,47±0,64 ^{abc}	9,07±4,46 ^{ab}	7,73±2,58^b	3,67±0,61 ^b	4,73±0,33 ^b
RPC517	3,47±0,23 ^{cd}	2±0,53 ^{bcd}	9,73±0,92 ^{ab}	3,4±0,53 ^b	4,4±1,6 ^b	4,4±0,14 ^b
Témoin azoté	5,6±2 ^{ab}	2,13±0,5 ^{abcd}	12,93±4,32^a	15,73±5,64^a	13,2±3,66^a	22,4±4,52^a
Témoin zéro	2,93±0,31 ^d	1,4±0,4 ^d	6,07±0,61 ^b	3,4±0,53 ^b	2,47±0,81 ^b	4,07±0,21 ^b
Moyenne	4,29±1,33	2,17±0,56	10,33±3,32	5,63±1,39	4,32±0,88	6,71±1,7
Probabilité	0,024	0,031	0,050	< 0,001	0,010	0,010
CV (%)	31,13	25,88	41,79	59,89	65,65	76,65

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre sont significativement identiques au seuil de 5 % selon le test de LSD de Fisher

1.2. Effet des rhizobia locaux sur les paramètres nodulaires du haricot

1.2.1. Effet des rhizobia locaux sur le nombre de nodules

Les bactéries testées ont influencé significativement ($P \leq 0,05$) la formation de nodules. Ce paramètre a varié en fonction de l'isolat, des différentes accessions et des sites expérimentaux (Tableau XXVI). De plus, l'ensemble des bactéries utilisées comme inoculum a induit une importante nodulation sur le système racinaire des accessions évaluées par rapport aux différents témoins sur les deux sites.

A la Station Coton, le nombre de nodules induit par les bactéries a varié entre 1,67 et 20 nodules par plant chez HARI17/GHA19. RPC208 est l'isolat qui a induit la formation du plus grand nombre de nodules (20 nodules). Chez l'accession HARI11/GHA18, c'est l'isolat RPC304 qui a induit la formation du plus grand nombre de nodules (50,3 nodules). Le nombre de nodules induit par les bactéries sur HARI35/GHA19 a varié de 2,8 à 13,93 nodules par plants. RPC115 a été l'isolat qui a induit le plus grand nombre de nodules.

A la Station CV, ce nombre a varié entre 16,67 et 118 nodules chez HARI17/GHA19. Le nombre le plus élevé de nodule observé chez cette accession a été induit par l'isolat RPC204. Chez l'accession HARI11/GHA18 par contre, ce résultat a été obtenu avec l'isolat RPC208 (55,47). Le plus grand nombre de nodules de HARI35/GHA19 obtenu a été de 118 et a été induit par RPC431.

Tableau XXVI : nombre de nodules induits par des rhizobia sur trois accessions de haricot sec

Isolats	Nombre de nodules					
	Station Coton			Station CV		
	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19
RPC108	15,4±5,89 ^{ab}	10,7±2,4 ^{de}	11,8±4,61 ^{ab}	52,47±18,56 ^{cdef}	22,2±8,19 ^{ab}	59,33±19,56 ^{bcd}
RPC109	12,8±3,64 ^{ab}	12,5±1,3 ^{de}	4,67±1,98 ^b	50,8±17,39 ^{cdef}	41,6±8,65 ^{ab}	22,8±4,87 ^d
RPC114	8,07±1,71 ^{ab}	9,5±1,4 ^{de}	3,33±0,92 ^b	35,87±10,07 ^{def}	15,4±6,64 ^{ab}	20±6,52 ^d
RPC115	5,33±1,03 ^b	29,1±3,8 ^{abcde}	13,93±1,51^a	67,53±25,09 ^{bcd}	36,3±12,78 ^{ab}	52,33±14,6 ^{bcd}
RPC204	15,53±6 ^{ab}	23,9±4,2 ^{bcde}	4,53±1,3 ^b	118,27±27,11^a	26,2±6,84 ^{ab}	45,07±10,79 ^{bcd}
RPC208	20±3,59^a	27,3±7,8 ^{abcde}	11,6±2,69 ^{ab}	26,47±9,78 ^{ef}	55,47±10,32^a	51,8±6,97 ^{bcd}
RPC218	14,47±5,68 ^{ab}	20,7±4,9 ^{bcde}	6,13±2,03 ^{ab}	57,93±15,9 ^{bcd}	24±7,5 ^{ab}	31,53±8,94 ^{cd}
RPC304	6,47±2,52 ^{ab}	50,3±17,1^a	4±2,91 ^b	32,45±9,28 ^{def}	24,87±8,23 ^{ab}	50,6±17,71 ^{bcd}
RPC404	11,07±3,42 ^{ab}	18,7±4,4 ^{cde}	4,67±1,9 ^b	84,53±27,2 ^{abc}	43,6±14,26 ^{ab}	38,13±11,7 ^{bcd}
RPC410	14,4±2,39 ^{ab}	12,6±3 ^{de}	8,6±4,91 ^{ab}	47,27±19,83 ^{cdef}	31,53±8,9 ^{ab}	33,6±12,25 ^{cd}
RPC422	5,93±1,39 ^{ab}	24,6±4,9 ^{bcde}	8,27±3,43 ^{ab}	73,67±10,21 ^{abcde}	27,07±6,64 ^{ab}	43,47±8,02 ^{bcd}
RPC424	9,27±3,35 ^{ab}	11,5±3,7 ^{de}	8,2±3,37 ^{ab}	40,33±15,55 ^{cdef}	3,47±0,66 ^b	28,33±7,02 ^{cd}
RPC426	8,8±1,43 ^{ab}	27,7±8,7 ^{abcde}	7,8±3,42 ^{ab}	19,2±6,51 ^f	10,93±2,19 ^b	48,87±19 ^{bcd}
RPC430	10±3,74 ^{ab}	19,1±5,5 ^{cde}	9,2±2,85 ^{ab}	41,27±6,59 ^{cdef}	25,4±8,16 ^{ab}	34,07±13,85 ^{cd}
RPC431	8,2±2,54 ^{ab}	45,3±6,7 ^{ab}	6,67±1,78 ^{ab}	105,53±8,18 ^{ab}	43,93±10,62 ^{ab}	118,93±56,35^a
RPC504	7,93±2,79 ^{ab}	34,3±5,5 ^{abcd}	11,27±5,12 ^{ab}	42,93±6,62 ^{cdef}	31,87±12,52 ^{ab}	56,53±16,42 ^{bcd}
RPC508	7,07±2,12 ^{ab}	33,8±10 ^{abcd}	10,47±4,57 ^{ab}	35,2±10,94 ^{def}	32,97±9,09 ^{ab}	35,13±5,49 ^{bcd}
RPC509	6,13±2,01 ^{ab}	39±11,9 ^{abc}	8,73±3,8 ^{ab}	42,13±9,76 ^{cdef}	26,8±8,26 ^{ab}	76,93±16,98 ^{ab}
RPC516	9,2±2,8 ^{ab}	14,6±3,6 ^{cde}	8,2±2,48 ^{ab}	62,67±14,49 ^{bcd}	17,47±2,61 ^{ab}	38,27±15,78 ^{bcd}
RPC517	7,6±2,96 ^{ab}	30,5±13,3 ^{abcde}	4,13±2,37 ^b	75,27±41 ^{abcd}	18,2±4,24 ^{ab}	67,67±26,91 ^{bc}
Témoin azoté	2,87±0,52 ^b	6,7±1,5 ^e	2,8±1,23 ^b	16,67±2,52 ^f	0,93±0,22 ^b	23,6±3,82 ^d
Témoin zéro	1,67±0,17 ^b	10,2±2,9 ^{de}	3,33±0,86 ^b	19,2±6,69 ^f	15,6±3,13 ^{ab}	20,2±6,84 ^d
Moyenne	9,46±2,33	23,3±5,4	7,38±2,54	52,17±15,64	26,17±85,28	45,33±10,72
Probabilité	0,007	0,040	0,037	< 0,001	0,001	0,010
CV (%)	88,08	74,57	88,58	68,32	96,6	67,77

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre sont significativement identiques au seuil de 5 % selon le test de LSD de Fisher

1.2.2. Effet des rhizobia locaux sur le poids sec des nodules des plants de haricot

Les isolats évalués ont eu un effet significatif ($P \leq 0,05$) sur le poids sec qui a varié selon les isolats inoculés, les accessions et les sites expérimentaux (Tableau XXVII). Ainsi, pour l'accession HARI17/GHA19 à la Station Coton, le poids sec des nodules a varié de 51,1 à 218 mg. L'ensemble des isolats a amélioré le poids sec des nodules par rapport aux témoins non inoculés et le poids sec le plus élevé a été obtenu avec l'isolat RPC208. Le poids sec de nodules de l'accession HARI11/GHA18 a varié de 26 à 490 mg sur ce même site. Le plus important poids nodulaire a été induit par l'isolat RPC509. L'ensemble des isolats a aussi amélioré le poids sec des nodules de HARI35/GHA19 par rapport aux témoins non inoculés. Cependant, c'est RPC504 qui a le plus amélioré le poids nodulaire de cette accession avec un poids moyen de 344 mg.

A la Station CV, l'isolat ayant le plus amélioré le poids nodulaire de l'accession HARI17/GHA19 sur ce site est RPC431 avec un poids moyen de 783 mg.

Chez l'accession HARI11/GHA18, ce sont les isolats RPC109 (263,33 mg), RPC208 (253,33 mg) et RPC431 (253,33 mg) qui ont induit les poids secs les plus importants. Les autres isolats ont également amélioré le poids sec nodulaire par rapport aux témoins non inoculés. Le poids sec nodulaire le plus important de HARI35/GHA19 a quant à lui été obtenu avec RPC431 qui a induit la formation d'un poids sec d'environ 1080 mg.

Tableau XXVII : effet des rhizobia locaux sur le poids sec nodulaire de trois accessions de haricot sec

Isolats	Poids sec nodulaire (mg)					
	Station Coton			Station CV		
	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19
RPC108	210,33±62,05 ^{ab}	213,33±26,48 ^{abcd}	237±21,4 ^{ab}	483,3±160,2 ^{abcde}	146,9±44,67 ^{ab}	370±191,4 ^{bcd}
RPC109	159±45,13 ^{ab}	152,33±59,46 ^{bcd}	184,7±28,9 ^{ab}	433,3±32,9 ^{abcde}	263,33±130,72^a	180±150 ^d
RPC114	122,23±13,07 ^{ab}	96,67±30,83 ^d	130±52,7 ^{ab}	180±57,2 ^{de}	96,67±30,83 ^{ab}	256,7±127 ^{bcd}
RPC115	180±52,13 ^{ab}	243,33±23,08 ^{abcd}	227,7±10,8 ^{ab}	560±120 ^{abcd}	243,33±83,08 ^{ab}	373,3±68,1 ^{bcd}
RPC204	170±108,17 ^{ab}	101,77±28,16 ^d	133,3±61,7 ^{ab}	493,3±187,9 ^{abcde}	66,67±25,12 ^{ab}	190±40 ^{cd}
RPC208	218±83,5^a	149,77±48,35 ^{bcd}	222,3±30,4 ^{ab}	253,3±70,9 ^{bcd}	253,33±96,55^a	633,3±203,1 ^b
RPC218	200,67±112,43 ^{ab}	93,33±32,34 ^d	124±63,9 ^{ab}	470±125,1 ^{abcde}	93,33±32,34 ^{ab}	396,7±96,3 ^{bcd}
RPC304	111,33±67,21 ^{ab}	230,33±61,4 ^{abcd}	123,7±61,5 ^{ab}	203,3±49,3 ^{cde}	133,33±46,93 ^{ab}	363,3±102,1 ^{bcd}
RPC404	220,83±77,45 ^a	122±20,66 ^{cd}	192,3±70,5 ^{ab}	620±295,5 ^{ab}	240±46,37 ^{ab}	506,7±176,8 ^{bcd}
RPC410	60,67±24,88 ^{ab}	128±58,65 ^{cd}	135,3±13,4 ^{ab}	316,7±134,6 ^{bcd}	156,67±40,79 ^{ab}	326,7±80,1 ^{bcd}
RPC422	87,67±34,14 ^{ab}	400±151,57 ^{abc}	256,3±80,3 ^{ab}	493,3±102,1 ^{abcde}	142,67±12,21 ^{ab}	376,7±53,2 ^{bcd}
RPC424	108,67±23,13 ^{ab}	131,67±56,94 ^{cd}	133,3±53,1 ^{ab}	216,7±124,2 ^{cde}	86,7±25 ^{ab}	283,3±141,2 ^{bcd}
RPC426	203,33±88,34 ^{ab}	420±95,57 ^{ab}	165,7±80,2 ^{ab}	163,3±257 ^e	60±10 ^{ab}	356,7±121,6 ^{bcd}
RPC430	161,33±59,88 ^{ab}	123±59,91 ^{cd}	190±40 ^{ab}	230±110 ^{bcd}	39,33±12,55 ^{ab}	183,3±55 ^{cd}
RPC431	111,67±48,85 ^{ab}	253,33±126,62 ^{abcd}	174±65,8 ^{ab}	783,3±92,9^a	253,33±76,62^a	1080±452,3^a
RPC504	65,8±28,76 ^{ab}	160±43,59 ^{bcd}	344,7±13,9^a	230±90,8 ^{bcd}	80±10 ^{ab}	520±70 ^{bcd}
RPC508	196,67±40,41 ^{ab}	228,33±7,64 ^{abcd}	236,3±85,3 ^{ab}	403,3±128,1 ^{abcde}	200±43,59 ^{ab}	346,7±60,5 ^{bcd}
RPC509	95,67±36,71 ^{ab}	490±70,74^a	125±66 ^{ab}	360±121,1 ^{bcd}	190±53,57 ^{ab}	583,3±95 ^{bc}
RPC516	196,33±37,09 ^{ab}	174,67±64,79 ^{bcd}	210±30 ^{ab}	553,3±97,1 ^{abcde}	80±20 ^{ab}	370±199,7 ^{bcd}
RPC517	164,33±51,25 ^{ab}	86,67±35,06 ^d	96,3±26,8 ^b	583,3±144,3 ^{abc}	86,67±25,06 ^{ab}	416,7±57,7 ^{bcd}
Témoin azoté	51,5±18,51 ^b	26±4,58 ^d	41,7±5,8 ^b	160±41,1 ^e	3,33±0,77 ^b	120±38,9 ^d
Témoin zéro	60,77±11,93 ^{ab}	61,67±19,65 ^d	54,7±14,3 ^b	163,3±25,2 ^e	68,33±24,05 ^{ab}	210±30 ^{cd}
Moyenne	143,49±45,27	185,74±54,91	169,9±81,1	379,7±195,64	135,63±77,54	383,8±114,43
Probabilité	0,045	0,016	0,041	0,010	0,047	0,002
CV (%)	68,49	67,25	77,13	70	57,17	74,1

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre sont significativement identiques au seuil de 5 % selon le test de LSD de Fisher

1.3. Effet des rhizobia locaux sur les paramètres de rendement des accessions de haricot sec

1.3.1. Effet des rhizobia locaux sur le poids des gousses du haricot sec

Les rhizobia locaux inoculés au haricot sec ont influencé significativement ($P \leq 0,05$) le poids des gousses comparativement au témoin non fertilisé (Tableau XXVIII). Ce paramètre a varié en fonction de l'isolat, de l'accession et du site de l'essai.

Sur le site de la Station Coton, le poids des gousses par plant de HARI17/GHA19 a été amélioré par les bactéries inoculées. Parmi celles-ci, RPC114 a été celle qui a le plus augmenté ce paramètre. Cette bactérie a induit la formation d'un poids de gousses de 91,67 g par plant. Le poids des gousses de l'accession HARI11/GHA18 a été accru par l'ensemble des traitements en comparaison au témoin non fertilisé sur ce site. Les poids de gousses le plus importants de cette accession ont été obtenus avec RPC114, RPC115 et RPC404 à savoir 47 ; 51,67 et 45,67 g respectivement. Ces poids sont supérieurs à celui obtenu avec le témoin fertilisé (38,33 g). L'ensemble des isolats a plus ou moins amélioré le poids des gousses de HARI35/GHA19 par rapport aux témoins non inoculés sur cette station. En effet, ce paramètre a varié de 55 à 138,33 g. Le poids de gousses le plus important a été induit par l'isolat RPC426. Tous les isolats ont induit des poids de gousses supérieurs à celui de l'engrais de synthèse à l'exception de RPC422. A la Station CV, c'est l'isolat RPC426 qui a induit le poids de gousses le plus élevé (40,67 g) de HARI17/GHA19. Le poids de gousses obtenu avec cette bactérie locale a été supérieur à celui enregistré avec le témoin fertilisé (12,33 g). Chez l'accession HARI11/GHA18, le poids des gousses a été compris entre 15 et 52 g. Le poids de gousses le plus élevé a été obtenu avec l'isolat RPC431. Cet isolat ainsi que les 19 autres ont amélioré le poids des gousses par rapport au témoin fertilisé (17 g). Sur cette station, c'est RPC115 qui a le plus amélioré le poids des gousses (58,33 g) de HARI35/GHA19.

Tableau XXVIII : effet des rhizobia locaux sur le poids sec des gousses par plant chez trois accessions de haricot sec

Isolats	Poids sec des gousses par plant (g)					
	Station Coton			Station CV		
	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19
RPC108	62,67±24,01 ^{abcd}	32,67±9,29 ^{ab}	75,67±37,22 ^{ab}	24±15,72 ^{abcd}	31,67±6,92 ^{abcd}	40,67±10,79 ^{abc}
RPC109	50±16,52 ^{cd}	40±19,97 ^{ab}	88,67±18,56 ^{ab}	24±15 ^{abcd}	23±4,58 ^{bcd}	35,33±12,68 ^{abc}
RPC114	91,67±31,88^a	47±3,46^a	68,33±14,5 ^{ab}	30,33±3,21 ^{abcd}	44±13,3 ^{abc}	53±16,17 ^{ab}
RPC115	55,33±16,86 ^{bcd}	51,67±15,63^a	104,67±74,07 ^{ab}	26,67±8,39 ^{abcd}	34,33±16,07 ^{abcd}	58,33±13,27^a
RPC204	60,67±19,5 ^{abcd}	32±2 ^{ab}	62±48,75 ^b	17,33±6,66 ^{cd}	34±6,56 ^{abcd}	29,33±7,51 ^{abc}
RPC208	68,33±6,81 ^{abcd}	39,33±20,01 ^{ab}	102±14,93 ^{ab}	28,67±10,24 ^{abcd}	34,67±12,1 ^{abcd}	53,67±20,84 ^{ab}
RPC218	50,33±7,57 ^{cd}	39,33±9,45 ^{ab}	61,33±21,5 ^b	15,33±1,53 ^d	29,33±10,79 ^{abcd}	42±17,58 ^{abc}
RPC304	57,33±13,43 ^{abcd}	44,33±13,2 ^{ab}	77±51,03 ^{ab}	21,67±9,66 ^{bcd}	42±15,72 ^{abcd}	27,33±5,51 ^{abc}
RPC404	81,67±9,29 ^{abc}	45,67±16,17^a	96±51,45 ^{ab}	29,33±2,31 ^{abcd}	35±9,37 ^{abcd}	40±13,08 ^{abc}
RPC410	83,33±56,15 ^{abc}	45,33±9,87 ^{ab}	79±41 ^{ab}	28,67±10,5 ^{abcd}	37,67±14,03 ^{abcd}	40,67±7,64 ^{abc}
RPC422	66±7 ^{abcd}	35,33±12,5 ^{ab}	59,67±13,28 ^b	18,33±2,31 ^{cd}	24±7,06 ^{bcd}	18,33±9,24 ^c
RPC424	64±21,79 ^{abcd}	41,67±12,01 ^{ab}	82±28,05 ^{ab}	23,67±3,21 ^{abcd}	26±8,43 ^{abcd}	32±18 ^{abc}
RPC426	56±25,51 ^{bcd}	34,67±5,13 ^{ab}	138,33±67,49^a	40,67±2,08^a	46,33±18,34 ^{ab}	48±14,8 ^{abc}
RPC430	87,33±9,29 ^{ab}	37±8,89 ^{ab}	114±37,24 ^{ab}	29±12,53 ^{abcd}	44±10,66 ^{abc}	37,33±11,93 ^{abc}
RPC431	52,33±17,9 ^{bcd}	37,33±8,5 ^{ab}	75,33±21,73 ^{ab}	28±6 ^{abcd}	52,33±14,57^a	31±17,7 ^{abc}
RPC504	77,33±32,56 ^{abc}	42±19,47 ^{ab}	104,33±42,62 ^{ab}	18,33±12,74 ^{cd}	44,33±17,95 ^{ab}	33±7,4 ^{abc}
RPC508	83,67±20,84 ^{abc}	36,33±6,66 ^{ab}	82,33±40,55 ^{ab}	15±4,58 ^d	31±16,09 ^{abcd}	28±13,86 ^{abc}
RPC509	64±15,72 ^{abcd}	43,67±23,46 ^{ab}	86,67±21,22 ^{ab}	39±16,64 ^{ab}	45,67±11,36 ^{ab}	45,67±11,22 ^{abc}
RPC516	67,67±7,23 ^{abcd}	38±15,62 ^{ab}	80,67±9,5 ^{ab}	26±11,36 ^{abcd}	31,33±10,21 ^{abcd}	21,67±8,62 ^{bc}
RPC517	57±5,57 ^{abcd}	34,67±19,76 ^{ab}	107,67±42,55 ^{ab}	34,67±4,04 ^{abc}	35,33±13,65 ^{abcd}	48,67±9,71 ^{abc}
Témoin azoté	52±11,53 ^{cd}	38,33±22,37 ^{ab}	85±48,14 ^{ab}	12,33±3,21 ^d	17±6,08 ^{cd}	25,5±7,68 ^{abc}
Témoin zéro	36,33±22,23 ^d	22±10,15 ^b	55±23,39 ^b	13,67±0,58 ^d	15±6,24 ^d	18,33±12,1 ^c
Moyenne	64,77±22,51	39,02±13,22	85,71±40,27	24,76±11,21	34,45±11,76	36,89±12,41
Probabilité	0,021	0,010	0,007	0,016	0,045	0,005
CV (%)	34,76	33,91	33,37	48,92	48,36	55,32

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre sont significativement identiques au seuil de 5 % selon le test de LSD de Fisher

1.3.2. Effet des rhizobia locaux sur le rendement en gousses des accessions

L'inoculation a influencé significativement ($P \leq 0,05$) le rendement en gousses du haricot à l'hectare sur les deux sites. L'effet des bactéries utilisées a varié en fonction de l'accession et du lieu de l'expérimentation (Tableau XXIX).

Le rendement en gousses de HARI17/GHA19 a été amélioré par les rhizobia testés comparé au témoin non fertilisé à la Station Coton. Sur ce site, ce sont les isolats RPC208 (3,19 t/ha) et RPC218 (3,3 t/ha) qui ont induit les rendements les plus élevés parmi les rhizobia locaux testés. Ces rendements sont supérieurs à ceux obtenus avec le témoin fertilisé à l'engrais chimique de formulation 12-22-22 (2,68 t/ha). Sur la parcelle non traitée (témoin négatif ou zéro), le rendement a été de 1,98 t/ha. Le rendement de l'accession HARI11/GHA18 a varié de 0,67 t/ha à 1,73 t/ha sur ce même site et a plus été amélioré par RPC208. Ce rendement a été supérieur à celui induit par le témoin fertilisé à l'engrais chimique de formulation 12-22-22 (1,18 t/ha).

Au niveau du site de la station CV, le rendement obtenu avec HARI17/GHA19 sur la parcelle témoin non fertilisé a été de 0,3 t/ha. Le rendement de cette accession a plus été amélioré avec les rhizobia RPC208 et RPC516 avec 2,37 et 2,36 t/ha respectivement. Les rendements induits par ces bactéries ont été supérieurs à ceux obtenus avec l'engrais de synthèse NPK (0,52 t/ha) sur ce site. Les rendements les plus élevés ont été obtenus avec RPC404 et RPC430 avec une production de 2,47 et 2,31 t/ha respectivement chez l'accession HARI11/GHA18. Ces bactéries ont induit des rendements supérieurs à celui de l'engrais de synthèse NPK (0,8 t/ha).

Sur l'ensemble des sites, l'isolat RPC109 inoculé à HARI35/GHA19 a induit les rendements en gousses les plus élevés. Le rendement induit par cette bactérie à la Station Coton a été 3,7 t/ha, contre 1,5 t/ha pour le témoin absolu et de 2,14 t/ha pour le témoin fertilisé à l'engrais chimique de formulation 12-22-22 à la Station Coton. A la Station CV, le rendement en gousses le plus élevé a été de 2,49 t/ha. Ce rendement a été supérieur à ceux du témoin absolu (0,43 t/ha) et du témoin fertilisé à l'engrais chimique de formulation 12-22-22 (0,77 t/ha).

Tableau XXIX : effet des rhizobia locaux sur le rendement en gousses chez trois accessions de haricot sec

Isolats	Rendement en gousses (t/ha)					
	Station Coton			Station CV		
	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19
RPC108	2,61±0,94 ^{ab}	1,35±0,28 ^{ab}	2,46±0,84 ^{bcd}	1,5±0,13 ^{cde}	1,28±0,33 ^{cdefg}	0,86±0,2 ^{de}
RPC109	2,55±0,73 ^{ab}	1,39±0,29 ^{ab}	3,72±1,36^a	1,8±0,43 ^{bcd}	1,06±0,13 ^{efgh}	2,49±0,56^a
RPC114	3,03±0,78 ^{ab}	1,18±0,59 ^{abc}	3,03±0,24 ^{abc}	1,93±0,14 ^{abc}	1,55±0,09 ^{bc}	1,73±0,43 ^b
RPC115	2,29±0,51 ^{ab}	1,41±0,5 ^{ab}	2,47±0,73 ^{bcd}	1,88±0,2 ^{bc}	1,46±0,2 ^{bcd}	1,46±0,44 ^{bc}
RPC204	2,85±0,55 ^{ab}	1,02±0,28 ^{bc}	2,19±0,33 ^{cd}	1,42±0,36 ^{de}	0,66±0,05 ⁱ	0,72±0,09 ^{de}
RPC208	3,19±1,31^a	1,73±0,9 ^a	3,43±0,67 ^{ab}	2,37±0,45^a	1,71±0,08 ^b	1,5±0,25 ^{bc}
RPC218	3,3±0,67 ^a	1,28±0,35 ^{abc}	2,81±0,47 ^{abc}	0,72±0,28 ^{fgh}	1,03±0,12 ^{fgh}	0,63±0,2 ^{de}
RPC304	2,61±0,64 ^{ab}	1,35±0,21 ^{ab}	2,53±1,07 ^{bcd}	0,76±0,14 ^{fg}	1,71±0,11 ^b	0,73±0,25 ^{de}
RPC404	2,99±0,61 ^{ab}	1,65±0,61 ^{ab}	2,44±0,22 ^{bcd}	0,71±0,12 ^{fgh}	2,47±0,08^a	1,03±0,22 ^{cd}
RPC410	2,9±0,88 ^{ab}	1,42±0,39 ^{ab}	2,66±0,49 ^{abc}	0,92±0,05 ^{fg}	1,62±0,29 ^{bc}	1,78±0,35 ^b
RPC422	2,94±0,4 ^{ab}	1,21±0,26 ^{abc}	2,25±0,39 ^{cd}	0,72±0,02 ^{fgh}	0,98±0,25 ^{ghi}	0,74±0,15 ^{de}
RPC424	2,64±0,85 ^{ab}	1,3±0,36 ^{abc}	2,73±0,16 ^{abc}	0,91±0,21 ^{fg}	1,33±0,39 ^{cdefg}	0,53±0,18 ^e
RPC426	2,95±0,75 ^{ab}	1,26±0,3 ^{abc}	2,65±0,59 ^{abc}	1,73±0,21 ^{cd}	1,41±0,45 ^{bcd}	1,44±0,17 ^{bc}
RPC430	2,98±0,73 ^{ab}	1,46±0,07 ^{ab}	3,09±0,13 ^{abc}	1,8±0,11 ^{bcd}	2,31±0,3^a	0,89±0,45 ^{de}
RPC431	2,33±0,07 ^{ab}	1,27±0,2 ^{abc}	2,3±0,71 ^{cd}	0,97±0,1 ^{fg}	1,47±0,4 ^{bcd}	0,81±0,51 ^{de}
RPC504	2,29±0,44 ^{ab}	1,15±0,19 ^{abc}	2,04±1,13 ^{cd}	1,88±0,24 ^{bc}	1,04±0,11 ^{efgh}	1,78±0,3 ^b
RPC508	2,5±1,02 ^{ab}	1,28±0,3 ^{abc}	2,37±0,42 ^{bcd}	1,13±0,14 ^{ef}	1,65±0,16 ^{bc}	0,69±0,23 ^{de}
RPC509	3,02±0,3 ^{ab}	1,6±0,26 ^{ab}	2,35±0,22 ^{bcd}	1,91±0,56 ^{bc}	1,4±0,24 ^{bcd}	0,65±0,15 ^{de}
RPC516	2,46±0,43 ^{ab}	1,11±0,39 ^{abc}	2,86±1,29 ^{abc}	2,36±0,62^a	0,87±0,25 ^{hi}	0,78±0,07 ^{de}
RPC517	2,57±0,25 ^{ab}	1,19±0,15 ^{abc}	2,28±0,44 ^{cd}	2,19±0,12 ^{ab}	1,11±0,09 ^{defgh}	1,57±0,16 ^b
Témoin azoté	2,68±0,67 ^{ab}	1,18±0,66 ^{abc}	2,14±0,23 ^{cd}	0,52±0,13 ^{gh}	0,8±0,06 ^{hi}	0,77±0,21 ^{de}
Témoin zéro	1,98±0,27 ^b	0,67±0,19 ^c	1,5±0,23 ^d	0,3±0,15 ^h	0,63±0,06 ⁱ	0,43±0,12 ^e
Moyenne	2,71±0,65	1,29±0,4	2,56±0,73	1,38±0,66	1,34±0,5	1,09±0,58
Probabilité	0,008	0,046	0,010	0,001	0,001	< 0,001
CV (%)	24,1	30,63	28,41	47,91	37,33	53,17

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre sont significativement identiques au seuil de 5 % selon le test de LSD de Fisher

1.3.3. Effet des rhizobia locaux sur le rendement en graines du haricot

L'ensemble des bactéries testées a influencé significativement ($P \leq 0,05$) le rendement en graines à l'hectare par rapport au témoin absolu. De plus, l'effet des bactéries testées sur ce paramètre a varié selon les sites d'expérimentation et l'accession de haricot (Tableau XXX).

Le rendement en graines de HARI17/GHA19 a été amélioré par les rhizobia testés comparé au témoin non fertilisé sur la Station Coton. Les isolats RPC114, RPC208, RPC218, RPC404, RPC410, RPC422 et RPC509 ont induit les rendements les plus élevés. Ces rendements ont varié de 2,31 à 2,56 t/ha. Ils ont été supérieurs à celui obtenu avec l'engrais chimique NPK de formulation 12 22 22 (2 t/ha). Sur la parcelle non traitée de ce site, le rendement a été de 1,44 t/ha. Pour l'accession HARI11/GHA18, le rendement a plus été amélioré avec les rhizobia RPC109, RPC115, RPC208, RPC404, RPC410, RPC430 et RPC509 avec une production allant de 1,06 à 1,3 t/ha. Les rendements induits par ces bactéries sur ce site ont été supérieurs à ceux obtenus avec le témoin fertilisé à l'engrais chimique de formulation 12-22-22 (0,88 t/ha) et le témoin non traité (0,51 t/ha).

A la Station CV, le rendement le plus élevé (2,12 t/ha) de HARI17/GHA19 a été induit par RPC208. Les rendements ont été de 0,17 t/ha pour le témoin non fertilisé et de 0,33 t/ha pour l'engrais de synthèse NPK sur ce même site. Ce sont les isolats RPC404 et RPC430 qui ont le plus amélioré le rendement de HARI11/GHA18 à la Station CV avec une production de 2,07 et 1,74 t/ha respectivement. Les rendements induits par ces bactéries ont été significativement supérieurs à ceux du témoin non fertilisé (0,42 t/ha) et du témoin fertilisé à l'engrais chimique de formulation 12-22-22 (0,58 t/ha).

Le rendement à l'hectare de l'accession HARI35/GHA19 sur les deux (02) sites ont été le plus amélioré par l'isolat RPC109. Les rendements obtenus avec cet isolat ont été de 2,69 t/ha à la Station Coton et de 1,91 t/ha à la station CV. Sur ces sites, cette bactérie a plus augmenté ce paramètre plus que le témoin fertilisé.

Tableau XXX : effet des rhizobia locaux sur le rendement en graines chez trois accessions de haricot sec

Isolats	Rendement en graines (t/ha)					
	Station Coton			Station CV		
	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19	HARI17/GHA19	HARI11/GHA18	HARI35/GHA19
RPC108	1,91±0,67 ^{ab}	0,96±0,2 ^{ab}	1,67±0,36 ^{bcd}	1,08±0,1 ^{efg}	0,89±0,37 ^{def}	0,61±0,09 ^{de}
RPC109	2±0,58 ^{ab}	1,08±0,32^a	2,69±1,15^a	1,5±0,24 ^{cde}	0,76±0,11 ^{defg}	1,91±0,53^a
RPC114	2,31±0,47^a	0,84±0,5 ^{ab}	2,26±0,17 ^{abc}	1,54±0,19 ^{bcd}	1,24±0,1 ^{bc}	1,34±0,28 ^b
RPC115	1,94±0,37 ^{ab}	1,07±0,4^a	1,99±0,71 ^{abcd}	1,51±0,29 ^{cde}	1,08±0,12 ^{bc}	1,09±0,44 ^{bc}
RPC204	2,15±0,39 ^{ab}	0,81±0,26 ^{ab}	1,56±0,25 ^{bcd}	1,16±0,34 ^{def}	0,46±0,04 ^{gh}	0,54±0,05 ^e
RPC208	2,47±1^a	1,15±0,7^a	2,28±0,59 ^{abc}	2,12±0,46^a	1,34±0,11 ^b	1,21±0,22 ^b
RPC218	2,56±0,58^a	0,94±0,37 ^{ab}	2,19±0,35 ^{abcd}	0,58±0,3 ^{hij}	0,78±0,1 ^{defg}	0,42±0,16 ^e
RPC304	2,06±0,49 ^{ab}	0,93±0,24 ^{ab}	1,98±1,06 ^{abcd}	0,53±0,16 ^{hij}	1,28±0,09 ^{bc}	0,48±0,19 ^e
RPC404	2,43±0,22^a	1,3±0,38^a	1,98±0,2 ^{abcd}	0,53±0,08 ^{hij}	2,05±0,22^a	0,74±0,27 ^{cde}
RPC410	2,31±0,71^a	1,05±0,32^a	2,05±0,31 ^{abcd}	0,62±0,06 ^{hi}	1,26±0,11 ^{bc}	1,34±0,28 ^b
RPC422	2,31±0,41^a	0,88±0,3 ^{ab}	1,74±0,46 ^{bcd}	0,56±0,01 ^{hij}	0,71±0,18 ^{efgh}	0,55±0,17 ^e
RPC424	2,07±0,55 ^{ab}	0,89±0,26 ^{ab}	2,03±0,22 ^{abcd}	0,61±0,25 ^{hi}	0,9±0,42 ^{def}	0,38±0,16 ^e
RPC426	2,24±0,66 ^{ab}	0,95±0,18 ^{ab}	2,05±0,34 ^{abcd}	1,32±0,08 ^{de}	0,97±0,24 ^{cde}	1,02±0,25 ^{bcd}
RPC430	2,31±0,53^a	1,06±0,05^a	2,15±0,11 ^{abcd}	1,46±0,14 ^{cde}	1,74±0,38^a	0,61±0,35 ^{de}
RPC431	1,77±0,05 ^{ab}	1,03±0,03 ^{ab}	1,74±0,49 ^{bcd}	0,73±0,07 ^{ghi}	1,04±0,31 ^{bc}	0,56±0,33 ^e
RPC504	1,79±0,32 ^{ab}	0,76±0,04 ^{ab}	1,36±0,79 ^{cd}	1,53±0,23 ^{bcd}	0,73±0,06 ^{efgh}	1,38±0,33 ^b
RPC508	2±0,74 ^{ab}	0,94±0,43 ^{ab}	1,85±0,35 ^{abcd}	0,81±0,1 ^{fgh}	1,31±0,2 ^b	0,42±0,13 ^e
RPC509	2,39±0,17^a	1,19±0,26^a	1,71±0,19 ^{bcd}	1,33±0,31 ^{de}	0,97±0,04 ^{cde}	0,49±0,06 ^e
RPC516	1,89±0,29 ^{ab}	0,78±0,23 ^{ab}	2,34±1,15 ^{ab}	1,96±0,76 ^{ab}	0,62±0,23 ^{fgh}	0,55±0,07 ^e
RPC517	2,05±0,29 ^{ab}	0,86±0,16 ^{ab}	1,82±0,45 ^{abcd}	1,8±0,23 ^{abc}	0,79±0,13 ^{def}	1,27±0,15 ^b
Témoin azoté	2±0,51 ^{ab}	0,88±0,52 ^{ab}	1,73±0,18 ^{bcd}	0,33±0,03 ^{ij}	0,58±0,05 ^{fgh}	0,58±0,28 ^e
Témoin zéro	1,44±0,24 ^b	0,51±0,08 ^b	1,28±0,52 ^d	0,17±0,06 ^{ij}	0,42±0,06 ^h	0,33±0,08 ^e
Moyenne	2,11±0,49	0,95±0,32	1,93±0,57	1,08±0,59	1±0,42	0,81±0,47
Probabilité	0,006	0,031	0,046	< 0,001	0,030	0,020
CV (%)	23,61	33,37	29,35	54,71	42,94	58,49

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre sont significativement identiques au seuil de 5 % selon le test de LSD de Fisher

2. DISCUSSION

L'utilisation d'inoculum bactérien pour accroître la production de légumineuses est une pratique exploitée depuis des décennies comme un moyen respectueux de l'environnement. Cette pratique vise à fournir au légumineuses l'azote dont elles ont besoin. Cependant, le succès de cette technologie dépend du choix des bactéries pour leur permettre d'exprimer leur potentialité. Ainsi, l'efficacité de 20 rhizobia locaux présélectionnés pour leur infectivité et leur efficience en conditions contrôlées a été testée en plein champ. Les tests ont montré que les rhizobia locaux testés ont été capables d'améliorer significativement les différents paramètres végétatifs étudiés. En effet, le diamètre au collet, la hauteur ainsi que la biomasse des plants ont été influencés significativement par les bactéries testées sur les deux (02) sites. Toutefois, la plupart des plants les plus vigoureux ont été observés sur les parcelles fertilisés à l'engrais de synthèse pour ces différents paramètres. L'effet favorable de la fertilisation azotée sur le développement végétatif s'expliquerait par la présence d'azote directement assimilable qu'elle contient. Cette assimilation aurait favorisé une croissance rapide des plants de haricot commun. Par contre, les plants inoculés sembleraient capter l'azote fixé par les rhizobia progressivement tout au long de leur cycle pour assurer leur croissance. L'amélioration des paramètres végétatifs du haricot par l'engrais chimique par rapport aux inocula a également été observée par Sousa *et al.* (2022) dans une étude sur l'inoculation du haricot sec.

Des nodules ont été observés sur les plants des parcelles témoins non inoculés sur les différents sites d'essai. Cela dénote la présence naturelle d'une population rhizobiale locale dans le sol. Cette idée est soutenue par Horacio *et al.*, (2023) qui affirment que le haricot développe des nodules racinaires même en l'absence d'inoculation. Cependant, l'apport d'engrais azoté a entraîné une réduction de la nodulation des plants fertilisés par rapport aux plants du témoin non fertilisé. Sur l'ensemble des sites, le nombre de nodules observé chez les témoins fertilisés a été inférieur à celui des témoins absolus. Cette réduction de nodulation prouve la sensibilité du processus de la fixation biologique d'azote *vis à vis* de la disponibilité de l'azote dans le sol. De ce fait, les taux élevés d'azote dans un sol donné pourraient réduire la nodulation des légumineuses en supprimant

l'expression de caractéristiques associées à la fixation biologique d'azote comme la nitrogénase (Reinprecht *et al.*, 2020).

L'ensemble des bactéries apporté par inoculation a augmenté les paramètres de nodulation des plants (nombre et masse sèche des nodules par plante) par rapport aux traitements témoins quel que soit le site de culture. Ce résultat démontre que le niveau d'infection des bactéries contenues dans les inocula a été supérieur à celui des rhizobia naturels des sols de l'expérimentation. Selon Ouma *et al.* (2016), l'utilisation des rhizobia locaux comme inoculants serait plus bénéfique pour le haricot sec car mieux adaptés aux conditions pédoclimatiques locales. De plus, l'augmentation de la nodulation du haricot sec favorise une plus grande efficacité de la fixation biologique, car l'apport d'azote requis par la légumineuse est, en partie, fourni par l'inoculation (Hungria *et al.*, 2013).

Concernant les paramètres de rendement, l'inoculation a augmenté le poids des gousses par plant des différentes accessions en comparaison aux témoins sur tous les sites de l'étude. Les résultats actuels concordent avec ceux de Samago *et al.* (2018) et Razafintsalama *et al.* (2022) qui ont mis en évidence les effets positifs de l'inoculation sur la production du haricot sec. Le poids de gousses obtenu avec les inoculants appliqués peut être attribué à une accumulation de substrats provoqué par la fixation symbiotique de l'azote. Le rendement à l'hectare des différentes accessions de haricot a été significativement influencé par l'inoculation. Patra *et al.* (2012) étaient parvenus à des résultats similaire avec l'accession de haricot sec PK- 416 en Inde. L'augmentation du rendement en graines suite à l'inoculation peut être tributaire de l'augmentation de l'azote qui est disponible pour les plantes *via* la fixation biologique. Les résultats sont en accord avec ceux de Sajid *et al.* (2011) qui sont parvenus à la conclusion que les traitements avec inoculation de rhizobium généraient une production de grains plus élevée que ceux des traitements non inoculés.

Les rendements en gousses et en graines les plus élevés chez HARI35/GHA19 ont été induits par l'isolat RPC109 sur les deux sites. Le même constat a été fait chez HARI17/GHA19 avec RPC208 sur le rendement en graines. Ces résultats traduisent la présence d'une spécificité des isolats locaux de rhizobia pour ces deux (02) accessions de

haricot sec qui ne dépend pas du site de culture. L'existence d'une spécificité entre le rhizobia et le haricot sec a déjà été rapportées par Neila *et al.* (2014) ainsi que Argaw & Muleta (2017). Selon eux, cette spécificité pourrait être due à la présence d'un échange de signaux chimiques spécifique entre les deux partenaires.

Les résultats obtenus avec l'inoculation des rhizobia ont été supérieurs aux traitements témoins quel que soit l'accession et le site de culture. Cette observation indique la capacité des souches bactériennes à favoriser la croissance et les performances productives du haricot sec. De nombreuses études ont mis en évidence les effets positifs de la symbiose rhizobienne sur les légumineuses (Fernandes de Brito *et al.*, 2015 ; Moretti *et al.*, 2018). Selon Horácio *et al.*, (2023), l'une des raisons de l'impact bénéfique de l'inoculation serait l'efficacité du taux de colonisation de la souche utilisée et la spécificité symbiotique entre la plante hôte et le rhizobium. En ce qui concerne les paramètres de nodulation, les meilleures performances ont été obtenus à la station CV. Cette différence de performance pourrait être liée à la compétitivité de la population endogène de rhizobium par rapport aux isolats inoculés mais aussi à la différence de fertilité entre les sols des Station Coton et CV. Le sol de la station CV s'est révélé moins fertile que celui de la station coton. Les travaux de Bakhoun *et al.* (2016) ont montré que la nodulation est plus élevée dans les sols moins fertiles.

Au cours de cette étude, les plants ayant présentés les paramètres végétatifs et de nodulation les plus élevés ont été observés chez HARI35/GHA19 tandis ceux des paramètres de rendement ont été observés chez HARI17/GHA19. Ce résultat pourrait être attribué à une différence de caractères génétiques entre les accessions de haricot sec conditionnant une accession à mieux produire tout en induisant une faible nodulation. En effet, le rendement élevé observé chez HARI17/GHA19 pourrait être dû au poids de ses graines qui est supérieure à celle des autres accessions de haricot sec testées. La caractérisation agromorphologique a montré que le poids de 100 graines de HARI17/GHA19 étaient de 29,8 g contre 20g pour HARI35/GHA19. La différence de rendement des accessions de cette étude est similaire à l'observation de Tsai *et al.* (1993) qui ont découvert que la variété de haricot Mexico-309 était supérieur pour les paramètres

de nodulation mais médiocre pour le rendement en graines, tandis que la variété Preto Caruaru produisait un rendement en graines élevé, mais était inférieur en termes de caractères de nodulation.

Conclusion partielle

Les rhizobia locaux évalués ont été capables d'améliorer significativement les différents paramètres végétatifs, de nodulation et de rendement chez les accessions de haricot étudiées. Le diamètre au collet, la hauteur ainsi que la biomasse des plants ont été influencés significativement par les bactéries testées sur tous les sites. Toutefois, la plupart des plants les plus vigoureux ont été observés sur les parcelles fertilisées à l'engrais de synthèse NPK de formulation 12-22-22. L'apport d'engrais azoté a entraîné une réduction de la nodulation des plants fertilisés par rapport aux plants du témoin absolu. Concernant les rendements en gousses, les plus importants chez HARI17/GHA19 sur les deux sites (3,19 t/ha pour la Station Coton et 2,37 t/ha pour la Station CV) ont été induits par RPC208. Le même constat a été fait chez HARI35/GHA19 (3,7 t/ha à la Station Coton et 2,49 t/ha à la Station CV) avec RPC109. A l'issue de la présente étude, les rhizobia locaux RPC109, RPC114, RPC115, RPC208, RPC304, RPC404, RPC410, RPC430, RPC431 et RPC509 se sont avérés les plus performants pour améliorer la production du haricot sec. La diversité génétique de ces isolats a été déterminée et a été présentée dans le chapitre 4 de cette étude.

CHAPITRE 4 : DIVERSITE DES RHIZOBIA LOCAUX NODULANT LE HARICOT

Bien que de nombreuses recherches aient été menées sur les rhizobia associés au haricot sec, il existe peu de données sur leur diversité en Côte d'Ivoire (CI). Dans ce chapitre, les résultats de l'étude de la diversité spécifique des bactéries nodulant le haricot sec dans les sols de la CI ont été exposés.

1. RESULTATS

1.1. Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S par PCR

L'amplification de l'ARNr 16S des 10 bactéries isolées des nodules du haricot sec (*Phaseolus vulgaris* L.) a généré, sur gel d'agarose, une seule bande d'ADN d'environ 1500 pb (Figure 22).

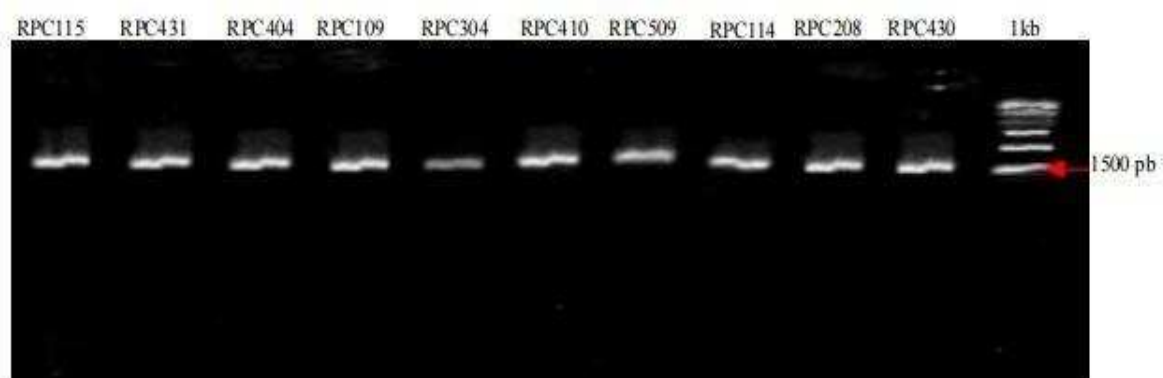


Figure 22 : image d'électrophorèse sur gel du gène de l'ARNr 16S amplifié de 10 isolats

1.2. Affiliation des séquences de gènes d'ARNr 16S des isolats bactériens

L'analyse des séquences d'ARNr 16S des isolats dans cette étude a montré qu'ils s'identifient à plusieurs espèces de bactéries (Tableau XXXI). Ainsi, l'isolat RPC109 provenant de la localité de Djébonoua a partagé une similarité de 99,47 % avec l'espèce *Allorhizobium taibaishanense* dont le numéro d'accèsion est MG851723.1. L'isolat RPC115 provenant de la localité de Gagnoa s'est rapproché de l'espèce *Rhizobium tropici* dont la séquence est accessible au numéro MG852217.1 avec un pourcentage d'identité de 99,29 %. Les rhizobia RPC114, RPC208, RPC410 et RPC509 isolés des sols

de la localité de Ferkéssédougou se sont identifiés respectivement à l'espèce *Rhizobium pusense* (MW513398.1 ; 97,80 %), *Rhizobium* sp. (KT387838.1 ; 95,27 %), *Rhizobium leguminosarum* (KY940047.1 ; 96,40 %) et *Sinorhizobium* sp. (EF173322.1 ; 83,03 %). L'isolat RPC430 de la localité de Yamoussoukro s'est aligné à l'espèce *Bradyrhizobium japonicum* (KY940048.1) à 96,46 % d'identité et à l'espèce *Rhizobium leguminosarum* (KY940047.1) à 96,39 % d'identité.

Quant à l'isolat RPC431, il s'est identifié à l'espèce *Rhizobium phaseoli* (KF638348.1) avec un taux de similarité de 98,10 %. Les deux isolats RPC304 et RPC404 de la localité de Botro se sont identifiés à l'espèce *Allorhizobium taibaishanense* (MG851723.1) avec respectivement des pourcentages d'identité de 97,71 et 99,65 %.

L'analyse des séquences d'ARN 16S des isolats a permis de mettre en évidence une diversité dans ce pool bactérien composé de quatre (04) genres bactériens à savoir *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium* et *Sinorhizobium*. Le profil de cette diversité est dominé par le genre *Rhizobium* représentant à lui seul 50 % des genres bactériens identifiés dans cette étude, suivi du genre *Allorhizobium* avec une fréquence de 30 % (Figure 21). Les genres *Bradyrhizobium* et *Sinorhizobium* sont les moins représentés avec une fréquence de 10 % (Figure 23). Dans le genre *Rhizobium* on retrouve les espèces telles que *Rhizobium pusense*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli* et *Rhizobium tropici*.

L'analyse phylogénique a permis d'identifier cinq (05) groupes bactériens. Dans ces groupes, les dix isolats de l'étude ont été étroitement liées aux souches de références de *rhizobia* de la GenBank à l'exception de RPC509 (Figure 24). Ainsi dans le groupe I, l'isolat RPC114 est lié à la souche de référence *Rhizobium pusense*. Le groupe II est composé des isolats RPC208 et RPC431 étroitement liés aux souches de références *Rhizobium* sp et *Rhizobium phaseoli* respectivement. Dans le groupe III, une relation phylogénétique est observée entre les isolats RPC410 et RPC430 avec les souches de références *Rhizobium leguminosarum* et *Bradyrhizobium japonicum*.

Les isolats RPC109, RPC304 et RPC404 ont été consignés dans le groupe IV avec une

similarité de séquence de 97,71 et 99,65 % à la souche *Allorhizobium taibaishanense*. Enfin le groupe V comprend l'isolat RPC115 étroitement lié à la souche de référence *Rhizobium tropici*.

Tableau XXXI : caractéristiques des séquences codantes de la région 16S des souches

Isolats	Site de collecte	Longueur de la séquence (pb)	Organisme de référence	Numéro d'accension	Longueur d'accension	Pourcentage d'identité	E-Valeur
RPC109	Djébonoua	1174	<i>Allorhizobium taibaishanense</i>	MG851723.1	568	99,47%	0,0
RPC114	Ferkéssédougou	1222	<i>Rhizobium pusense</i>	MW513398.1	1299	97,80%	0,0
RPC115	Gagnoa	1198	<i>Rhizobium tropici</i>	MG851722.1	567	99,29%	0,0
RPC208	Ferkéssédougou	1191	<i>Rhizobium</i> sp.	KT387838.1	1401	95,27%	0,0
RPC304	Botro	1226	<i>Allorhizobium taibaishanense</i>	MG851723.1	568	97,71%	0,0
RPC404	Botro	1173	<i>Allorhizobium taibaishanense</i>	MG851723.1	568	99,65%	0,0
RPC410	Ferkéssédougou	1197	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	KY940047.1	844	96,40%	0,0
RPC430	Yamoussoukro	1306	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	KY940048.1	832	96,46%	0,0
RPC431	Yamoussoukro	1222	<i>Rhizobium phaseoli</i>	KF638348.1	1495	98,10%	0,0
RPC509	Ferkéssédougou	1250	<i>Sinorhizobium</i> sp.	EF173322.1	1464	83,03%	2.10 ⁻³²

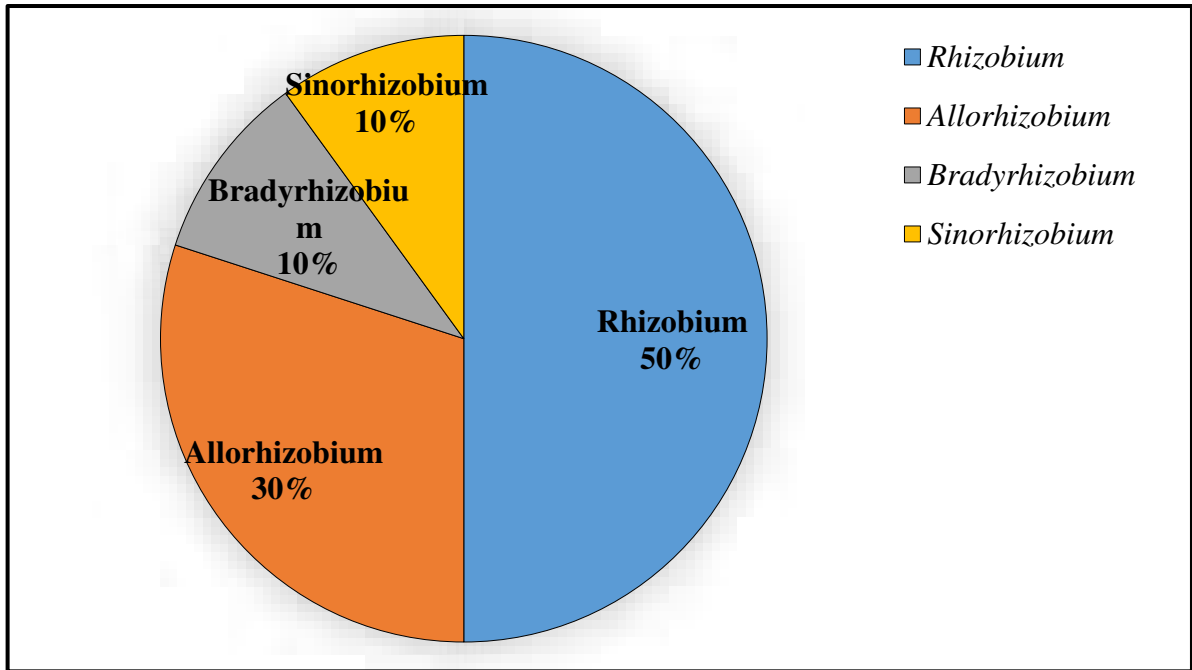


Figure 23 : distribution des genres de *rhizobia* nodulant le haricot sec

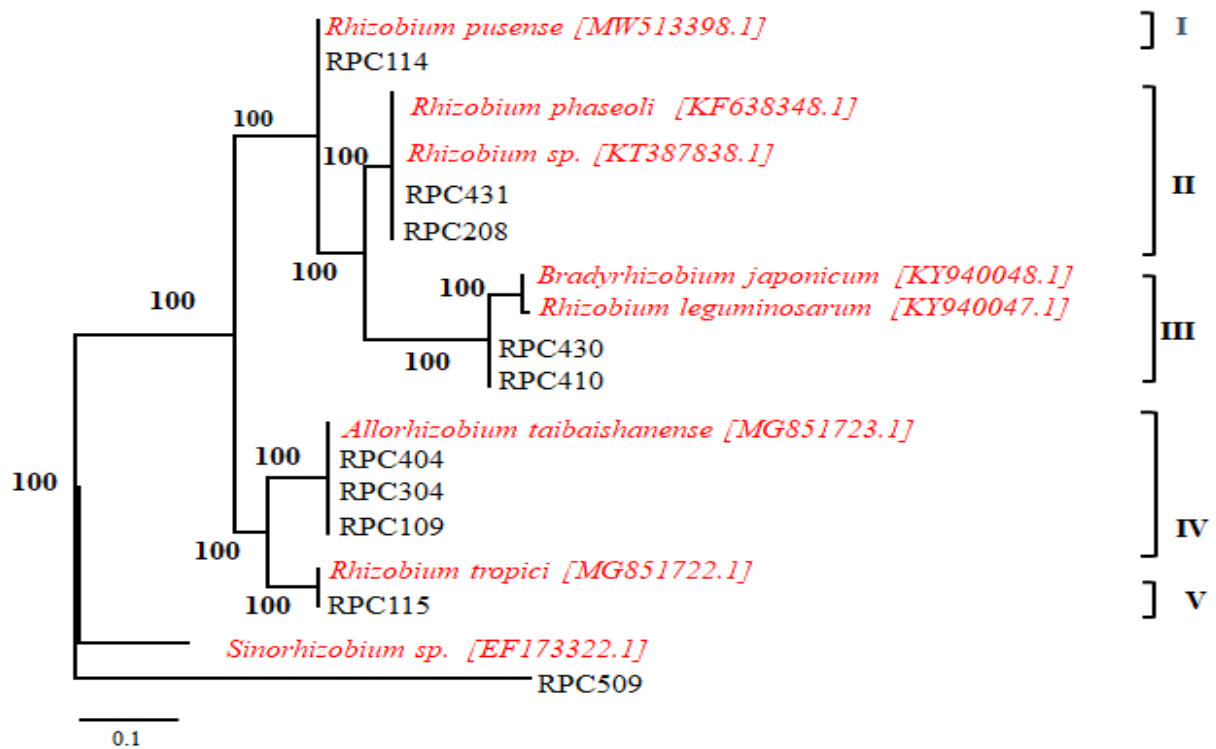


Figure 24 : arbre phylogénétique déduit des séquences du gène de l'ADNr 16S des *rhizobia* isolés du haricot

Les *rhizobia* locaux isolés du haricot sont marqués en gras par rapport aux souches de référence de différentes espèces de *rhizobia*.

2. DISCUSSION

L'amplification des séquences génétiques partielles de l'ARNr 16S des isolats à l'aide d'amorces spécifiques a généré un amplicon d'environ 1 500 paires de bases. Il s'agit généralement de la taille approximative du fragment de ce gène cible qui est couramment utilisée pour l'identification bactérienne (Fossou *et al.*, 2012).

L'analyse des séquences de l'ARNr 16S des isolats provenant des différentes régions agroécologiques de la Côte d'Ivoire a montré que les bactéries symbiotiques du haricot sec sont très diverses. Le profil de cette diversité est dominé par les espèces appartenant au genre *Rhizobium*. Plusieurs auteurs ont montré également que les bactéries symbiotes isolées des nodules de *P. vulgaris* appartiennent principalement au genre *Rhizobium* (Zinga *et al.*, 2017 ; Mwenda *et al.*, 2018 ; Huo *et al.*, 2019 ; Shamseldin & Velázquez, 2020). Ceci en raison du fait que contrairement aux autres espèces de *Phaseolus* qui s'associent à *Bradyrhizobium*, le haricot sec manifeste une nette préférence pour le genre *Rhizobium* (Aguilar *et al.*, 2022).

Quatre (04) espèces de bactéries ont été identifiées dans le genre *Rhizobium* dont *Rhizobium pusense*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli* et *Rhizobium tropici*. Ces espèces ont déjà été isolées de nodules de haricots communs par Gunnabo *et al.* (2021) en Ethiopie ; Torrez-Gutiérrez *et al.* (2021) en Equateur et par Gunununu *et al.* (2023) en Eswatini. Ces espèces sont considérées comme étant les espèces prédominantes isolées des nodules du haricot dans la région andine (zone intertropicale d'Amérique comprenant la Colombie, le Venezuela, l'Equateur, le Pérou, la Bolivie, l'Argentine...), leur aire d'origine (Gunnabo *et al.*, 2021 ; Young *et al.*, 2021). La propagation des microsymbiotes de *P. vulgaris* sur d'autres continents aurait été faite grâce à ses graines (Gunununu *et al.*, 2023) et suggérerait son possible mode de migration dans ses centres de diversification américains (Aguilar *et al.*, 2022), européens (Herrera-Cervera *et al.*, 1999), africains (Gunnabo *et al.*, 2021 ; Zinga *et al.*, 2017) et asiatique (Cao *et al.*, 2014).

Cette étude a également révélé qu'en plus du genre *Rhizobium*, il existe d'autres genres bactériens phylogénétiquement liés qui pourraient noduler le haricot sec. En effet, l'étude a notifié la présence d'espèces appartenant aux genres *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium* et *Sinorhizobium*. La présence de ces différents genres indique une forte promiscuité de nodulation de *P. vulgaris* avec diverses bactéries fixatrices d'azote dans les sols de Côte d'Ivoire. Ce résultat corrobore les études faites par Shamseldin & Velázquez (2020) qui ont également révélé la promiscuité du haricot sec avec le genre *Rhizobium*.

Tout comme l'espèce *Rhizobium sllae*, mycosymbiote de *Hedysarum coronarium* L., découverte pour la première fois chez le haricot sec par Soares *et al* (2016), *Allorhizobium taibaishanense* serait isolée et identifiée pour la première fois chez cette plante à travers cette étude. *Allorhizobium taibaishanense* est une espèce récemment découverte chez le trèfle du Japon (*Kummerowia stratia*) et décrite par Yao *et al.* (2012). La découverte de cette nouvelle espèce de bactérie chez le haricot sec pourrait s'expliquer par le caractère évolutif des rhizobia due à un transfert de plasmides symbiotiques entre les espèces.

Sur la base des résultats de l'efficacité symbiotique, toutes les souches de rhizobium ont montré un potentiel de nodulation du haricot. Toutefois, la structure phylogénique a montré que ces souches n'étaient pas étroitement apparentées. Cela suggérerait que les souches de rhizobium de l'étude ne sont pas limitées à un groupe phylogénétique.

Conclusion partielle

Les dix (10) isolats analysés ont présenté une bande unique d'un poids moléculaire de 1500 pb. Les bactéries nodulaires du haricot sec ont présenté une grande diversité génétique et se sont affiliées à quatre (04) genres bactériens que sont *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium* et *Sinorhizobium*. Une nouvelle espèce, *Allorhizobium taibaishanense* a été isolée et identifiée pour la première fois chez le haricot sec à travers cette étude. L'arbre phylogénique a montré que ces isolats appartenaient à cinq groupes et étaient étroitement liés aux espèces : *Allorhizobium taibaishanense*, *Rhizobium pusense*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium sp.*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium phaseoli* et *Sinorhizobium sp.*

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette étude a été réalisée avec pour objectif principal d'améliorer la production du haricot sec (*Phaseolus vulgaris* L.) en Côte d'Ivoire. Elle a été conduite avec quatre (04) hypothèses qui stipulent qu'il existerait des variétés de haricot introduites et/ou locales prometteuses. Une diversité de rhizobia locaux adaptée aux conditions environnementales et anthropiques locales établirait une symbiose efficace avec plusieurs accessions de haricot sec. Puis, ces rhizobia locaux amélioreraient la production des différentes accessions de haricot. Enfin, ces bactéries qui colonisent les nodules du haricot sec seraient génétiquement diversifiées. Toutes les hypothèses ont été confirmées au terme de cette étude. En effet, la présence d'une diversité a été observée entre les accessions indépendamment de leur origine géographique. Les accessions de haricot sec : HARI4/BKE18, HARI5/BON18, HARI6/BON18, HARI14/GHA19, HARI22/GHA19, HARI28/GHA19 et HARI35/GHA19 ont présenté des caractéristiques agronomiques prometteuses. Ces accessions se sont caractérisées par des plants de grande taille, riche en matière avec de longue gousses et des graines lourde.

L'étude a également mis en évidence la présence des bactéries symbiotiques du haricot sec dans les sols de la Côte d'Ivoire. Un total de 108 isolats présentant des caractéristiques morphologiques typiques des rhizobia ont été sélectionnés sur l'ensemble des colonies bactériennes issues des sol collectés. Ces isolats ont la capacité de réinfecter leur plante hôte. Toutefois, 20 sur 108 isolats ont été plus efficaces en conditions contrôlées. Par ailleurs, les stress acido-basique, salin et les pesticides ont eu un effet variable sur la croissance de ces bactéries. Seul les quatre isolats RPC108, RPC204, RPC405 et RPC430 ont été plus tolérants *vis-à-vis* de ces différents stress.

Les rhizobia locaux évalués ont été capables d'améliorer significativement les différents paramètres végétatifs, de nodulation et de rendement étudiés sur les différents sites. En outre, ce sont les rhizobia locaux RPC109, RPC114, RPC115, RPC208, RPC304, RPC404, RPC410, RPC430, RPC431 et RPC509 qui se sont avérés être les plus performants pour améliorer la production du haricot sec à l'issu de l'évaluation en condition de champ.

Les séquences du gène de l'ARNr 16S des dix (10) isolats performants identifiés ont été étroitement affiliées aux espèces *Allorhizobium taibaishanense*, *Rhizobium pusense*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium* sp., *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium phaseoli* et *Sinorhizobium* sp. démontrant la présence d'une diversité des bactéries natives noduleuses de haricot. Ces bactéries sont adaptées aux conditions environnementales locales et performantes sur le plan agronomique. Elles pourraient donc être utilisées pour améliorer la

production du haricot sec et aider à promouvoir cette culture. Cependant, des investigations futures pourront être menées afin d'optimiser les résultats de cette étude. Il s'agira de :

- confirmer les performances des accessions de haricot sec à travers des tests multilocaux en milieux paysan ;
- évaluer la performance des nouvelles bactéries dont *Allorhizobium taibaishanense*, *Bradyrhizobium japonicum* et *Sinorhizobium sp.* sur la nodulation du haricot commun ;
- confirmer les performances des bactéries sélectionnées dans différentes zones agro-écologiques.

REFERENCES

- Abid G., Silue S., Muhovski Y., Jacquemin J.M., Toussaint A & Baudoin JP. (2009). Role of myo-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development. *Gene*, 439 : 1-10.
- Aguilar O.M., Collavino M.M. & Mancini U. (2022). Nodulation competitiveness and diversification of symbiosis genes in common beans from the American Centers of domestication. *Scientific Reports*, 12 : 1-9.
- Akter Z., Pageni B.B., Lupwayi N.Z. & Balasubramanian P.M. (2013). Biological nitrogen fixation and nifH gene expression in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Canadian Journal of Plant Science*, 94 : 203–212.
- Al Abboud M.A. (2014). Bioimpact of application of pesticides with plant growth hormone (gibberellic acid) on target and non-target microorganisms. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18 : 1005-1010.
- Alemu H. (2017). Review paper on breeding common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) genotypes for acidic soil tolerance. *International Journal of Advanced Research and Publications*, 1 (3) : 39-46.
- Altobelli F., Amanullah B.A., Caon L., Charrondiere R., Glri S.P., Grande F., Muthuraman R.P., Pisante M., Pramari B., Vargas R., Verma D., Vishwakarma A.K., Wiese L. & Xipell M. (2016). Soils and pulses: symbiosis for life. FAO, Rome (Italy) 114p.
- Amani K., Fondio L., Konate I., N’Gbesso M. F. D. P., Maxwell B. G. A., Sanogo T. A. & Filali-Maltouf A. (2020). Response of Indigenous Rhizobia to the Inoculation of Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] Varieties Cultivated under Controlled Conditions in Côte d’Ivoire. *Advance in Microbiology*, 10:110-122.
- Amani M.K., Koffi F.K., Yao B.K., Kouakou B.D., Jean E.P. & Sekouba O. (2010). Analyse de la variabilité climatique et de ses influences sur les régimes pluviométriques saisonniers en Afrique de l’Ouest : cas du bassin versant du N’Zi (Bandama) en Côte d’Ivoire. *Cybergéo. European Journal of Geography*, 513 : 1-15.
- Amarger N., Macheret V. & Laguerre G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 996–1006.
- Andrews M. & Andrews M.E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (4) :1-39.

- Aouni M.E., Mhamdi R., Mars M. & Ghrir R. (1986). Modulation and growth of common bean under NaCl stress. *Soil Biology and Biochemistry*, 301: 473-475.
- Argaw A. & Muleta D. (2017). Effect of genotypes-*Rhizobium* environment interaction on nodulation and productivity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in eastern Ethiopia. *Environmental System Research*, 6 : 1-16.
- Argaw A. (2007). Symbiotic and phenotypic characterization of rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Eastern Ethiopia. Mémoire de Master, Biologie et Microbiologie appliquées, Université d'Addis-Ababa, Addis-Abeba, Ethiopie, 113 p.
- Arora N.K., Tewari S., Singh S., Lal N. & Maheshwari D.K. (2012). PGPR for protection of plant health under saline conditions. (in) *Bacteria in agrobiolgy: Stress management*, Uttarakhand, (India) : pp. 239-258.
- Arrese-Igor C., Esther M.G., Daniel M., Ruben L., Estibaliz L. et Erena G.Q. (2011). Physiological response of legume nodules to drought. *Plant stress*, 5 : 24-31.
- Augagneur M., Brun, Laurent L.E., Mabire L. & Morel E. (2022). Haricot. Collection « Produire des semences en agriculture biologique ». Edition FNAMS/ITAB, Loire-Authion (France) : 6 p.
- Augusto L., Delerue F., Gallet-Budynek A. & Achat D.L. (2013). Global assessment of limitation to symbiotic nitrogen fixation by phosphorus availability in terrestrial ecosystems using a meta-analysis approach: P availability and symbiotic N₂ fixation. *Global Biogeochemical Cycles*, 27 : 804–815.
- Baba Arbi S (2016). Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées *Medicago littoralis* Rhode et *Melilotus indicus* (L.) présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla). Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée, Facultés des Sciences, Université Badji Mokhtar- Annaba, Algérie, 182 p.
- Bag S., Mondal A., Majumder A., Mondal S.K. & Banik A. (2022). Flavonoid mediated selective cross-talk between plants and beneficial soil microbiome. *Phytochemistry Reviews*, 21 : 1739–1760.
- Bakhoun N., Odee D.W., Fall D., Ndoye F., Kane A., Kimiti J.M., Zoubeirou A.M., Sylla S.N., Noba K. & Diouf D. (2016). Senegalia Senegal response to inoculation with rhizobial strains vary in relation to seed provenance and soil type. *Plant Soil*, 398 : 181-193.

- Bano S.A. & Iqbal S.M. (2016). Biological nitrogen fixation to improve plant growth and productivity. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 4 (4) : 596-599.
- Bargaz A., Faghire M., Abdi N., Farissi M., Sifi B., Drevon J.-J., Cherkaoui-Ikbal M. & Ghoulam C. (2012). Low Soil Phosphorus Availability Increases acid phosphatases activities and affects P Partitioning in nodules, seeds and rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*. *Agriculture*, 2 : 139–153.
- Barikissou E. (2012). Elaboration d'un protocole *in vitro* de contournement des barrières d'incompatibilité génétique entre *Phaseolus coccineus* L. et *P. vulgaris* L. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique, Académie Universitaire Wallonie-Europe, Université de Liège, Liège, France, 144 p.
- Barrera S., Mier y Teran J., Lobaton J., Escobar R., Gepts P., Beebe S. & Urrea C. (2022). Large genomic introgression blocks of *Phaseolus parvifolius* Freytag bean into the common bean enhance the crossability between tepary and common beans. *Plant Direct*, 6 (12) : 1-16.
- Beebe S.E., Rao I.M., Devi M.J. & Polania J. (2014). Common beans, biodiversity, and multiple stresses : Challenges of drought resistance in tropical soils. *Crop and Pasture Science* 65: 667–675.
- Boa B.B.Y. (2016). Effet de trois substrats à base de sous-produits locaux sur deux variétés de tomate en culture hydroponique au centre de la Côte d’Ivoire. Mémoire de Master, Université Nangui Abrogoua, Abidjan , Côte d’Ivoire, 73 p.
- Broughton W. J. & Dilworth M. J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical Journal*, 125 (4) : 1075-1080.
- Buhian W.P. & Bensmihen S. (2018). Mini-review : nod factor regulation of phytohormone signaling and homeostasis during rhizobia-legume symbiosis. *Frontiers Plant Science*, 9 : 1-8.
- Buruchara R., Chirwa R., Sperljng L. & Mukunkusl C. (2010). Development and delivery of bean varieties in Africa:the PanAfrica Bean Research Alliance (PABRA). *African Crop Science Journal*, 19 (4) : 227-245.
- Cao Y., Wang E.-T., Zhao L., Chen W.-M., Wei G.-H. (2014). Diversity and distribution of rhizobia nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. *Soil Biology & Biochemistry* 78 : 128-137.

- Celmeli T., Sari H., Canci H., Sari D., Adak A., Toker T.E.C. (2018). The nutritional content of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in comparison to modern varieties. *Agronomy*, 8 : 166-179.
- Centre Technique de coopération Agricole et rurale (CTA) (2010). Engrais : faire baisser les prix. Spore ,146, Wageningen (Pays-Bas) : 16 p.
- Chacón-Sánchez M.I. (2018). The domestication syndrome in *phaseolus* crop plants: A review of two key domestication traits. In: Origin and evolution of biodiversity. Pontarotti P., Cham (Suisse) : 37–59.
- Chakraborty S., Valdés-López O., Stonoha-Arther C. & Ané J.-M. (2022). Transcription factors controlling the rhizobium–legume symbiosis : Integrating infection, organogenesis and the abiotic environment. *Plant and Cell Physiology*, 63 (10) : 1326–1343.
- Chávez-Servia J.L., Heredia-García E., Mayek-Pérez N., Aquino-Bolaños E.N., Hernández-Delgado S., Carrillo-Rodríguez J.C., Gill-Langarica H.R. & Vera-Guzmán A.M. (2016). Diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces and the Nutritional value of their grains. In: grains legums. Goyal A.K., Rijeka (Croatie) : 1-33.
- Chen W.F., Wang E.T., Ji Z.J. & Zhang J.J. (2021). Recent development and new insight of diversification and symbiosis specificity of legume rhizobia : mechanism and application. *Journal of Applied Microbiology*, 131 (2) : 553–563.
- Cheriet D. (2016). Etude des bactéries symbiotiques de la luzerne (*Medicago ciliaris* L.) fixatrices d'Azote. Thèse de Doctorat, Facultés de Sciences, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie, 138 p.
- Chianu J.N., Nkonya E.M., Mairura F.S., Chianu J.N. & Akinnifesi F.K. (2011). Biological nitrogen fixation and socioeconomic factors for legume production in sub-Saharan Africa: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31: 139–154.
- Coba de la Peña T., Fedorova E., Pueyo J.J. & Lucas M.M. (2018) The symbiosome: legume and rhizobia co-evolution toward a nitrogen-fixing organelle? *Frontiers in Plant Sciences*, 8 : 22-29.
- Coulibaly N.D., Fondio L., N'gbesso M.F.P. & Doumbia B. (2019). Evaluation des performances agronomiques de quinze nouvelles lignées de tomate en station au centre de la Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(3): 1565-1581.
- Coulibaly N.D., N'gbesso M.F.D.P., Gajdi A.G., Ossey C.-L., Fondio L., Berthé I.D. & Butare

- L. (2021). Agromorphologic characterisation of local and introduced common bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) varieties performances in Côte d'Ivoire central region. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 48 (1) : 8566-8580.
- Coulibaly Z., Barro A., Tignegre J.B., Kiebre Z., Batieno B.J., Dieni Z. & Nanama J. (2020). Évaluation des performances agronomiques de douze (12) variétés de niébé vert [*Vigna unguiculata* (L.) walp.] au Burkina Faso. *Journal of Applied Biosciences*, 153: 15745-15755.
- Curley R.L. & Burton J.C. (1975). Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectants. *Agronomy Journal*, 67 : 807-808.
- Czernic P., Gully D., Cartieaux F., Moulin L., Guefrachi I., Patrel D., Pierre O., Fardoux J., Chaintreuil C., Nguyen P., Gressent F., Da Silva C., Poulain J, Wincker P., Rofidal V., Hem S., Barrière Q., Arrighi J., Mergaert P & Giraud E. (2015). Convergent evolution of endosymbiont differentiation in dalbergioid and inverted repeat-lacking clade legumes mediated by nodule-specific cysteine-rich peptides. *Plant Physiology*, 169: 1254-1265.
- Dangeard P.A. (1926). Recherches sur les tubercules radicaux des Légumineuses. Le Botaniste, Series 16, Paris (France) : 270 p.
- Das A & Mukherjee D (2000). Influence of insecticides of microbial transformation of nitrogen and phosphorus in typic orchraguaff soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 : 3728-3732.
- Das U., Thapa S., Debnath Y., Lyngdoh A. & Mallick D. (2014). Evaluation of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for seed production. *Journal of Applied and Natural Science*, 6 (2) : 594-598.
- da-Silva J.R., Alexandre A., Brígido C., Oliveira S. (2017). Can stress response genes be used to improve the symbiotic performance of rhizobia? *AIMS Microbiology*, 3 (3) : 365-382.
- de Carvalho-Niebel F., Fournier J., Becker A. & Arancibia M.M. (2024). Cellular insights into legume root infection by rhizobia. *Current Opinion in Plant Biology*, 81 : 1-10.
- De Ron A.M., Papa R., Bitocchi E., González A.M., Debouck D.G., Brick M.A., Fourie D., Marsolais F., Beaver J., Geffroy V., McClean P., Santalla M., Lozano R., Yuste-Lisbona F.J. & Casquero P.A. (2015). Common bean. In: Grain legumes. handbook of plant breeding. De Ron A., 10, New York (Etats Unis d'Amérique) : pp. 1–36.
- Debarge S. & Tenaud A. (2015). Cultiver des légumineuses pour réduire l'utilisation d'intrants de synthèse. In : Agriculture et Environnement, n°5. Ademe, Cedex (France) : 12 p.

- Debouck D.G. (2021). Phaseolus beans (*Leguminosae: Phaseoleae*) : A checklist and notes on their taxonomy and ecology. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 15 (1) : 73–111.
- Delhove G., Dioh S., Jacques A., Lehmann E. & De Bauw P. (2023). Guide de Production Durable du Haricot Vert. COLEAD, Bruxelles (Belgique), 376 p.
- Denis F., Poly M.C., Martin C., Bingen E. & Quentin R. (2007). Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson, Paris (France) : 640 p.
- Dhane Fitouri S. (2011). Diversité phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla du nord (*Hedysarum coronarium L*) et selection des souches rhizobiales efficientes. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques, Institut national agronomique de Tunisie, Tunis, Tunisie, 149 p.
- diCenzo G.C., Zamani M., Checcucci A., Fondi M., Griffiths J.S., Finan T.M. & Mengoni A. (2019). Multidisciplinary approaches for studying rhizobium–legume symbioses. *Canadian Journal of Microbiology*, 65 (1): 1-33.
- Diédhiou I. & Diouf D. (2018). Transcription factors network in root endosymbiosis establishment and development. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34 : 37-51.
- Djedidi S., Yokoyama T., Tomooka N., Ohkama-Ohtsu N., Risal C.P., Abdelly C. & Sekimoto H. (2011). Phenotypic and genetic characterization of rhizobia associated with alfalfa in the Hokkaido and Ishigaki regions of Japan. *Systematic and Applied Microbiology*, 34 (6) : 453–461.
- Dong W. & Song Y. (2020). The significance of flavonoids in the process of biological nitrogen fixation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (16) : 1-18.
- Drouin P., Sellami M., Prevost D., Fortin J. & Antoun H. (2010). Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of Rhizobiaceae. *Journal of Environmental Science and Health*, 45 (8) : 757-765.
- Dwivedi S.L., Sahrawat K.L., Upadhyaya H.D., Mengoni A., Galardini M., Bazzicalupo M., Biondi E.G., Hungria M., Kaschuk G., Blair M.W. & Ortiz R. (2015). Advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. *Advances in Agronomy*, 129 : 1-116.
- Emishaw W. (2007). Comparison of the Growth, Photosynthesis and Transpiration of Improved

- and Local Varieties of Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at Haramaya. Thèse de Doctorat, Université de Haramaya, Haramaya, Ethiopie, 254 p.
- Essendoubi M., Brhada F., Eljamali J.E., Filali-Maltouf A., Bonnassie S., Georgeault S., Blanco C. & Jebbar M. (2007). Osmoadaptative responses in the rhizobia nodulating acacia isolated from south-eastern Moroccan Sahara. *Environmental Microbiology*, 9 (3) : 603-611.
- Etana D. (2022) Major insect pests and diseases in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production in Ethiopia. *Frontiers*, 2 (2) : 79-87.
- Fabra A., Duffard R. & Duffard A.E. (1997). Toxicity of 2,4-Dichlororophenoxyacetic acid to rhizobium spin pure culture. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59 (4) : 645-652.
- Faghire M., Bargaz A., Farissi M., Palma F., Mandri B., Lluch C, Tejera G.N.A., Herrera-Cervera J.A., Oufdou K. & Ghoulam C. (2011). Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55: 69-75.
- Faizah A.W., Broughton W.J. & John C.K. (1980). Rhizobia in tropical legumes-XI . Survival in the seed environment. *Soil, Biology and Biochemistry*, 12 : 219-227.
- FAO (2022). Crop Production and Trade Data. Consulté sur <http://www.fao.org/faostat/en/#data> le 05 janvier 2024.
- FAOStat (2023). Données sur le haricot vert. Consulté sur <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC> le 15 mars 2024 .
- Farid M. & Navabi A. (2015). N₂ fixation ability of different dry bean genotypes. *Canadian Journal of Plant Science*, 95 : 1243–1257.
- Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin M.H., Lin Y.H., Reid D.E. & Gresshoff P.M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52: 61–76.
- Fernandes de Brito L., Pacheco R.S., Filho B.F.D.S., Ferreira E.P.D.B., Stralioatto R. & Araújo A.P. (2015). Resposta do Feijoeiro Comum à Inoculação com Rizóbio e Suplementação com Nitrogênio Mineral em Dois Biomas Brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 39 : 981-992.

- FiBL (2021). Manuel de formation en agriculture biologique pour l'Afrique. Institut de recherche en agriculture biologique, Suisse, 20 p.
- Fisseha Z. (2015). Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm of Ethiopia as revealed by microsatellite markers, *African Journal of Biotechnology*, 52 : 2824-2847
- Fogaça de Freitas V., Cerezini P., Hungria M. & Nogueira M.A. (2022). Strategies to deal with drought-stress in biological nitrogen fixation in soybean. *Applied Soil Ecology*, 172 : 135-175.
- Fossou R.K., Kouassi N.K., Kouadjo G.C.Z., Zako S.M.I.B. & Zézé A. (2012). Diversité de rhizobia dans un champ cultivé de pois d'angle (*Cajanus cajan* L.) (légumineuses) à Yamoussoukro (centre Côte d'Ivoire). *Agronomie Africaine*, 24 (1) : 29-38.
- Franche C., Lindström K. & Elmerich C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321: 35–59.
- García-Calderón M., Pérez-Delgado C.M., Palove-Balang P., Betti M. & Márquez A.J. (2020). flavonoids and isoflavonoids biosynthesis in the model legume *Lotus japonicus*, connections to nitrogen metabolism and photorespiration. *Plants*, 9 (6) : 1-22.
- Geddes B.A. & Oresnik, I.J. (2016). The mechanism of symbiotic nitrogen fixation. *Advances in Environmental Microbiology*, 2 : 67-96.
- Ghantasala S. & Roy C.S. (2022). Nod factor perception : an integrative view of molecular communication during legume symbiosis. *Plant Molecular Biology*, 110 : 485–509.
- Gholami A., Biyari A., Gholipour M. & Rahmani, H.A. (2012). Growth promotion of maize (*Zea mays* L.) by plant-growth promoting rhizobacteria under field conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 43: 1263-1272.
- Goudjo E.C., Soura H.B., Gnacadja C.K., Iacomini B.M., Baba-Moussa F.A.-K. & Gnancadja A.S.L. (2023). Revue Analytique des Maladies Fongiques Affectant la Production du Haricot Vert (*Phaseolus vulgaris*). *ESI Preprints*, 19 (36) : 67-79.
- Gough C. & Cullimore J. (2011). Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24: 867–878.
- Goyal R.K. & Habtewold J.Z. (2023). Evaluation of legume–rhizobial symbiotic interactions beyond nitrogen fixation that help the host survival and diversification in hostile

- environments. *Microorganisms*, 11 (6) :14-54.
- Goyal R.K., Mattoo A.K. & Schmidt M.A. (2021) Rhizobial–host interactions and symbiotic nitrogen fixation in legume crops toward agriculture sustainability. *Frontiers in Microbiology*, 12 : 1-14.
- Graham P.H. (1994). Legume nodule symbiosis. In : Methods of soil analysis. Part 2. *Microbiology and Biochemical properties book*, 5 : 199-222.
- Gueï N.K.R., Konaté I., Taha K., Bamba I., Beugré G.A.M., Akaffou D.S. & Filali-Maltouf A. (2020). Molecular and symbiotic efficiency characterization of Rhizobia nodulating Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.) from agricultural soils of Daloa localities in Côte d'Ivoire. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9 (7) : 507-519.
- Gulati R. (2018). Legums symbiosis under abiotic stress - a review. In : Molecular physiology of abiotic stresses in plant productivity. Hemantaranjan A., Jodhpur (Inde) : 186-289.
- Gunnabo A.H., Geurts R., Wolde-meskel E., Degefu T., Gille K.E. & van Heerwaarden J. (2019). Genetic interaction studies reveal superior performance of *Rhizobium tropici* CIAT899 on a range of diverse East African common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 85 (24) : 1-56.
- Gunnabo A.H., Geurts R., Wolde-meskel E., DegefuT., Giller K.E. & van Heerwaarden J. (2021). Phylogeographic distribution of rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *FEMS Microbiology Ecology*, 97 (4) : 703-716.
- Gunununu R.P., Mohammed M., Jaiswal S.K. & Dakora F.D. (2023). Phylogeny and symbiotic effectiveness of indigenous rhizobial microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Malkerns, Eswatini. *Scientific Reports*, 13 : 1-18.
- Gyaneshwar P., Hirsch A.M., Moulin L., Chen W.M., Elliott G.N., Bontemps C., de los Santos P.E., Gross E., dos Reis F.B.J., Sprent J.I., Young J.P.W. & James E.K. (2011). Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. *The American Phytopathological Society*, 24 : 1276-1288.
- Habtegebrial K. & Singh B.R. (2006). Wheat responses in semiarid northern Ethiopia to N₂ fixation by *Pisum sativum* treated with phosphorus fertilizers and inoculants. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 75 : 247-255.
- Hassen A.I., Lamprecht S.C. & Bopape F.L. (2020). Emergence of β -rhizobia as new root

- nodulating bacteria in legumes and current status of the legume–rhizobium host specificity dogma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36 : 40-58.
- Hawkins J.P. & Oresnik I.J.. (2022). The rhizobium-legume symbiosis: co-opting successful stress management. *Frontiers in Plant Sciences*, 12 : 1-11.
- Helene L.C.F., Klepa M.S. & Hungria M. (2022). New insights into the taxonomy of bacteria in the genomic era and a case study with Rhizobia. *International Journal of Microbiology*, 2022 : 1-19.
- Herrera-Cervera J.A., Caballero-Mellado J., Laguerre G., Tichy H.V., Requena N., Amarger N., Martinez-Romero E., Olivares J. & Sanjuan J. (1999). At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30 : 87–97.
- Hmaeid N., Wali M., Metoui, Pueyo J.J., Ghnaya T. & Abdelly, C. (2019). Efficient rhizobacteria promote growth and alleviate NaCl-induced stress in the plant species *Sulla carnosa*. *Applied soil and ecology*, 133: 104-113.
- Horácio E.H., Gavilanes F.E.Z., Feliciano M.V., de Moraes J.G., Zucareli C., Andrade D.S., Maddela N.R. & Prasad R. (2023). Exploring the interaction effects between common bean cultivars and rhizobia inoculation on plant growth and yield. *Journal of Agriculture and Food Research*, 15: 1-9.
- Huignard J., Glitho I., Monge J. & Regnault-Roger I. (2011). Insectes ravageurs des grains de légumineuses, biologie des *Bruchinae* et lutte raisonnées en Afrique. 1^{ère} édition. éditions Quae. France, 146 p.
- Hung M.H., Bhagwath A.A., Shen F.T., Devasya R.P. & Young C.C. (2005). Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiologia*, 49 (6) : 577-584.
- Hungria M., Nogueira M.A. & Araujo R.S. (2013). Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils*, 49 : 791–801.
- Huo Y., Tong W., Wang J., Wang F., Bai W., Wang E., Shi P., Chen W. & Wei G (2019). *Rhizobium chutanense* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69 : 2049–2056.
- Ibny I.Y.F., Jaiswa K.S., Mohammed M. & Dakora D.F. (2019). Symbiotic effectiveness and ecologically adaptive traits of native rhizobial symbionts of Bambara groundnut (*Vigna*

- subterranea* L. Verdc.) in Africa and their relationship with phylogeny, in Africa and their relationship with phylogeny. *Scientific Reports*, 9:126-166.
- International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) (1982). *Phaseolus vulgaris* descriptor list. IBPGR Secretariat, Rome (Italy) : 3 p.
- Jaiswal S.K., Mohammed M., Ibny F.Y.I. & Dakora F.D. (2021). Rhizobia as a source of plant growth-promoting molecules : Potential applications and possible operational mechanisms. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4 : 1-14.
- Javadi A., Shamaei M., Mohammadi Z.L., Pourabdollah M., Dorudinia A., Seyedmehdi S.M. & Karimi S. (2014). Qualification study of two genomic DNA extraction methods in different clinical samples. *Tanaffos*, 13 (4) : 41- 47.
- Jiménez-Guerrero I., Acosta-Jurado S., Del Cerro P., Navarro-Gómez P., López-Baena F.J., Ollero F.J., Vinardell .JM. & Pérez-Montaña F. (2018). Transcriptomic studies of the effect of nod gene-inducing molecules in rhizobia : Different weapons, one purpose. *Genes*, 9 (1) : 1-9.
- Jordan D.C. (1984). Family III. *Rhizobiaceae*. In: Krieg NR, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams et Wilkins, Baltimore, United States of America, 234–242.
- Kajić S., Hulak N. & Sikora S. (2016). Environmental stress response and adaptation mechanisms. *Rhizobia Agriculturae Conspectus Scientificus*, 81 (1) : 15-19.
- Kanyenga L.A., Kasongo L.M., Kizungu V.R., Nachigera M.G. & Kalonji M.A. (2016). Effect of climate change on common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop production : determination of the optimum planting period in midlands and Highlands zones of the Democratic Republic of Congo. *Global Journal of Agricultural Research and Reviews*, 4 (1) : 190-199.
- Karaca U. & Uyanöz R. (2012). Effectiveness of native Rhizobium on nodulation and growth properties of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *African Journal Of Biotechnology*, 11 (37): 8986-8991.
- Karavidas I., Ntatsi G., Vougeleka V., Karkanis A., Ntanasi T., Saitanis C., Agathokleous E., Ropokis A., Sabatino L., Tran F., Iannetta P.P.M. & Savvas D. (2022). Agronomic practices to increase the yield and quality of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) : a systematic review. *Agronomy*, 12 (2) : 271-287.

- Karthik C., Oves M., Sathya K., Sri-Ramkumar V. & Arulselvi P.I. (2017). Isolation and characterization of multi-potential Rhizobium strain ND2 and its plant growth-promoting activities under Cr (VI) stress. *Archives of Agronomy and Soil Science* ;63 : 1058–1069.
- Kaushik N., Kumar K., Kumar S. & Kaushik N. (2007). Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of Jatropha (*Jatropha curcas* L.) accessions. *Biomass Bioenergy*, 31: 497-502.
- Kawaka F., Dida M.M., Opala P.A., Ombori O., Maingi J. & Osoro N. (2014). Symbiotic efficiency of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in soils of Western Kenya. *International Scholarly Research Notices*, 2014: 1–8.
- Kazadi A.T., Ngoy S.M., Baert G., Haesaert G. & Mukobo R.-P. (2020). Effect of soil properties on Arbuscular Mycorrhizae Fungi (AMF) activity and assessment of some methods of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculation in Lubumbashi Region (DR Congo). *Scholars Bulletin*, 6 : 198-207.
- Ketta H.A. & Hewedy O.A.R. (2021). Biological control of *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum* root rot disease using Trichoderma species. *Egyptian Journal of Biology and Pests Controls*, 31 : 96-105.
- Khan M.A., Iqbal Z., Sarwar M., Nisa M., Khan M.S., Lee W.S., Lee H.J. & Kim H.S. (2006). Urea treated corncobs ensiled with or without additives for buffaloes: ruminal characteristics, digestibility and nitrogen metabolism. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 19 (5) : 705-712.
- Kidaj D., Krysa M., Susniak K., Matys J., Komaniecka I. & Sroka-Bartnicka A. (2020). Biological activity of Nod factors. *Acta Biochimica Polonica*, 67 (4) : 435–440.
- Konan K.F. (2013). Diagnostic minéral d'un sol de bas-fond secondaire développé sur matériaux granito-gneissique en région centre de la Côte d'Ivoire : essai comportemental de riziculture irriguée. Mémoire de DEA, Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 86 p.
- Konate I., Amani K., Koffi M., Guei R.N.K., Ouattara A., Tonessia C.D., Filali-Maltouf A. & Akaffou D.S. (2015). Effect of herbicides on rhizobacteria density in experimental fields and on bacterial strains survival *in-vitro*. *International Journal of Current Research*, 7: 16361-16365.

- Konaté I., Koulibaly A., Koffi M., Sorouri A., Berraho E.B. & Filali-Maltouf A. (2014). Phenotypic variations of endophytic bacteria associated with carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *American Journal of Lifes Sciences*, 2 : 325-332.
- Koskey G., Mburu S.W., Kimiti J.M., Ombori O., Maingi J.M. & Njeru E.M. (2018). Genetic characterization and diversity of *Rhizobium* isolated from root nodules of mid-altitude climbing bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Frontiers in microbiology*, 9: 968-980.
- Kouadio E.Y.G., Fondio L., Cherif M., N’Gbesso M.F.P. & Coulibaly N.D. (2021). Fertilizing carryover of three food legumes on tomato growth and production performances (*Solanum lycopersicum* L., variety TMA97). *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 11: 321-329.
- Kouakou K., Egrise D., Kati-Coulibaly S. & Moreno-Reyes R. (2013). Stimulating effects of hydro-ethanolic and acetonic extracts of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) on proliferation and differentiation of osteoblastic cells *in-vitro*. *International Journal of Biosciences*, 3: 185-194.
- Kouassi Y.F., Gbogouri G.A., N’Guessan K.A., Bilgo A., Pascal A.K.T. & Ama T.J. (2019). Effets de fertilisants organique et organo-minéral a base de déchets végétaux et animaux sur la croissance et le rendement du soja (*Glycine max* (L.) Merrill) en zone de savane de Côte d’Ivoire. *Agronomie Africaine*, 31 (1) : 1-12.
- Kumar A., Reddy K., Pandravada R., Rani D. & Chaitanya V. (2016). Phenotypic variability, correlation and path coefficient analysis in pole type french beans (*Phaseolus vulgaris* L.),” *Plant Archives*, 14 (1): 313–319 .
- Kumar N., Srivastava P., Vishwakarma K., Kumar R., Kuppala H., Maheshwari S.K. & Vats S. (2020). The rhizobium–plant symbiosis : state of the art. In: *Plant microbe symbiosis*, Cham (Suisse) : pp. 1-20.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35:1547-1549.
- Kuźniar A., Włodarczyk K. & Wolińska A. (2019). Agricultural and other biotechnological applications resulting from trophic plant-endophyte interactions. *Agronomy*, 9 (12) : 1-23.
- Lachance M.-A. (2022). Phylogenies in yeast species descriptions : in defense of neighbor-joining. *Yeast*, 39 : 513–520.

- Lahry K., Datta M. & Varshney U. (2024). Genetic analysis of translation initiation in bacteria : An initiator tRNA-centric view. *Molecular Microbiology*, 00 : 1–17.
- Lalande R., Bigwaneza P.C. & Antoun H. (1990). Efficacité symbiotique des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* isolées des sols du Rwanda. *Sol végétal*, 121 (1) : 41-46.
- Landry C., Forest-Drolet J., Houde S., Joseph C.-A. & Grenier M. (2021). Fertilisation du haricot frais. Mandat IRDA de révision des valeurs scientifiques de référence en fertilisation du Québec (2020-2023). Fascicule 02 : Haricot frais. Présenté au ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation, Quebec (Canada) : 54 p.
- Lardi M. & Pessi G. (2018). Functional genomics approaches to studying symbioses between legumes and nitrogen-fixing rhizobia. *High-Throughput*, 7 (2) :15-27.
- Leary J.K., Singleton P.W., Scowcroft P.G & Borthakur D. (2006). Symbiotic diversity in the cosmopolitan genus *Acacia*. *Symbiosis*, 41 : 107-117.
- Legesse S. (2016). Isolation, identification and authentication of root nodule bacteria (*Rhizobia*) in promoting sustainable agricultural productivity: A review. *Journal of Developing Societies*, 6 : 87-93.
- Li X. & Li Z. (2023). What determines symbiotic nitrogen fixation efficiency in rhizobium : recent insights into *Rhizobium leguminosarum*. *Archives of Microbiology*, 205 : 300-324.
- Lindström K., Murwira M., Willems A. & Altier N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*, 161: 453-463.
- Liu J., Yu X., Qin Q., Dinkins R.D. & Zhu H. (2020). The impacts of domestication and breeding on nitrogen fixation symbiosis in legumes. *Frontiers in Genetics*, 11 : 1-9.
- Loko L.E.Y., Orobiyi A., Adjatin A., Akpo J., Toffa J., Djedatin G. & Dansi A. (2018). Morphological characterization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces of Central region of Benin Republic. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 10 (11) : 304-318.
- Lorite M.J., Estrella M.J., Escaray F.J., Sannazzaro A., Videira e Castro I.M., Monza J., Sanjuán J. & León-Barrios M. (2018). The rhizobia-lotus symbioses : Deeply specific and widely diverse. *Frontiers in Microbiology*, 9 : 20-55.
- Los F.G.B., Zielinski A.A.F., Wojciechowski J.P., Nogueira A. & Demiate I.M. (2018). Beans

- (*Phaseolus vulgaris* L.) : whole seeds with complex chemical composition. *Current Opinion in Food Science*, 19 : 63-71.
- Lunze L., Abang M.M., Buruchara R, Ugen M.A., Nabahungu N.L., Rachier G.O., Ngongo M. & Idupulapati R. (2012). Integrated soil fertility management in bean- based cropping systems of eastern, central and southern africa. In : Soil fertility improvement and integrated nutrient management-a global perspective. Whalen J., Rijeka (Croatie) : 239-272.
- Maâtallah J., Berraho E.B., Munoz S., Sanjuan J. & Lluch C. (2002). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing in Moroccan soils. *Agronomie*, 22 : 321-329.
- Maiden M.C. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60 : 561–588.
- Martínez-Martínez V., Gomez-Gil J., Machado M.L. & Pinto F.A.C. (2018). Leaf and canopy reflectance spectrometry applied to the estimation of angular leaf spot disease severity of common bean crops. *PLoS ONE*, 13 (4) : 1-18.
- Martinez-Romero E., Segovia L., Mercante F.M., Franco A.A., Graham P. & Pardo M.A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena sp.* trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41 : 417-426.
- Marzooghian A., Moghaddam M., Valizadeh M. & Kooshki M.H. (2013). Genetic diversity of common bean genotypes as revealed by seed storage proteins and some agronomic traits. *Plant Breeding and Seed Science*, 67 : 125–137.
- Masson-Boivin C. & Sachs J.L. (2018). Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia-the roots of a success story. *Current Opinion in Plant Biology*, 44 : 7-15.
- Masson-Boivin C., Giraud E., Perret X. & Batut J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes. *Trends Microbiology*, 17 : 458-466.
- Mendoza-Suárez M.A., Geddes B.A., Sánchez-Cañizares C., Ramírez-González R.H., Kirchhelle C., Jorriin B. & Poole P.S. (2020). Optimizing rhizobium-legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N² fixation in nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 : 9822–9831.
- Menéndez A.B., Calzadilla P.I., Sansberro P.A., Espasandin F.D., Gazquez A., Bordenave C.D., Maiale S.J., Rodríguez A.A., Maguire V.G., Campestre M.P., Garriz A., Rossi F.R., Romero F.M., Solmi L., Salloum M.S., Monteoliva M.I., Debat J.H. & Ruiz O.A. (2019). Polyamines

- and legume s: joint stories of stress, nitrogen fixation and environment. *Frontiers in Plant Sciences*, 10 : 1-15.
- Menéndez E., Martínez-Hidalgo P., Silva L.R., Velázquez E., Mateos P.F. & Peix A. (2017). Recent advances in the active biomolecules involved in rhizobia-legume symbiosis. In: *Microbes for legume improvement*, Cham (Suisse) : 45-74.
- Mergaert P., Hayashi G.S., Biswas B., Mirzaei S., Indrasumunar A., Reid D., Samuel S., Tollenaere A., van Hameren B., Hastwell A., Scott P. & Ferguson B.J. (2015). The value of biodiversity in legume symbiotic nitrogen fixation and nodulation for biofuel and food production. *Journal of Plant Physiology*, 172 : 128-136.
- Mergaert P., Kereszt A. & Kondorosi E. (2020). Gene expression in nitrogen-fixing symbiotic nodule cells in medicago truncatula and other nodulating plants. *The Plant Cell*, 32 (1) : 42–68.
- Meziadi C., Blanchet S., Geffroy V. & Pflieger S. (2017). Genetic resistance against viruses in *Phaseolus vulgaris* L : State of the art and future prospects. *Plant Science*, 265 : 39-59.
- Michaud V. (2012). Détection et caractérisation moléculaires rapides du virus de la peste porcine africaine et utilisation des reconstructions phylogénétiques pour reconstituer son histoire évolutive. Thèse de Doctorat, Science Chimique et Biologique de la Santé, Université de Montpellier II, Montpellier, France, 252 p.
- Miklas, P. N., Kelly, J. D., & Cichy, K. A. (2022). Dry bean breeding and production technologies. In : *Dry Beans and Pulses Production, Processing and Nutrition*. John Wiley and Sons, Hoboken (Etats-Unis d'Amérique) : pp. 29–56.
- Milton R.D. & Minter S.D. (2019). Nitrogenase bioelectrochemistry for synthesis. *Applications Accounts of Chemical Research*, 52 (12) : 3351–3360.
- MINADER (2009). État des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. Second rapport national, Octobre 2009. Ministère de l'Agriculture et le Développement Rural (MINADER), Côte d'Ivoire : 65 .
- Mirindi C., Mbikayi N., Kijana R., Rudahaba N., Civava M., Lubobo K., Koleramungu C., Muluku B., Irengi C. & Mongana E. (2018). Agronomic evaluation biofortified beans varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) in comparative adaptation trials : climbing varieties cases «nutritionally enhanced climbing beans(NUC)». *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 24 (1) : 76-85.

- Moawad H., Abd El-Rahim W.M., Shawky H., Higazy A.M. & Daw Zakaria Y. (2014). Evidence of Fungicides Degradation by Rhizobia. *Agricultural Sciences*, 5 : 618-624.
- Moëz S. (2003). effets des pesticides sur la croissance bactérienne des rhizobia. Mémoire de Master des Sciences de l'Agriculture et de l'alimentation, Université de Laval, Laval, Canada, 83 p.
- Mohamad R. & Al- naser Z. (2018). Effect of pesticides and essential oils in the growth of rhizobial isolated from nodules of some leguminous plants *in vitro*. *The Arab Journal for Arid Environments*, 1 : 111-117.
- Montiel J., Fonseca-García C. & Quinto C. (2018). Phylogeny and expression of NADPH oxidases during symbiotic nodule formation. *Agriculture*, 8 (11) : 1-9.
- Moretti L.G., Lazarini E., Bossolani J.W., Parente T.L., Caioni S., Araujo R.S. & Hungria M. (2018). Can additional inoculations increase soybean nodulation and grain yield? *Agronomy Journal*, 110 : 715–721.
- Muindi M.M., Muthini M., Njeru E.M. & Maingi J. (2021). Symbiotic efficiency and genetic characterization of rhizobia and non rhizobial endophytes associated with cowpea grown in semi-arid tropics of Kenya. *Heliyon* 7 (4) : 1-8.
- Mustaq S., Moin A., Pandit B., Tiwary B.K. & Alam M. (2024). Phyllobacteriaceae: a family of ecologically and metabolically diverse bacteria with the potential for different applications. *Folia Microbiologica*, 69 : 17–32.
- Muthini M., Maingi J.M., Muoma J.O., Amoding A., Mukaminega D. & Osoro N. (2014). Morphological assessment and effectiveness of indigenous rhizobia isolates that nodulate *P. vulgaris* in water hyacinth compost testing field in Lake Victoria basin. *British Journal of Applied Science & Technology*, 4 (5) : 718-738.
- Mwenda G.M., O'Hara G.W., De Meyer S.E., Howieson J.G. & Terpolilli J.J. (2018). Genetic diversity and symbiotic effectiveness of *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia in Kenya. *Systematic and applied microbiology*, 41 (4) : 291-299.
- N'da H.A., Akanvou L., Kouakou C.K. & Zoro A.I.B. (2014). Diversité morphologique des variétés locales de maïs (*Zea mays* L.) collectées au Centre et Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire. *European Scientific Journal*, 10 (12): 349-365.
- N'gbesso M.F., Zohouri G.P., Fondio L., Djidji A.H. & Konate D. (2013). Étude des caractéristiques de croissance et de l'état sanitaire de six variétés améliorées de niébé [*Vigna*

- unguiculata* (L.) Walp] en zone centre de Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7 (2) : 457-467.
- Nadeem M.A., Karaköy T., Yeken M.Z, Habyarimana E., Hatipoğlu R., Çiftçi V., Nawaz M.A., Sönmez F., Shahid M.Q. & Yang S.H. (2020). Phenotypic characterization of 183 turkish common bean accessions for agronomic, trading, and consumer-preferred plant characteristics for breeding purposes. *Agronomy*, 10 : 1-22.
- Nakei M.D., Venkataramana P.B. & Ndakidemi P.A. (2022). Soybean-nodulating rhizobia : ecology, characterization, diversity and growth promoting functions. *Frontiers in Sustainable and Food Systems*, 6 : 1-11.
- Neila A., Adnane B., Mustapha F., Manel B., Imen H., Boulbaba L., Cherki G. & Bouaziz S. (2014). *Phaseolus vulgaris*-rhizobia symbiosis increases the phosphorus uptake and symbiotic N fixation under insoluble phosphorus. *Journal of Plant Nutrition*, 37 (5) : 643–657.
- Nelson M.S. & Sadowsky M.J. (2015). Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Sciences*, 6 : 1-11.
- Nkanza A.M., Bonane J.L.L., Mahungu T.N., Nsuanda A.M., Bidiaka S.M. & Nsuanda M.G. (2021). Évaluation du comportement de sept variétés de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) d'introduction récente dans les conditions édapho-climatiques de la colline du mont-Amba, Kinshasa. *Afrique Science*, 19 (4) : 51-61.
- Ntamwira B.J., Mirindi C.T., Pyame M.L.D., Dheda D.B., Bumba M.E., Moango Manga A.K.W.J. & Kanyenga L.A. (2017). Évaluation agronomique des variétés de haricot volubile riches en micronutriments dans un système intégré d'Agroforesterie sur deux sols contrastés à l'Est de la RD Congo. *Journal of Applied Biosciences*, 114 : 11368- 11386.
- Nzungize R.J. (2012). Identification of *Pythium* species inducing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) root rot symptoms and development of backcrosses to improve the level of varietal resistance to this disease. Thèse de Doctorat, Sciences Agronomiques et Ingénierie biologique, Université de Liège Gembloux, Liège, Belgique, 119 p.
- Ormeño-Orrillo E., Servín-Garcidueñas L.E., Rogel M.A., González V., Peralta H., Mora J., Martínez-Romero J. & Martínez-Romero E. (2015). Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Systematic and Applied Microbiology*, 38 (4) : 287-291.

- Ossey C.-L., Coulibaly N.D., Gadji A.G., N’Gbesso M.F.P., Atse M.-P.A., Fondio L. & Butare L. (2021). Entomofaune associée à la culture du haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) et évaluation des dégâts causés par les insectes ravageurs en Station au centre de la Côte d’Ivoire. *Agronomie Africaine*, 33 (1) : 129-139.
- Ouédraogo E, Brussaard L & Stroosnijder L (2007). Soil macrofauna and organic amendment interactions affects soil carbon and crop performance in semiarid West Africa. *Biology and Fertility of Soils*, 44 (2): 343-351.
- Ouma E.W., Asango A.M., Maingi J. & Njeru E.M. (2016). Elucidating the potential of native rhizobial isolates to improve biological nitrogen fixation and growth of common bean and soybean in smallholder farming systems of Kenya. *International Journal of Agronomy*, 2016 : 1-16.
- Palm R. (1996). La classification numérique : principes et application. Notes de Statistique et d'Informatique, Gembloux (Belgique): 28 p.
- Parker T.A. & Gepts P. (2021). Population Genomics of *Phaseolus* spp. : a domestication hotspot. In: Population genomics : Crop plants, Cham (Suisse) : 607–689.
- Patil V.S., Shamkar N.R. & Patil S.V. (2012). Effet of herbicides on nodulation property of rhizobial isolates. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 4 : 293-299.
- Patra R.K., Pant L.M. & Pradhan K. (2012). Response of soybean to inoculation with rhizobial strains : Effect on growth, yield, N uptake and soil N status. *World Journal of Agricultural Science*, 8 (1) : 51-54.
- Pattnaik S., Mohapatra B., Kumar U., Pattnaik M. & Samantaray D. (2019). Microbe-mediated plant growth promotion: A mechanistic overview on cultivable plant growth-promoting members. In: Biofertilizers for sustainable agriculture and environment, Cham (Suisse) : 435-463.
- PNIA (2017). Rapport final du Programme National d’Investissement Agricole de deuxième génération (2017-2025) 156 p.
- Polania J., Poschenrieder C., Rao I. & Beebe S. (2016). Estimation of phenotypic variability in symbiotic nitrogen fixation ability of common bean under drought stress using ¹⁵N natural abundance in grain. *European Journal of Agronomy*, 79 : 66–73.
- Ponndara S., Kortebi M., Boccard F., Bury-Moné S. & Liroy V.S. (2024). Principles of bacterial

- genome organization, a conformational point of view. *Molecular Microbiology*, 00 : 1–11.
- Poole P., Ramachandran V. & Terpolilli J. (2018). Rhizobia : from saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 16 : 291–303.
- Porch T.G., Beaver S.B., Debouck D.G., Jackson S.A., Kelly J.D & Dempewolf H. (2013). Use of Wild Relatives and Closely Related Species to Adapt Corn.mon Bean to Climate Change. *Agronomy*, 3 (2) : 433-461.
- Provorov N.A. & Andronov E.E. (2016). Evolution of root nodule bacteria : Reconstruction of the speciation processes resulting from genomic rearrangements in a symbiotic system. *Microbiology*, 85 : 131–139.
- Punia S., Dhull S.B., Sandhu K.S., Kaur M. & Purewal S.S. (2020). Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) starch : a review. *Legume Science*, 2020 : 1-16.
- Rai R., Dash P.K., Mohapatra T. & Singh A. (2012). Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. *Indian Journal of Biology*, 50 : 340-350.
- Rajkumari J., Katiyar P., Dheeman S., Pandey P. & Maheshwari D.K. (2022). The changing paradigm of rhizobial taxonomy and its systematic growth upto postgenomic technologies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38 : 206-222 .
- Ramdane I. & Boukarana I.K. (2016). Sélection des souches rhizobiennes efficaces, autochtones de la région de Ghardaïa, nodulant la luzerne (*Medicago sativa* L.). Mémoire Master, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université KasdiMerbah. Ouargla, Algérie, 95 p.
- Rana J.C., Sharma T.R., Tyagi R.K., Chahota R.K., Gautam N.K., Singh M. & Ojha S.N. (2015). Characterisation of 4274 accessions of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm conserved in the Indian gene bank for phenological, morphological and agricultural traits. *Euphytica*, 205 (2) : 441–457.
- Rashid M.H., Krehenbrink M. & Akhtar M.S. (2015). Nitrogen-fixing plant-microbe symbioses. In: Sustainable agriculture reviews. Lichtfouse E., 15, Cham (Suisse) : 193-234.
- Razafintsalama H., Trap J., Rabary B., Razakatiana A.T.E., Ramanankierana H., Rabeharisoa L. & Becquer T. (2022). Effect of *Rhizobium* Inoculation on Growth of Common Bean in Low-Fertility Tropical Soil Amended with Phosphorus and Lime. *Sustainability*, 14 : 1-14.

- Reinprecht Y., Schram L., Marsolais F., Smith T.H., Hill B. & Pauls K.P. (2020). Effects of nitrogen application on nitrogen fixation in common bean production. *Frontiers in Plant Science*, 11 : 1–19.
- Remigi P., Zhu J., Peter J., Young W. & Masson-Boivin C. (2016). Symbiosis within symbiosis : evolving nitrogen-fixing legume symbionts. *Trends in Microbiology*, 24 (1) : 63-75.
- Renard S., Goffork J.P. & Frankine T. (2007). Optimisation de l'efficience de l'azote dans les rotations intégrant les cultures de légumes industriels en Hesbaye. Namur : Service public de Wallonie, Direction générale opérationnelle de l'agriculture, des ressources naturelles et de l'environnement. Wallonie (Belgique), 106 p.
- Rousk K. (2022). Biotic and abiotic controls of nitrogen fixation in cyanobacteria -moss associations. *New Phytologist*, 235: 1330-1335.
- Sachs J.L., Quides K.W. & Wendlandt C.E. (2018). Legumes versus rhizobia : a model for ongoing conflict in symbiosis. *New Phytologist*, 219 : 1199-1206.
- Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4) : 406-425.
- Sajid M., Rab A., Wahid F., Shah S.N.M., Jan I., Khan M.A., Hussain S.A., Khan M.A. & Iqbal Z. (2011). Influence of *Rhizobium* inoculation on growth and yield of groundnut cultivars. *Sarhad Journal of Agriculture*, 27 (4) :574-576.
- Samago T.Y., Anniye E.W. & Dakora F.D. (2018). Grain yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties is markedly increased by rhizobial inoculation and phosphorus application in Ethiopia. *Symbiosis*, 75 : 245–255.
- Saoussen K., Boulbaba L., Rahamh N A, Mustapha R. & Bouaziz S. (2022). Phenotypic diversity and biochemical characteristics of selected rhizobia nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioagro*, 34 (1) : 15-26.
- Saranraj P., Sivasakthivelan P., Al-Tawaha A.R.M., Sudha A., Al-Tawaha A.R. & Sirajuddin S.N. (2021). Diversity and evolution of Bradyrhizobium communities relating to Soybean cultivation : a review. *IOP Conference Series : Earth and Environmental Science*, 788 : 1-5.
- Schneider A. & Huyghe C.C. (2015). Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Editions Quae, Versailles (France) : 516 p.
- Schneider A., Huyghe C.C., Maleplate T., Labalette F., Peyronnet C. & Carouee B. (2015).

- Rôle des légumineuses dans l'agriculture française. In : Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Editions Quae, Versailles (France) : 11-79.
- Schwember A.R., Schulze J., del Pozo A. & Cabeza R.A. (2019). Regulation of symbiotic nitrogen fixation in legume root nodules. *Plants*, 8 (9) : 1-41.
- Segovia L., Young J.P. & Martinez-Romero E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43 : 374-377.
- Shah A. & Smith D.L. (2020). Flavonoids in agriculture : chemistry and roles in, biotic and abiotic stress responses, and microbial associations. *Agronomy*, 10 (8) : 1209.
- Shaktawat P. & Bhurani P. (2019). Review : phylogeny construction methods. *International Journal of Emerging Science and Engineering*, 11 : 1-22.
- Shamseldin A. & Velázquez E. (2020). The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia : a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36 : 1-12.
- Shang R., Wu H., Guo R., Liu Q., Pan L., Li J., Hu Z & Chen C. (2016). The Diversity of Four Anti-nutritional Factors in Common Bean. *Horticultural Plant Journal*, 2 (2) : 97-104.
- Shankar P.V., Shaikh N.R. & Patil S.V. (2012). Effect of different Herbicides on the Nodulation Property of Rhizobial Isolates. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 2 : 293-299.
- Sharma C., Sharma P., Kumar A., Walia Y., Kumar R., Umar A., Ibrahim A.A., Akhtar M.S., Alkhanjaf A.A.M. & Baskoutas S. (2023). A review on ecology implications and pesticide degradation using nitrogen fixing bacteria under biotic and abiotic stress conditions. *Chemistry and Ecology*, 39 (7) : 753-774.
- Sharma V., Bhattacharyya S., Kumar R., Kumar A., Ibañez F., Wang J., Guo B., Sudini H.K., Gopalakrishnan S. & DasGupta M. (2020). Molecular basis of root nodule symbiosis between bradyrhizobium and 'crack-entry' legume groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plants*, 9 (2) : 1-24.
- Shoorooei M., Hoseinzadeh A.H., Maali-Amiri R., Allahyari H. & Torkzadeh-Mahani M. (2018). Antixenosis and antibiosis response of common bean (*Phaseolus vulgaris*) to two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). *Experimental and Applied Acarology*, 74 : 365–381.

- Shumilina J., Soboleva A., Abakumov E., Shtark O.Y., Zhukov V.A. & Frolov A. (2023). Signaling in legum-rhizobia symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 : 1-25.
- Signorelli S., Sainz M., Tabares-da Rosa S. & Monza J. (2020). The role of nitric oxide in nitrogen fixation by legumes. *Frontiers in Plant Sciences*, 11 : 1-14.
- Silué S. (2009). Mécanismes génétiques de l'embryogenèse chez *Phaseolus* et application en hybridation interspécifique. Thèse de doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux, France, 140 p.
- Sindhu S., Dahiya A., Gera1 R. & Sindhu S.S. (2020). Mitigation of abiotic stress in legume-nodulating rhizobia for sustainable crop production. *Agricultural Research*, 9 : 444–459.
- Singh G., Dukariya G. & Kumar A. (2020). Distribution, importance and diseases of soybean and common bean : a review. *Biotechnology Journal International*, 24 (6) : 86-98.
- Singh J. & Verma P.K. (2023). Role of Nod factor receptors and its allies involved in nitrogen fixation. *Planta*, 257 : 54-69.
- Skorupska A., Wielbo J., Kidaj D. & Marek-Kozaczuk M. (2010). Enhancing *Rhizobium*–Legume Symbiosis Using Signaling Factors. In Khan M.S., Zaidi A., Musarrat J., Springer-Verlag/Wien (Allemagne) : 27 p.
- Soares R., Trejo J., Veloso M.M. & Castro I.V. (2016). Biological nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris*. *Revista de Ciências Agrárias*, 39 (4) : 526-537.
- Somasegaran P. & Hoben H.J. (1994). Handbook for *Rhizobia*: Methods in Legume-Rhizobium Technology. Springer, New York (USA), 450 p.
- Sonali R., Liu W., Nandety R.S., Crook A., Mysore K.S., Pislariu C.I., Frugoli J., Dickstein R. & Udvardi M.K. (2020). Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, 32 (1) : 15–41.
- Sousa W.D.S., Soratto R.P., Souza D.P., Campos T.S., da Silva M.B., Souza A.G.V., Teixeira I.R. & Gitari H.I. (2022). Effects of rhizobium inoculum compared with mineral nitrogen fertilizer on nodulation and seed yield of common bean. A meta-analysis. *Agronomy for Sustainable Development*, 42 : 52-70.
- Sprent J.I., Ardley J. & James, E.K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215 : 40–56.

- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont A.D., Kampfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rosselo-Mora R., Balançoires J., Trüper H.G., Vauterin L., Ward A.C. & Whiteman W.B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*, 52 : 1043–1047.
- Stępkowski T., Banasiewicz J., Granada C.E., Andrews M. & Passaglia L.M.P. (2018). Phylogeny and phylogeography of rhizobial symbionts nodulating legumes of the tribe Genisteae. *Genes*, 9 (3) :163-188.
- Sugiyama A. (2021). Flavonoids and saponins in plant rhizospheres : roles, dynamics, and the potential for agriculture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 85 (9) : 1919–1931.
- Sun W., Shahrajabian M.H. & Cheng Q.I. (2021). nitrogen fixation and diazotrophs - a review. *Romanian Biotechnological Letters*, 26 (4) : 2834-2845.
- Sunil N., Sujatha M., Kumar V., Vanaja M., Basha S.D. & Varaprasad K.S: 2010. Correlating the phenotypic and molecular diversity in *Jatropha curcas* L. *Biomass and Bioenergy*, 35(3): 1085-1096.
- Susana R.E., João A C & Helena F. (2007). Genetic diversity of rhizobia associated with *Acacia longifolia* in two stages of invasion of coastal sand dunes. *Applied and Environmental Microbiology*; 73(15): 5066–5070.
- Tang M. & Feng X. (2023). Bean common mosaic disease : etiology, resistance resource and future prospects. *Agronomy*, 13 (1) : 58-76.
- Thami-Alami I, Elboutahiri N. & Udupa S.M. (2010). Variability in natural population of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. *The Mediterranean Semina*, 92: 265-269.
- Thilakarathna M.S. & Raizada M.N. (2017). A Meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 105 : 177-196.
- Threatt S.D. & Rees D.C. (2023). Biological nitrogen fixation in theory, practice, and reality : a perspective on the molybdenum nitrogenase system. *FEBS Letters*, 597 : 45-58.
- Tigist S.G., Sibiya J., Amelework A. & Keneni G. (2023). Agromorphological and Physiological Performance of Ethiopian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes under Different Agroecological Conditions. *Plants*, 12: 23-42.

- Torres-Gutiérrez R., Granda-Mora K.I., Saltos K.R.B. & Robles-Carrión A.R. (2021). Rhizobium Diversity Is the Key to Efficient Interplay with *Phaseolus vulgaris*. Case of Study of Southern Ecuador. In : Advances in the Domain of Environmental Biotechnology. Maddela N.R., Garcia Cruzatty L.C. & Chakraborty S., Singapour (Singapour) : 521–548.
- Tounsi-Hammami S., Le Roux C., Dhane-Fitouri S., De Lajudie P., Duponnois R. & Jeddi F.B. (2019). Genetic diversity of rhizobia associated with root nodules of white lupin (*Lupinus albus* L.) in Tunisian calcareous soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 42 (4) : 448-456.
- Touré Y., Koné M., Silué S. & Kouadio Y.J. (2013). Prospection, collecte et caractérisation agromorphologique des morphotypes de voandzou [*Vigna subterranea* (L.) verdc. (fabaceae)] de la zone savanicole en Côte d’Ivoire. *European Scientific Journal August*, 9 (24): 308-325.
- Tsai S.M., Silva P.M., Cabezas W.L. & Bonetti R. (1993). Variability in nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) intercropped with maize. *Plant Soil*, 152 : 93–101.
- Tsyganova A.V., Brewin N.J. & Tsyganov V.E. (2021). Structure and development of the legume-rhizobial symbiotic interface in infection threads. *Cells*, 10 (5) : 1050-1072.
- Uebersax M.A., Cichy K.A., Gomez F.E., Porch T.G., Heitholt J., Osorno J.M., Kamfwa K., Snapp S.S. & Bales S. (2023). Dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a vital component of sustainable agriculture and food security-A review. *Legume Science*, 5 (1) : 55-68.
- Van Rossum D., Muyotcha A., De Hope B. M., Verseveld H.W.V., Stouthamer A. H. & Boogerd F.C. (1994). Soil acidity in relation to groundnut-Bradyrhizobium symbiotic performance. *Plant Soil*, 163 : 165-175.
- Vaz C., Nascimento M., Carriço J.A, Rocher T. & Francisco A.P. (2021). Distance-based phylogenetic inference from typing data : a unifying view. *Briefings in Bioinformatics*, 22 (3) : 147-163.
- Via V.D., Zanetti M.E. & Blanco F. (2016). How legumes recognize rhizobia. *Plant Signaling & Behavior*, 11 (2) : 52-79.
- Vincent J.M. (1970). A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In : International Biological Programme Handbook n°. 15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford (Etats-Unis d’Amérique) : 73-79.

- Voisin A.-S., Cellier P. & Jeuffoy M.-H. (2015). Fonctionnement de la symbiose fixatrice de N₂ des légumineuses à graines : Impacts Agronomiques et Environnementaux. *Innovations Agronomiques*, 43: 139-160.
- Walker L., Lagunas B. & Gifford M.L. (2020). Determinants of host range specificity in legume-rhizobia symbiosis. *Frontiers in Microbiology*, 11 : 1-13.
- Ward J.H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58: 236 – 244.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. & Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697–703.
- Wekesa C., Jalloh A.A., Muoma J.O., Korir H., Omenge K.M., Maingi J.M., Furch A.C.U. & Oelmüller R. (2022). Distribution, characterization and the commercialization of elite rhizobia strains in Africa. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 : 65-99.
- Woomer P.L., Karanja N., Kisamuli S.M., Murwira M. & Bala A. (2011). A revised manuel for Rhizobium methods and standard protocol available on the project website, [www. N2 africa.org](http://www.N2africa.org). 69 p.
- Worrall E.A., Wamonje F.O., Mukeshimana G., Harvey J.J.W., Carr J.P. & Mitter N. (2015). Bean common mosaic virus and bean common mosaic necrosis virus: Relationships, biology, and prospects for control. *Advances in Virus Research*, 93 : 1-46.
- Xu P. & Wang E. (2023). Diversity and regulation of symbiotic nitrogen fixation in plants. *Current Biology*, 33 (11) : 543-559.
- Yadav S.K., Raverkar K.P., Ramesh C., Navneet P. & Subhash C. (2018). Isolation, authentication and evaluation of rhizobial isolates from the soils of north-west himalayas in french bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Current Research*, 7 (12): 141-149.
- Yao L.J., Shen Y.Y., Zhan J.P., Xu W., Cui G.L. & Wei G.H. (2012). *Rhizobium taibaishanense* sp. nov., isolated from a root nodule of *Kummerowia striata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 335-341.
- Yathindra H.A., Srikanth N. & D'Souza L. (2017). Enhancement of seed germination, fruit set and yield of pole beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by pranic healing. *Ecology, Environment and Conservation*, 23 (2) : 812-814.

- Yeken M.Z., Nadeem M.A., Karaköy T., Baloch F.S. & Çiftçi V. (2019). Determination of Turkish Common Bean Germplasm for Morpho-agronomic and Mineral Variations for Breeding Perspectives in Turkey. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, 22 (1): 39-51.
- Yéo K.T., Fondio L., Kouakou K.L., N’Gbesso M.F.P., Coulibaly N.D. (2022). Caractérisation et diversité des systèmes de productions maraîchères au centre (Bouaké) de la Côte d’Ivoire en vue d’une transition agroécologique. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 52 (3) : 9538-9551.
- Yohannes S., Loha G. & Gessese M.K. (2020). Performance evaluation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for yield and related traits at areka, Southern Ethiopia. *Advances in Agriculture*, (3) : 1-8.
- Yoneyama T., Terakado-Tonooka J., Bao Z. & Minamisawa K. (2019). Molecular analyses of the distribution and function of diazotrophic rhizobia and methanotrophs in the tissues and rhizosphere of non-leguminous plants. *Plants*, 8 (10) : 408-429.
- Young J.P.W., Moeskjær S., Afonin A., Rahi P., Maluk M., James E.K., Cavassim M.I.A., Rashid M.H., Aserse A.A., Perry B.J., Wang E.T., Velázquez E., Andronov E.E., Tampakaki A., Flores Félix J.D., Rivas González R., Youseif S.H., Lepetit M., Boivin S., Jorin B., Kenicer G.J., Peix Á., Hynes M.F., Ramírez-Bahena M.H., Gulati A. & Tian C.-F. (2021). Defining the *Rhizobium leguminosarum* Species Complex. *Genes*, 12 (1) : 111-137.
- Yu Q., Chen Q., Elser J. J., He N., Wu H., Zhang G., Wu J., Bai Y. & Han X. (2010). Linking stoichiometric homeostasis with ecosystem structure, functioning and stability. *Ecology Letters*, 13 : 1390–1399.
- Zablotowicz R.M. & Focht D.D. (1981). Physiological characteristics of cowpea rhizobia evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. *Applied Environmental Microbiology*, 41: 679-685.
- Zablotowicz R.M. & Reddy K.N. (2004). Impact of Glyphosate on the Bradyrhizobium japonicum symbiosis with Glyphosate-resistant transgenic soybean : A minireview. *Journal of Environment Quality*, 33 : 825-831.
- Zhong Z., Lemke R.L. & Nelson L.M. (2009). Nitrous oxide emissions associated with nitrogen fixation by grain legumes. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 2283–2291.

Zinga M.K., Jaiswal S.K. & Dakora F.D. (2017). Presence of diverse rhizobial communities responsible for nodulation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in South African and Mozambican soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 93 (2): 1-16 .

ANNEXES

Annexe 1 : milieu YEM

Milieu YEM liquide (Yeast Extract Mannitol, Vincent, 1970) :

Mannitol	10 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrait de levure	0,5 g
H ₂ O distillée	1 litre

Pour le YEM solide : Ajouter 15 g d'Agar par litre + Rouge Congo pour une concentration finale de 0,0025 %.

Ajuster le pH à 6.8 et stériliser le milieu par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.

Annexe 2 : composition de la solution nutritive de Broughton & Dilworth sans azote

	Composants	Molarité des composants
Solution 1	CaCl ₂ , 2H ₂ O	2 M
Solution 2	KH ₂ PO ₄	1 M
Solution 3	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 M
	K ₂ SO ₄	0,5 M
	MnSO ₄ , H ₂ O	0,002 M
Solution 4	H ₃ BO ₃	0,004 M
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,001 M
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0, 004 M
	CoSO ₄ , 7H ₂ O	0,0002 M
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,0002 M
Solution 5	Fe-citrate	0,02 M

- Prendre 5 ml des solutions 1 à 4 et 1 ml de la solution 5, les ajouter à 5 litres d'eau distillée, puis diluer à 10 litres.

- Le pH doit être ajusté entre 6,6 et 6,8 avec du NaOH 1 N.

- Pour la solution nutritive azotée, ajouter 0,5 g/l de KNO

Annexe 3 : caractéristiques morphologiques des bactéries du haricot commun isolées

Isolats	Forme	Elév.	Couleur	Opacité	Bordure	Vit. C. (j)	Col. Gram
RPC101	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC102	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC103	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC104	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC105	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC106	Ovoïde	Bombé	Blanche	Opaque	Dentelé	2	Négative
RPC107	Sinusoïdale	Plate	Crème	Translucide	Dentelé	2	Négative
RPC108	Circulaire	Plate	Jaunâtre	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC109	Circulaire	Plate	Jaunâtre	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC110	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC111	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Dentelé	2	Négative
RPC112	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC113	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC114	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC115	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC116	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Dentelé	3	Négative
RPC117	Circulaire	Bombé	Blanche	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC118	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC119	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC120	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC121	Circulaire	Plate	Blanchâtre	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC201	Circulaire	Bombé	Blanchâtre	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC202	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC203	Circulaire	Plate	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC205	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC206	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC208	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC210	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC211	Circulaire	Bombé	Blanchâtre	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC212	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC213	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC214	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC215	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC216	Circulaire	Bombé	Blanchâtre	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC217	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC218	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC301	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC302	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC303	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC304	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC305	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC306	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC307	Circulaire	Concave	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative

RPC308	Circulaire	Plate	Blanchâtre	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC309	Circulaire	Plate	Blanchâtre	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC310	Circulaire	Bombé	Blanche	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC311	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC312	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC313	Circulaire	Bombé	Blanchâtre	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC314	Circulaire	Bombé	Blanche	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC315	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC401	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC402	Circulaire	Plate	Blanchâtre	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC403	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC404	Circulaire	Bombé	Blanche	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC405	Circulaire	Bombé	Blanche	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC406	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC407	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC408	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC409	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC410	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC411	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC412	Circulaire	Bombé	Blanche	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC413	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC414	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC415	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC416	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC417	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC418	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC419	Circulaire	Bombé	Blanche	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC420	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC421	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC422	Sinusoïdale	Bombé	Crème	Opaque	Dentelé	2	Négative
RPC423	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Dentelé	3	Négative
RPC424	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC425	Circulaire	Bombé	Blanche	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC426	Circulaire	Bombé	Blanche	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC427	Circulaire	Plate	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC428	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC429	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC430	Circulaire	Bombé	Blanche	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC431	Ovoïde	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC501	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC502	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC503	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC504	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC505	Ovoïde	Bombé	Jaunâtre	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC506	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC507	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Lisse	3	Négative

RPC508	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC509	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC510	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC511	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC512	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC513	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC514	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC515	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC516	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC517	Circulaire	Plate	Blanche	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC518	Circulaire	Plate	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC519	Circulaire	Bombé	Crème	Opaque	Lisse	3	Négative
RPC520	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	3	Négative
RPC521	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC522	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC523	Circulaire	Plate	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC524	Circulaire	Bombé	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative
RPC525	Circulaire	Plate	Crème	Opaque	Lisse	2	Négative
RPC526	Circulaire	Plate	Crème	Translucide	Lisse	2	Négative

RPC : Rhizobia de *Phaseolus vulgaris* en Côte d'Ivoire, Elèv. : élévation, D.C. : Diamètre des colonies, Vit. C : Vitesse de croissance ; Col Gram : Coloration de Gram.

**PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES ISSUES
DE LA THESE**

PUBLICATION 1

Marie-Paule Aboueuh Atsé, Mako François De Paul N’Gbesso, Ibrahim Konaté, Noupé Diakaria Coulibaly, Kouadio Amani, Katiénapariga Tayourou Yéo & Louis Butare (2023). Isolation and authentication of local rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in different agro-ecological zones of Côte d’Ivoire. *Advances in Microbiology*, 13: 435-447.

Isolation and Authentication of Local Rhizobia Nodulating Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Different Agro-Ecological Zones of Côte d'Ivoire

Marie-Paule Aboueuh Atsé^{1,2*}, Mako François De Paul N'Gbesso², Ibrahim Konaté¹, Noupé Diakaria Coulibaly², Kouadio Amani², Katiénapariga Tayourou Yéo², Louis Butare³

¹Department of Biochemistry-Microbiology, Jean Lorougnon Guédé University (UJLoG), Daloa, Côte d'Ivoire

²Research Station on Food Crops, National Center for Agronomic Research (CNRA), Bouaké, Côte d'Ivoire

³Crop Research Institute (CRI), Alliance of Biodiversity International and CIAT. C/O CSIR, Kumasi, Ghana

Email: *pauleatse@gmail.com

How to cite this paper: Atsé, M.-P.A., N'Gbesso, M.F.P., Konaté, I., Coulibaly, N.D., Amani, K., Yéo, K.T. and Butare, L. (2023) Isolation and Authentication of Local Rhizobia Nodulating Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Different Agro-Ecological Zones of Côte d'Ivoire. *Advances in Microbiology*, 13, 435-447.

<https://doi.org/10.4236/aim.2023.139028>

Received: August 3, 2023

Accepted: September 5, 2023

Published: September 8, 2023

Copyright © 2023 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Legumes such as common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) have been introduced into cropping systems for sustainable soil management. Consequently, the loss of fertility of the latter remains a major constraint to bean production because this legume is rarely fertilized, yet it is considered to be a poor nitrogen fixer in the absence of inoculation. To overcome this, this study was undertaken with the objective of seeking efficient local rhizobia in order to propose a bean inoculum formulation. To do this, soil samples taken from twelve localities in the Centre, North and West areas of Côte d'Ivoire were used to trap bean nodulating rhizobia. The ROBA1 bean accession used was sown in pots containing the sampled soils. Seedlings were uprooted at the start of flowering and nodulation was assessed. The isolates obtained were purified and then characterized phenotypically. The infectivity and symbiotic efficacy of these isolates were determined *in vitro* by the authentication test in which the purified isolates were reinoculated to their original host plant. A total of 24 rhizobium isolates were obtained from the soils of six localities. During morphological characterization, the isolates showed typical characteristics of Rhizobium. With the exception of RPC501, RPC505 and RPC522, all isolates were authenticated and able to nodulate the host plant in controlled culture. Isolates RPC502, RPC507, and RPC508 were effective and significantly increased ($P < 0.05$) nodule number and weight, height, and plant biomass. This study has, therefore, revealed the presence of effective local rhizobia in Ivorian soils and capable of nodulating common beans. A genetic characterization of efficient rhizobia identified after experimentation in different environmental

conditions should be considered before being recommended as bean rhizobia inoculant.

Keywords

Trapping, Native Rhizobia, Nodulation, Common Bean, Côte d'Ivoire

1. Introduction

Agriculture occupies a central place in the development and economy of Côte d'Ivoire. It represents 40% of the country's export earnings and generates nearly two-thirds of jobs. It is mainly based on export crops [1] [2]. Today, accelerated urbanization and the explosion of Ivorian demography have led to strong pressure on arable land [3]. To increase agricultural production, methods of natural soil fertilization by fallowing have been abandoned in favor of those based on the use of synthetic fertilizers and pesticides. These chemical inputs applied to the soil are costly and often inappropriate with harmful consequences on the environment and human health [4]. Thus, to sustainably restore soils while fighting food insecurity, the introduction of grain legumes such as dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) into cropping systems has been recommended [5]. Dry beans are a popular legume for their high protein (22.9%) and carbohydrate (60.6%) content. It is an inexpensive protein source in the diet of populations in developing countries [6]. In Côte d'Ivoire, bean production is estimated at 40,322 tons and is a source of income for rural households during lean periods [7]. Dry bean also has the ability to establish symbiotic associations with atmospheric nitrogen-fixing bacteria [8]. This symbiotic association, therefore, represents an economical and ecological way to improve agricultural productivity [9]. In Côte d'Ivoire, dry beans are used empirically by farmers as a crop precedent to fertilize the soil. However, studies have indicated that this legume has the least symbiosis with local strains of rhizobium [10]. In addition, the chemical inputs used in conventional agriculture would constitute a potential threat to the survival and efficiency of bacterial strains [11].

Thus, bean inoculation is necessary in the absence of compatible and efficient rhizobia for nitrogen fixation. Although many studies have been carried out in various countries on the performance of local rhizobia strains on bean productivity, there is little information on the use of local rhizobia strains in Côte d'Ivoire on beans [12] [13]. The present study, therefore, aims to select compatible and competitive local rhizobia for the cultivation of dry beans in Côte d'Ivoire.

2. Material and Methods

2.1. Experimentation Site

The study was conducted at the Food Crops Research Station of the National Center for Agronomic Research (SRCV/CNRA) in Bouaké located in the center

of Côte d'Ivoire at 7°46' North latitude, 5°06' west longitude and 375 m altitude [14].

2.2. Plant Material

The plant material consists of a bean accession HARI35/GHA19. It comes from the collection of genetic resources of the Vegetable and Protein Crops Program of the CNRA.

2.3. Methods

2.3.1. Soil Sampling and Rhizobia Trapping

Trapping rhizobia makes it possible to verify the absence or presence of the latter in a given soil. To do this, soil samples were taken from 12 localities in Côte d'Ivoire (Figure 1). They are: Béoumi, Botro, Bouaké, Bouaflé, Daloa, Djébonoua, Ferkessedougou, Gagnoa, Korhogo, Sakassou, Sinématiali, and Yamoussoukro. None of the plots sampled had beans as their previous crop.

At each site, five soil samples were taken in a zig-zag auger at a depth of 0 to 20 cm depth to form a composite sample.

The composite soil samples were homogenized and distributed in buckets of 4 L capacity, then three seeds were sown therein. The buckets were then arranged in a block arrangement under a shelter.

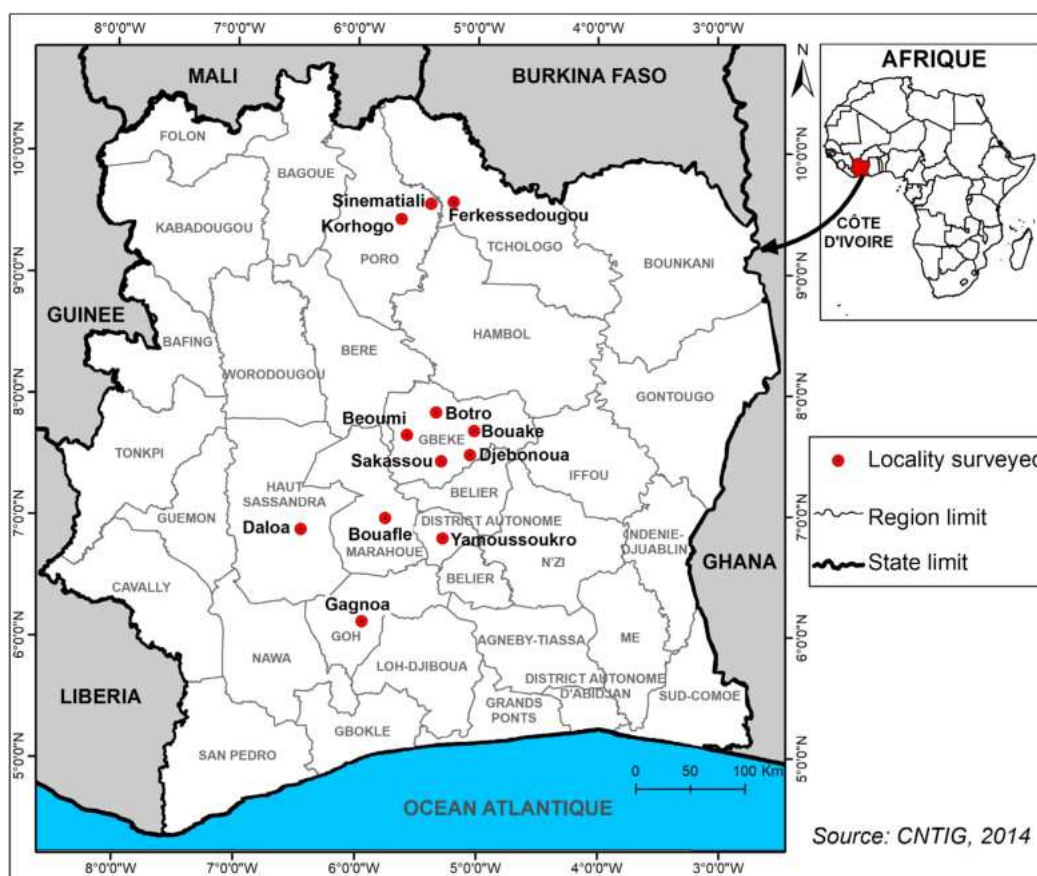


Figure 1. Map of agro-ecological sampling zones.

2.3.2. Isolation and Purification of Isolates

Rhizobia were isolated from sterile nodules and purified with the protocol using Yeast Extract Mannitol (YEM) agar supplied with 0.02% Congo red [15]. At flowering, the plants were de-potted and then their roots were examined to detect the presence of nodules. These were then detached from the roots to be sterilized on the surface with a 0.1% mercury chloride (HgCl_2) solution for 3 minutes. This disinfection was followed by rinsing in 10 successive baths of sterile distilled water. The nodule thus treated was crushed in 1 ml of sterile distilled water using a previously sterilized glass rod. A volume of 0.1 ml or 100 μL of the supernatant from the homogenate was withdrawn aseptically with a sterile pipette and spread using a spreader on the pre-poured and solidified YEM agar. It is composed of Mannitol (10 g/L), Yeast extract (1 g/L), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.46 g/L), KH_2PO_4 (0.12 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/L), NaCl (0.1 g/L) and Agar (14 g/L). The Petri dish was then incubated in an oven at 28°C.

After three to eight days of incubation, bacterial colonies with a gummy and translucent appearance, representative of rhizobia, were selected to be purified. Thus, the selected colonies were inoculated by transverse streaks on the YEM medium and incubated at 28°C for 2 to 6 days. The operation was repeated until pure isolate was obtained.

2.3.3. Authentication of Isolates

The bacterial colonies obtained after isolation and purification were inoculated into their original host plant in a sterile medium (substrate). This step is necessary to demonstrate that the isolates obtained are capable of inducing nodulation in their host plant. The identification of the isolates was carried out with 3 repetitions per isolate and an uninoculated control to ensure the aseptic conditions of the culture of the plant. The substrate used for this purpose was washed sea sand, sterilized and then transferred to greenhouse pots. Bean seeds were sterilized and sown as previously described.

The bacterial suspension which served as inoculum was obtained by subculturing the bacterial isolates in the YEM medium and incubated at 28°C for 48 hours. The seeds were inoculated one week after sowing with 1 ml of the broth solution of the inoculum. After sowing, the pots were watered preferably twice with distilled water and once with nutrient solution every week [16].

Three to four weeks after sowing, the plants were unpotted. The formation of root nodules indicates that the isolates are indeed bean nodulating rhizobia. Nodulation parameters and biomass were evaluated.

The pure bacterial colonies were inoculated to their original host plant in a sterile medium (substrate). This step is necessary to demonstrate that the isolates obtained are capable of inducing nodulation in their host plant. The identification of the isolates was carried out with 3 repetitions per isolate and an uninoculated control to ensure the aseptic conditions of the culture of the plant. The substrate used for this purpose was washed and sterilized sea sand then transferred to greenhouse pots. Bean seeds were sterilized and sown as previously de-

scribed. After sowing, the pots were watered preferably twice with distilled water and once with nutrient solution every week [16]. Upon seed emergence, the seedlings were inoculated with a bacterial suspension at the rate of 1 ml of the inoculum broth solution per seedling. This suspension was obtained by subculturing the bacterial isolates in YEM medium and incubated at 28°C for 48 hours.

Three to four weeks after sowing, the plants were unpotted. The formation of root nodules indicates that the isolates are indeed bean nodulating rhizobia. Nodulation parameters (number and weight of nodules) and biomass (fresh and dry biomass) as well as seedling size were evaluated.

2.4. Statistical Analyses of Data

All data were entered with Excel 2007 spreadsheet and analyzed using Statistica 7.1 software. The comparison of the means was made by an Analysis of Variance (ANOVA) at the probability threshold of 5%. When a significant difference was found between the treatments for a given parameter, Fisher's Least Significant Difference (LSD) test was performed at the 5% level to separate the means. All these analyses have been carried out.

3. Results and Discussion

3.1. Results

3.1.1. Assessment of the Rhizobial Potential of the Soils of the Côte d'Ivoire

The presence of symbiotic bacteria in the sampled soils, evidenced by the presence of nodules (Figure 2) on the roots of the bean, was observed in the plants tested. Indeed, plants grown on trapping soil formed functional nodules of red color (Figure 2) with local rhizobia.



Figure 2. Nodules induced on roots of common bean by local rhizobia. (1) Roots of bean plants showing bean nodules; (2) Longitudinal section of nodules: (a) Non-functional green nodule, (b) Nodule functional red nodule.

The analysis of variance revealed a significant difference ($P < 0.05$) between the nodulation and the origin of the soils (**Table 1**). The accession tested produced nodules in the soils of the localities of: Botro, Djébonoua, Ferkéssédougou, Gagnoa, Sakassou and Yamoussoukro. The number of nodules obtained with soils from Sakassou (31.17 nodules formed) was greater than those of other towns. However, no nodules were observed on the roots of plants from the soils of Béoumi, Bouaflé, Bouaké, Daloa, Korhogo and Sinématiali.

3.1.2. Isolation and Morphological Characterization of Bean Rhizobia

24 bacterial isolates were obtained from the nodules from the soil samples. These isolates presented various morphological aspects representative of bacteria belonging to the genus Rhizobiaceae (**Figure 3**). Indeed, the latter were composed of colonies of circular, convex or flat shape with a regular outline with a smooth transparent, gummy, translucent or opaque surface. They were whitish in color with sizes varying from 2 to 7 mm in diameter. In addition, all bacteria were found to be Gram negative.

3.1.3. Authentication of Bean Bacterial Isolates

The bacterial isolates obtained were authenticated on the basis of infectivity, *i.e.* the presence or absence of nodules on the roots of their host plant. The isolates were coded RPC (Rhizobia isolated from *Phaseolus vulgaris* in Côte d'Ivoire) followed by a number.

Of 24 bean bacterial isolates obtained from different soils in Côte d'Ivoire, 21 (representing a rate of 87.5%) induced nodulation of the roots of their host plant (**Table 2**). RPC501, RPC505, RPC522 and the non-inoculated control did not give nodules on the roots of the host plant. The isolates significantly influenced

Table 1. Average number of nodules per plant on the HARI35/GHA19 accession tested.

Sampling site	Average number of nodules per plant
Béoumi	0
Botro	14.50 ± 8.2
Bouaflé	0
Bouaké	0
Daloa	0
Djébonoua	27.50 ± 6.6
Ferkéssédougou	9.67 ± 12.6
Gagnoa	11.17 ± 19.3
Korhogo	0
Sakassou	31.17 ± 10.2
Sinématiali	0
Yamoussoukro	13.33 ± 9.3
Mean	8.95



Figure 3. Bacterial colonies obtained after purification of the isolates.

Table 2. Authentication of isolates and their effect on the number and weight of nodules in the HARI35/GHA19 accession.

Isolates	Presence of nodules	Number of nodules	Nodule weight (g)
Witness	–	0	0
RPC501	–	0	0
RPC502	+	9 ± 2.6defghi	0.26 ± 0.1abc
RPC503	+	7 ± 2.6fghij	0.05 ± 0.01bc
RPC504	+	17 ± 2.6abc	0.28 ± 0.2abc
RPC505	–	0	0
RPC506	+	2.7 ± 1.2ijk	0.26 ± 0.1abc
RPC507	+	18 ± 2ab	0.36 ± 0.1ab
RPC508	+	13.3 ± 2.3bcdef	0.28 ± 0.1abc
RPC509	+	18 ± 1.7ab	0.41 ± 0.2a
RPC510	+	7.7 ± 1.5fghi	0.27 ± 0.1abc
RPC511	+	0.7 ± 0.6jk	0.26 ± 0.1abc
RPC512	+	8.7 ± 0.6efghi	0.27 ± 0.1abc
RPC513	+	15 ± 3.6bcde	0.5 ± 0.2a
RPC514	+	9 ± 3.5defghi	0.26 ± 0.1abc
RPC515	+	4 ± 1.7hijk	0.26 ± 0.1abc
RPC516	+	6.7 ± 1.5ghij	0.26 ± 0.1abc
RPC517	+	15.3 ± 1.5bcd	0.28 ± 0.01abc
RPC518	+	10.7 ± 2.1cdefg	0.26 ± 0.1abc
RPC519	+	10.7 ± 1.5cdefg	0.27 ± 0.01abc
RPC520	+	10 ± 3.0defgh	0.26 ± 0.1abc
RPC521	+	23 ± 3.6a	0.54 ± 0.1a
RPC522	–	0	0
RPC523	+	5.7 ± 1.5ghijk	0.25 ± 0.01abc
RPC524	+	7 ± 2ghij	0.26 ± 0.1abc
Mean		8.76	0.25
Probability		<0.05	<0.05

Note: +: Presence of nodule; –: Absence of nodule. In each column, the means followed by the same letter are not significantly different at the 5% level according to Fisher's LSD test; T0: Control not inoculated.

($P < 0.05$) the number and weight of nodules (**Table 2**). In fact, the RPC521 isolate induced the formation of the greatest number of nodules (23 nodules). With regard to the weight of the nodules, the largest were observed in the RPC509, RPC513 and RPC521 isolates with values ranging from 0.41 to 0.54 g.

3.1.4. Evaluation of the Efficacy of Indigenous Bean Isolates

The 21 authenticated rhizobium isolates were selected for their ability to induce high biomass.

Bean inoculation with various rhizobium isolates significantly influenced fresh/dry biomass as well as seedling height compared to the uninoculated control (**Table 3**). Fresh biomass values varied from 1 g with isolate RPC502 to 5.16 g with isolate RPC508. As for the dry biomass, the largest material (0.74 g) was obtained with isolate RPC507. Regarding the height of bean seedlings, it varied between 9.7 cm with RPC514 and 37.6 cm with RPC507.

Table 3. Impact of local rhizobia on fresh/dry biomass and bean plant height.

Isolates	Fresh biomass (g)	Dry biomass (g)	Plant height (cm)
Witness	2.06 ± 0.7ab	0.33 ± 0.2ab	14.7 ± 1.3hijk
RPC502	1 ± 0.1b	0.32 ± 0.1ab	19.0 ± 4.9efghi
RPC503	1.56 ± 1ab	0.40 ± 0.3ab	19.9 ± 0.9efghi
RPC504	2.55 ± 0.7ab	0.50 ± 0.2ab	20.3 ± 1.7defghi
RPC506	1.58 ± 0.2ab	0.50 ± 0.1ab	14.5 ± 1.3ijk
RPC507	4.42 ± 2.3ab	0.53 ± 0.1ab	37.6 ± 3.7a
RPC508	5.16 ± 0.6a	0.74 ± 0.3a	27.3 ± 2.5bc
RPC509	4.44 ± 2.2ab	0.50 ± 0.2ab	25 ± 1.2bcde
RPC510	2.16 ± 1.6ab	0.23 ± 0.1b	19.7 ± 1.6efghi
RPC511	2.17 ± 1.7ab	0.43 ± 0.3ab	14.7 ± 0.6hijk
RPC512	1.58 ± 1.4ab	0.40 ± 0.2ab	25.5 ± 0.5bcde
RPC513	3.49 ± 1ab	0.50 ± 0.2ab	26.9 ± 1.9bcd
RPC514	2.55 ± 1.2ab	0.60 ± 0.1ab	9.7 ± 1.6k
RPC515	2.5 ± 0.9ab	0.23 ± 0.1b	17.8 ± 2.7fghij
RPC516	3.31 ± 0.4ab	0.51 ± 0.2ab	20.4 ± 0.9defghi
RPC517	2.58 ± 0.1ab	0.41 ± 0.1ab	19.5 ± 2.1efghi
RPC518	2.41 ± 0.7ab	0.40 ± 0.1ab	23 ± 1.4bcdef
RPC519	3.31 ± 1ab	0.50 ± 0.2ab	22.6 ± 3.6bcdefg
RPC520	3.25 ± 0.9ab	0.20 ± 0.1b	23.3 ± 2bcdef
RPC521	4.03 ± 1.8ab	0.40 ± 0.1ab	29 ± 1.7b
RPC523	2.28 ± 1ab	0.40 ± 0.1ab	21.7 ± 1.6cdefg
RPC524	2.36 ± 0.3ab	0.50 ± 0.1ab	21.4 ± 3.3cdefgh
Mean	2.65	0.43	20.82
Probability	<0.05	0.01	<0.05

Note: In each column, the means followed by the same letter are not significantly different at the 5% level according to Fisher's LSD test; T0: Control not inoculated.

3.2. Discussion

In this study, the results show the presence of local rhizobia that nodulate common bean in Ivorian soils without a history of common bean cultivation or inoculation. Kawaka *et al.* (2014) [12] in Kenya also demonstrated the presence of local rhizobia with no history of inoculation that can nodulate and fix nitrogen with the bean. These results show that the soils of Côte d'Ivoire in particular and of Africa in general naturally possess bean rhizobia. However, the seedlings from the soils of six sampled localities (Béoumi, Bouaflé, Bouaké, Daloa, Korhogo and Sinématiali) were free of nodules. These observations indicate that the Ivorian soils are poor in rhizobia capable of nodulating beans. Similar results were obtained by Elbana *et al.* (2009) [17] in Egypt. According to these authors, Egyptian soils do not have a sufficient number of *Rhizobium* spp compatible with beans. Indeed, the bean is not a plant native to Africa but rather to Central and South America [18]. This reason could explain this weak nodulation outside its original areas. Furthermore, it could also be due to biotic and abiotic factors such as high nitrogen availability, low phosphorus availability, soil salinity or micronutrient deficiency as well as competition from rhizobium strains and/or predation of rhizobia by protozoa or phages. The nodules collected were red in color indicating the presence of leghemoglobin, a protein essential for the nitrogen fixation process [19]. These nodules are known to contain and actively express the *nifH* genes which code for the synthesis of nitrogenase enzymes responsible for the reduction of N to NH₃ [20].

The morphological characteristics of the isolates based on Gram stain results and growth on YEMA medium are typical of rhizobia and confirmed the standard morphocultural characteristics of *Rhizobium* species as described by Vincent, 1970 [15]. The morphological characteristics of the isolates in the present study are similar to those reported by Kawaka *et al.* (2014) [13]. Previous studies have shown that the bean nodulates mainly with fast-growing rhizobia grouped under *R. gallicum* and *R. giardini* [21], *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* [22], *R. tropici* [23] and *R. etli* [24]. The bacterial colonies obtained were gummy in appearance, a sign of production of Exopolysaccharides (EPS) which could be an adaptive characteristic providing bacterium with protection against environmental factors such as: temperature, salinity and pH fluctuations in the soil [25]. Rhizobia able to withstand such environmental stresses might be suitable for inoculant development.

However, one of the important characteristics for identifying nodular isolates as rhizobia is to prove their ability to reinfect and form nodules on their host plant under controlled bacteriological conditions [26]. Thus, bacterial isolates isolated from bean nodules were authenticated on the basis of their infectivity. Following this test, 87.5% of the isolates obtained induced nodulation of the roots of their host plant. Isolates capable of reinfecting beans under controlled conditions are then considered bean *Rhizobium* isolates. These observations corroborate with those of Yadav *et al.* (2018) [13] in India. These authors have authenti-

cated 35 bacterial isolates of green bean capable of reinfecting their original host plant. For isolates RPC501, RPC505 and RPC522 that did not form nodules on the bean roots, several explanations can be given. It may have a deficiency in their invasive competence and requires the presence of helper microorganisms. In addition to the specificity between the two partners (bacteria-plant), several parameters can condition this phenomenon; the concentration of the inoculum, the presence of certain mineral elements, the loss of infectivity of the isolates and the uncontrolled experimental conditions [27]. Furthermore, several investigators have reported that the failure of nodulation and nitrogen fixation of the isolates could be attributed to the possibility of loss of rhizobial plasmids carrying the *nod* and *nif* genes [28] [29].

The absence of nodulation in the non-inoculated control demonstrates that the aseptic conditions were met. However, authentic isolates showed great diversity in their ability to infect the host plant and improve plant growth. They significantly influenced ($P < 0.05$) the number and weight of nodules. Indeed, the average nodulation ranged from 0.7 nodules to 23 nodules, showing the different ability of rhizobium isolates to infect the host plant. Almost all of the inoculated bean seedlings had fresh/dry biomass and higher height compared to the control, indicating that inoculation with native isolates improved plant growth and is, therefore, effective in the fixation of nitrogen. Houssain *et al.* (2012) [30] attributed this improvement in nodulation and biomass of inoculated plants to high nitrogen fixation incorporated in nitrogen biosynthesis. However, these parameters were not directly related to nodule count or nodule dry weight. This is in agreement with previous work, which showed that the number and dry weight of nodules are not appropriate to determine the effectiveness of a rhizobium-legume association [31]. The significant differences observed in fresh/dry biomass and bean seedling height show variability in the nitrogen-fixing capacity of the isolates and are among the essential characteristics to determine their symbiotic efficacy [32].

4. Conclusion

Soil samples taken from different localities in the northern, central and western regions of Côte d'Ivoire made it possible to isolate 24 bean bacterial isolates. 87% of these were able to re-infect the host plant. Of these isolates, RPC502, RPC507, and RPC508 were more efficient and effective. The genetic identity of these native rhizobia with promising symbiotic and agronomic traits should be established. Therefore, these should be subjected to further field trials to verify their stability under different environmental conditions before being recommended as a bean rhizobium inoculant.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

References

- [1] Deheuvels, O., Assiri, A.A., Flori, A., Petithuguenin, P. and Kébé, B.I. (2003) Planting and Replanting Techniques among Ivorian Cocoa Smallholders. *14th International Cocoa Research Conference*, Accra, 13-18 October 2003, 1 p.
- [2] Youan Bi, T.B.A. (2016) Institutions de microfinance et prêteurs informels de l'agriculture familiale en Côte d'Ivoire: De la cohabitation à la fusion. *Éthique et Économique*, **13**, 48-63. (In French)
- [3] Koné, M., Kouadio, Y.L., Neuba, D.F.R., Malan, D.F. and Coulibaly, L. (2014) Évolution de la couverture forestière de la Côte d'Ivoire des années 1960 au début du 21ème siècle. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, **7**, 782-794. (In French)
- [4] Konaté, I., Amani, K., Koffi, M., Guei, R.N.K., Ouattara, A., Tonessia, C.D., *et al.* (2015) Effect of Herbicides on Rhizobacteria Density in Experimental Fields and on Bacterial Strains Survival *In-Vitro*. *International Journal of Current Research*, **5**, 16361-16365.
- [5] Ahemad, M. and Khan, M.S. (2011) Response of Green Gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) Grown in Herbicide-Amended Soil to Inoculation with Bradyrhizobium sp (Vigna) MRM6. *Journal of Agricultural Science and Technology*, **13**, 1209-1222.
- [6] Ntamwira, B.J., Mirindi, C.T., Pyame, M.L.D., Dhed'a, D.B., Bumba, M.E., Moango Manga, A.K.W., *et al.* (2017) Évaluation agronomique des variétés de haricot volubile riches en micronutriments dans un système intégré d'Agroforesterie sur deux sols contrastés à l'Est de la RD Congo. *Journal of Applied Biosciences*, **114**, 11368-11386. (In French) <https://doi.org/10.4314/jab.v114i1.10>
- [7] Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (2020) Continuer à promouvoir les légumineuses à grains. <https://www.fao.org/news/story/fr/item/454250/icode>
- [8] Faghire, M., Bargaz, A., Farissi, M., Palma, F., Mandri, B., Lluch, C., *et al.* (2011) Effect of Salinity on Nodulation, Nitrogen Fixation and Growth of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Inoculated with Rhizobial Strains Isolated from the Haouz Region of Morocco. *Symbiosis*, **55**, 69-75. <https://doi.org/10.1007/s13199-011-0144-0>
- [9] Gholami, A., Biyari, A., Gholipoor, M. and Rahmani, H.A. (2012) Growth Promotion of Maize (*Zea mays* L.) by Plant-Growth Promoting Rhizobacteria under Field Conditions. *Soil Science and Plant Analysis*, **43**, 1263-1272. <https://doi.org/10.1080/00103624.2012.666302>
- [10] Polania, J., Poschenrieder, C., Rao, I. and Beebe, S. (2016) Estimation of Phenotypic Variability in Symbiotic Nitrogen Fixation Ability of Common Bean under Drought Stress Using ¹⁵N Natural Abundance in Grain. *European Journal of Agronomy*, **79**, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.05.014>
- [11] Ghimire, R., Huang, W.C. and Pouled, M.P. (2015) Adoption Intensity of Agricultural Technology: Empirical Evidence from Smallholder Maize Farmers in Nepal. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, **1**, 139-146.
- [12] Kawaka, F., Dida, M.M., Opala, P.A., Ombori, O., Maingi, J. and Osoro, N. (2014) Symbiotic Efficiency of Native Rhizobia Nodulating Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Soils of Western Kenya. *International Scholarly Research Notices*, **2014**, Article ID: 258497. <https://doi.org/10.1155/2014/258497>
- [13] Yadav, S.K., Raverkar, K.P., Ramesh, C., Navne, P. and Subhash, C. (2018) Isolation, Authentication and Evaluation of Rhizobial Isolates from the Soils of North-West

- Himalayas in French Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **7**, 141-149.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.712.018>
- [14] N'zi, J.C., Kouamé, C., N'gueta, A.S.P., Fondio, L., Djidji, A.H. and Sangaré, A. (2010) Evolution des populations de Bemisia tabaci Genn. Selon les variétés de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) au Centre de la Côte d'Ivoire. *Sciences & Nature*, **7**, 31-40. (In French) <https://doi.org/10.4314/scinat.v7i1.59918>
- [15] Vincent, J.M. (1970) Manual for Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Hand Book No. 15, Blackwell, Edinburgh, 73-97.
- [16] Woomer, P.L., Karanja, N., Kisamuli, S.M., Murwira, M. and Bala, A. (2011) A Revised Manual for Rhizobium Methods and Standard Protocol Available on the Project Website. 69 p. <https://www.N2africa.org>
- [17] Elbanna, K., Elbadry, M. and Gamal-Eldin, H. (2009) Genotypic and Phenotypic Characterization of Rhizobia That Nodulates Nap Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Systematic and Applied Microbiology*, **32**, 522-530.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.07.006>
- [18] Wortmann, C.S. (2006) *Phaseolus vulgaris* L.—Haricot Sec. In: Brink, M. and Belay, G., Eds., *PROTA 1: Cereals and Pulses/ Céréales et légumes secs*, PROTA, Wageningen, 164-171. (In French)
- [19] Farid, M. and Navabi, A. (2015) N₂ Fixation Ability of Different Dry Bean Genotypes. *Canadian Journal of Plant Science*, **95**, 1243-1257.
<https://doi.org/10.4141/cjps-2015-084>
- [20] Rondon, M.A., Lehmann, J., Ramírez, J. and Hurtado, M. (2007) Biological Nitrogen Fixation by Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Increases with Bio-Char Additions. *Biology and Fertility of Soils*, **43**, 699-708.
<https://doi.org/10.1007/s00374-006-0152-z>
- [21] Amarger, N., Macheret, V. and Laguerre, G. (1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* Nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**, 996-1006.
<https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-996>
- [22] Jordan, D.C. (1984) Rhizobiaceae. In: Krieg, N.R. and Holt, J.G., Eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, The Williams and Wilkins, Baltimore, 234-235.
- [23] Martinez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P. and Pardo, M.A. (1991) *Rhizobium tropici*, a Novel Species Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **41**, 417-426. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-417>
- [24] Segovia, L., Young, J.P. and Martinez-Romero, E. (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* Type I Strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **43**, 374-377.
<https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-374>
- [25] Karthik, C., Oves, M., Sathya, K., Sri Ramkumar, V. and Arulselvi, P.I. (2017) Isolation and Characterization of Multi-Potential Rhizobium Strain ND2 and Its Plant Growth-Promoting Activities under Cr(VI) Stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, **63**, 1058-1069. <https://doi.org/10.1080/03650340.2016.1261116>
- [26] Graham, J.W. (1991) An Essay on Organizational Citizenship Behavior. *Employee Responsibilities and Rights Journal*, **4**, 249-270. <https://doi.org/10.1007/BF01385031>
- [27] Belhadi, D. (2003) Evaluation de la diversité des rhizobia de Medicago truncatula des régions salées de Béjaia. Etude de l'effet osmoprotecteur d'Ulva lactuca contre le

- stress salin. Thèse de Magister en Microbiologie, Université de Béjaia, Béjaia, 74 p. (In French)
- [28] Girard, M.L., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R. and Davila, G. (1991) Structural Complexity of the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Journal of Bacteriology*, **173**, 2411-2419. <https://doi.org/10.1128/jb.173.8.2411-2419.1991>
- [29] Moawad, H., Abdel-Rahim, W.M. and Abdel-Haleem, D. (2004) Performance of Phaseolus Bean Rhizobia in Soils from the Major Production Sites in the Nile Delta. *Comptes Rendus Biologies*, **327**, 445-453. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2004.03.005>
- [30] Hossain, A.K.M.M., Mian, M.H., Hakim, M.A., Islam, M.M. and Ferdous, J. (2012) Isolation and Selection of Bradyrhizobium from the Root Nodules of Indigo Plants (*Indigofera tinctoria* L.). *Africa Journal of Biotechnology*, **11**, 12183-12191. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1288>
- [31] Muthini, M., Maingi, J.M., Muoma, J.O., Amoding, A., Mukaminega, D. and Osoro, N. (2014) Morphological Assessment and Effectiveness of Indigenous Rhizobia Isolates That Nodulate *P. vulgaris* in Water Hyacinth Compost Testing Field in Lake Victoria Basin. *British Journal of Applied Science, Technology*, **4**, 718-738. <https://doi.org/10.9734/BJAST/2014/5757>
- [32] Sharma, A., Johri, B.N., Sharma, A.K. and Glick, B.R. (2003) Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas* sp. Strain GRP3 Influences Iron Acquisition in Mung Bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 887-894. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00119-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00119-6)

PUBLICATION 2

Marie-Paule Aboueuh Atsé, Mako François De Paul N’Gbesso, Allepo Innocent Abé, Noupé Diakaria Coulibaly, Katiénapariga Tayourou Yéo, Louis Butare & Ibrahim Konaté (2024). Diversity and Phylogeny of Symbiotic Bacteria Nodulating Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Côte d’Ivoire. *Microbiology Research Journal International*, 34 (7) : 45-53.



Diversity and Phylogeny of Symbiotic Bacteria Nodulating Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Côte d'Ivoire

**Marie-Paule Aboueuh Atse ^{a,b*},
Mako François De Paul N'gbesso ^b, Allepo Innocent Abe ^a,
Noupé Diakaria Coulibaly ^b, Katiénapariga Tayourou Yeo ^b,
Louis Butare ^c and Ibrahim Konate ^a**

^a Agrovalorization Laboratory, Department of Biochemistry-Microbiology, UFR Agroforestry, Jean Lorougnon Guédé University (UJLoG), BP 150 Daloa, Ivory Coast.

^b National Agronomic Research Center (CNRA), Food Crops Research Station, Vegetable and Protein Crops Program, 01 BP 633 Bouaké 01, Ivory Coast.

^c Alliance of Biodiversity International and CIAT. C/O CSIR - Crop Research Institute (CRI), P.O. Box 3785, Fumesua - Kumasi, Ghana.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: <https://doi.org/10.9734/mrji/2024/v34i71457>

Open Peer Review History:

This journal follows the Advanced Open Peer Review policy. Identity of the Reviewers, Editor(s) and additional Reviewers, peer review comments, different versions of the manuscript, comments of the editors, etc are available here: <https://www.sdiarticle5.com/review-history/117524>

Original Research Article

Received: 28/03/2024

Accepted: 01/06/2024

Published: 12/06/2024

ABSTRACT

Phaseolus vulgaris L. (common bean) is an agriculturally important legume that benefits from a symbiosis with bacteria belonging to the genus *Rhizobium*. Growing interest in the use of rhizobia as biofertilizers has led to the identification of a large number of rhizobia strains and studies of their

*Corresponding author: E-mail: pauleatse@gmail.com;

diversity. Although much research has been carried out on rhizobia, there is little data on the diversity of rhizobia associated with common bean in Côte d'Ivoire. This study assessed the species diversity of common bean nodulating bacteria in ivoirian soils. This diversity was assessed based on 16S rRNA gene sequencing. Ten high-performance bacterial isolates extracted from common bean nodules were used for genetic analysis. The 16S rRNA gene sequences of the native isolates were closely affiliated with members of the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium* and *Sinorhizobium* demonstrating the presence of a diversity of native bean nodule bacteria. This study also reports for the first time the presence of *Allorhizobium taibaishanense* in common bean nodules. These results constitute an important step in the development of an effective microbial inoculum and sustainable food production.

Keywords: Diversity; rhizobia; common bean; sequencing; 16S rRNA; phylogeny.

1. INTRODUCTION

The common bean, its scientific name *Phaseolus vulgaris*, is a very important legume in the human diet thanks to its richness in proteins, minerals and vitamins [1]. This legume establishes a symbiotic link with rhizobial bacteria for the fixation of atmospheric nitrogen. This allows it to grow in nitrogen-deficient soils [2]. Native to South and Mesoamerica, the plant is currently widely cultivated in tropical and temperate regions around the world [3].

Previously, the rhizobia capable of nodulating *P. vulgaris* were all attributed to a single species named *Rhizobium leguminosarum* [4]. In recent years, the taxonomy of these rhizobia has evolved significantly due to progressive discoveries of greater rhizobial diversity which correlates with the development of new technologies. To date, seven species of rhizobia have been identified as major microsymbionts of common bean. These are *Rhizobium etli* [5], *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium tropici* [6], *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii* [7], *Rhizobium phaseoli* [8] and *Sinorhizobium meliloti* [9]. All these species have been discovered in America as well as in Europe and Africa [10,11,12].

Although agronomic information on beans in Africa is legion, studies of the specific diversity of rhizobia which nodulate this plant are rare. Indeed, with the exception of the research by Diouf et al. [13] carried out in Senegal, very little information is available on bean rhizobia in West Africa, particularly in Côte d'Ivoire. However, beans are a promising legume for local Ivorian consumption. In addition, the country's statistics could not provide any data on national bean production because this crop would be considered marginal. It is practiced by small producers, particularly women in rural areas [14].

In addition, producers use traditional varieties with low yields without fertilizer to grow beans [15]. Faced with all these constraints, inoculation technology using rhizobacteria associated with common beans could constitute an alternative to the use of agrochemical products to increase its production and enhance its cultivation. Therefore, the characterization of rhizobia related to common bean in Ivorian soils constitutes one of the important steps towards the development of an inoculant with the potential to improve the production of this crop in Côte d'Ivoire. It is in this context that this study takes place, the aim of which is to identify the species of local bacteria which nodulate common beans in Ivorian soils.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Bio-collection

The biological material is composed of bacterial isolates. The latter were isolated from the roots of common bean grown in soil samples collected in different agroecological zones of Côte d'Ivoire. The isolates used in this study were found to be the most efficient on common bean production during field evaluation. These are isolates RPC109, RPC114, RPC115, RPC208, RPC304, RPC404, RPC410, RPC430, RPC431 and RPC509.

2.2 Molecular Characterization of Isolates

2.2.1 DNA extraction

The extraction of genomic DNA from bacterial isolates was carried out using the phenol-chloroform method applied to a bacterial culture in YEM medium [16]. After bacterial lysis, the samples were treated in a mixture of 500 µl of phenol/chloroform/isoamyl alcohol in a ratio of 25:24:1 and then centrifuged for 10 minutes at

12,000 rpm. The DNA pellet was obtained by adding sodium acetate solution and absolute ethanol. The resulting DNA extract was suspended in 100 µl of TE solution and stored at - 20°C. The concentration and purity of the extracted DNA were determined at 260 and 280 nm using the Nanodrop Spectrophotometer [17].

2.2.2 PCR amplification of 16S rRNA gene

The 16S rRNA region of rhizobia isolates was amplified using primers FD1 (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) and RD1 (5-AAGGAGGTGATCCAGCC-3) as previously described by Weisburg et al. [16]. The PCR reaction was carried out in a total volume of 25 µL containing 12.5 µL of MasterMix, 1 µL of each of the primers, 9.5 µL of water and 1 µL of template DNA extract. The resulting mixtures were incubated in a thermal cycler under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 3 min followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, extension at 72 °C for 2 min and a final extension at 72 °C for 3 min. The fragments of the 16S rDNA gene were revealed by horizontal electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel stained with BET (100 mg/mL) in TAE buffer. The migration was done for 45 min at 100 volts and finally the bands were visualized under ultraviolet light and photographed using a transilluminator.

2.2.3 Sequencing and analysis of the 16S rRNA gene

The PCR products were transferred to Inqaba Biotech (Pretoria, South Africa) for purification and sequencing by the automated Sanger method. The 16S rRNA sequences of the amplicons were determined using the ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems, USA).

2.2.4 Analysis of sequencing data

2.2.4.1 The 16 S rRNA Sequences assignment for species rhizobia identification

An *in silico* analysis of ribosomal DNA sequences was carried out to identify common bean rhizobium species. To do this, the Forward and reverse sequences of the 16S rRNA gene were aligned with reference sequences from the GenBank database using the clustal X program and the BLAST tool (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nih.gov>).

2.2.4.2 Phylogenetic analysis

First of all, a multiple alignment of the sequences from this study and the reference sequences from Genbank was carried out using the clustal W program. The evolutionary history of the isolates was presented in the form of a dendrogram using the maximum likelihood method based on the Tamura-Nei model [18]. The tree with the highest log likelihood (bootstrap values ≥ 50%) was displayed. It was drawn to scale, with branch lengths measured in number of substitutions per site. The proportion of sites where at least one unambiguous base is present in at least one sequence for each descendant clade is shown next to each internal node in the tree. The analysis focused on 18 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Non-coding. All positions containing gaps and missing data have been eliminated. There were a total of 133 positions in the final dataset. This evolutionary or phylogenetic analysis of rhizobia species was carried out in MEGA version 11 software [19].

3. RESULTS

3.1 Molecular Characteristic of Rhizobia Isolates

PCR amplification of the genomic region of the 16S rRNA of the 10 bacteria isolated from the nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) generated, on agarose gel, a single DNA band of approximately 1500 bp (Fig. 1).

3.2 Affiliation of 16S rRNA Gene Sequences of Bean Bacterial Isolates

Analysis of the 16S rRNA sequences of the isolates in this study shows that they identify with several species of bacteria (Table 1). Thus, isolate RPC109 from the locality of Djébonoua shares a similarity of 99.47% with the species *Allorhizobium taibaishanense* whose accession number is MG851723.1. The isolate RPC115 from the locality of Gagnoa is close to the species *Rhizobium tropici*, the sequence of which is accessible at number MG852217.1 with an identity percentage of 99.29%. The rhizobia RPC114, RPC208, RPC410 and RPC509 isolated from the soils of the locality of Ferkéssédougou, identify respectively with the species *Rhizobium pusense* (MW513398.1; 97.80%), *Rhizobium* sp. (KT387838.1; 95.27%), *Rhizobium leguminosarum* (KY940047.1; 96.40%) and *Sinorhizobium* sp. (EF173322.1;

Table 1. Characteristics of the coding sequences of the 16s region of rhizobia strains

Isolates	Collection site	Sequence length	Reference organism	Accession number	Accession length	Identity percentage	E-Valeur
RPC109	Djébonoua	1174	<i>Allorhizobium taibaishanense</i>	MG851723.1	568	99.47%	0.0
RPC114	Ferkéssédougou	1222	<i>Rhizobium pusense</i>	MW513398.1	1299	97.80%	0.0
RPC115	Gagnoa	1198	<i>Rhizobium tropici</i>	MG851722.1	567	99.29%	0.0
RPC208	Ferkéssédougou	1191	<i>Rhizobium sp.</i>	KT387838.1	1401	95.27%	0.0
RPC304	Botro	1226	<i>Allorhizobium taibaishanense</i>	MG851723.1	568	97.71%	0.0
RPC404	Botro	1173	<i>Allorhizobium taibaishanense</i>	MG851723.1	568	99.65%	0.0
RPC410	Ferkéssédougou	1197	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	KY940047.1	844	96.40%	0.0
RPC430	Yamoussoukro	1306	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	KY940048.1	832	96.46%	0.0
RPC431	Yamoussoukro	1222	<i>Rhizobium phaseoli</i>	KF638348.1	1495	98.10%	0.0
RPC509	Ferkéssédougou	1250	<i>Sinorhizobium sp.</i>	EF173322.1	1464	83.03%	2,10 ⁻³²

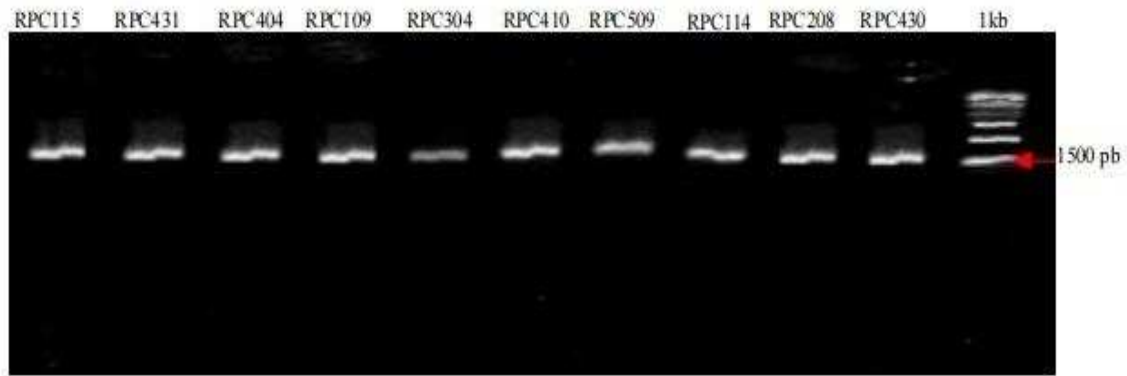


Fig. 1. Gel electrophoresis image of PCR-amplified 16S rRNA gene of 10 bacterial isolates on 1.4% agarose gel

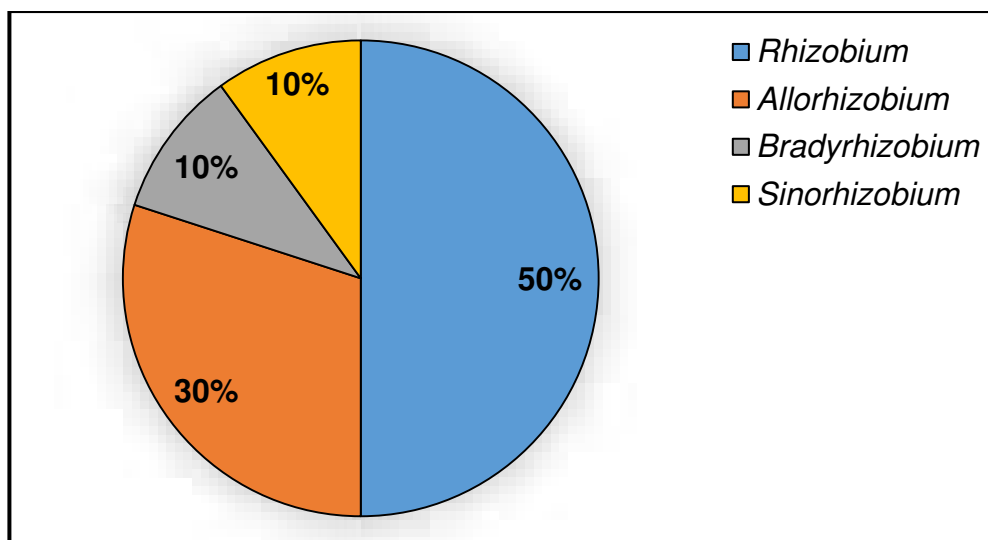


Fig. 2. Distribution of genera of rhizobiaceae nodulating common bean

83.03%). Isolate RPC430 from the Yamoussoukro locality aligns with the species *Bradyrhizobium japonicum* (KY940048.1) at 96.46% identity and with the species *Rhizobium leguminosarum* (KY940047.1) at 96.39% identity. As for isolate RPC431, it identifies with the species *Rhizobium phaseoli* (KF638348.1) with a similarity rate of 98.10%. The two isolates RPC304 and RPC404 from the locality of Botro identify with the species *Allorhizobium taibaishanense* (MG851723.1) with identity percentages of 97.71 and 99.65%, respectively.

In total, the analysis of the 16S RNA sequences of the isolates revealed diversity in this bacterial pool composed of four bacterial genera: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium* and *Sinorhizobium*. The profile of this diversity is dominated by the *Rhizobium* genus, representing

alone 50% of the bacterial genera identified in this study, followed by the *Allorhizobium* genus with a frequency of 30% (Fig. 2). The genera *Bradyrhizobium* and *Sinorhizobium* are the least represented with a frequency of 10% (Fig. 2). In the genus *Rhizobium* we find species such as *Rhizobium pusense*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli* and *Rhizobium tropici*.

3.3 Taxonomic Structure of Isolates

Phylogenetic analysis made it possible to identify five bacterial groups. In these groups, the ten study isolates were closely related to the rhizobia reference strains in GenBank with the exception of RPC509 (Fig. 3). Thus in group I, the RPC114 isolate is linked to the reference strain *Rhizobium pusense*. Group II is composed of isolates RPC208 and RPC431 closely related to the

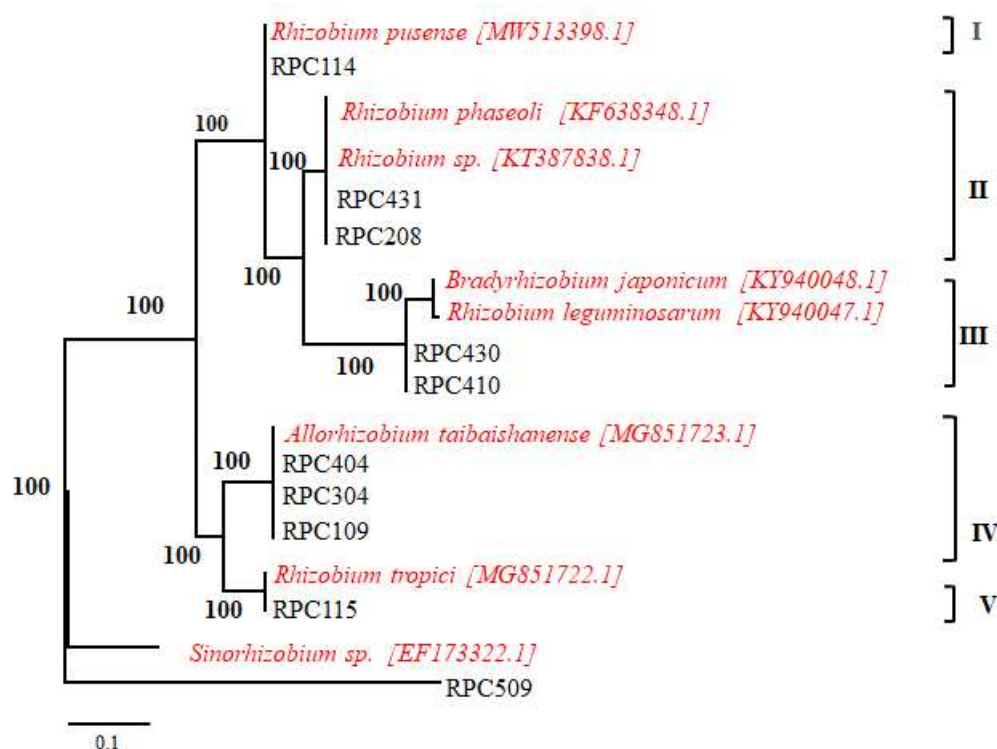


Fig. 3. Maximum likelihood phylogenetic tree deduced from 16S rDNA gene sequences of local rhizobia isolated from common bean

reference strains *Rhizobium sp* and *Rhizobium phaseoli* respectively. In group III, a phylogenetic relationship is observed between isolates RPC410 and RPC430 with the reference strains *Rhizobium leguminosarum* and *Bradyrhizobium japonicum*. The isolates RPC109, RPC304 and RPC404 are found in group IV with a sequence similarity of 97.71 and 99.65% to the *Allorhizobium taibaishanense* strain. Finally, group V includes the RPC115 isolate closely related to the reference strain *Rhizobium tropici*.

4. DISCUSSION

Amplification of partial 16S rRNA gene sequences of the isolates using specific primers generated a single band of approximately 1,500 base pairs. This is generally the approximate fragment size of that target gene that is commonly used for bacterial identification [20].

Analysis of the 16S rRNA sequences of isolates from the different agroecological regions of Côte d'Ivoire showed that the symbiotic bacteria of common bean are very diverse. The profile of this diversity is dominated by species belonging to the genus *Rhizobium*. This result is corroborated by several authors who in their work showed that the symbiont bacteria isolated

from *P. vulgaris* nodules on different continents mainly belong to the genus *Rhizobium* [21,22,23,24]. This is because unlike other *Phaseolus* species which associate with *Bradyrhizobium*, the common bean shows a clear preference for the genus *Rhizobium* [10].

The genus *Rhizobium* was represented by four species of bacteria which are *Rhizobium pusense*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli* and *Rhizobium tropici*. These species were previously isolated from common bean nodules by Gunnabo et al. [25] in Ethiopia; Torrez-Gutiérrez et al. [26] in Ecuador and by Gunununu et al. [27] in Eswatini. These species are considered to be the predominant species isolated from bean nodules in the Andean region, their native area [25,28]. The spread of *P. vulgaris* microsymbionts to other continents would have been made thanks to its grains [27] and would suggest its possible mode of migration in its American [10], European centers of diversification [29], African [21,25] and Asian [30].

This study also revealed that in addition to the genus *Rhizobium*, there are other phylogenetically related bacterial genera that could nodulate common bean. Indeed, the study

noted the presence of species belonging to the genera *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium* and *Sinorhizobium*. These results indicate a strong nodulation promiscuity of *P. vulgaris* with various nitrogen-fixing bacteria in the soils of Côte d'Ivoire. They corroborate the studies carried out by Shamseldin & Velázquez [24] which reveal the promiscuity of the common bean.

Just like the species *Rhizobium sullae*, mycosymbiont of *Hedysarum coronarium* L., discovered for the first time in common bean by Soares et al [31], *Allorhizobium taibaishanense* would be isolated and identified for the first time in this plant through this study. *Allorhizobium taibaishanense* is a recently discovered species in *Kummerowia stratia* and described by Yao et al. [32]. The discovery of this new species of bacteria in common bean could be explained by the evolutionary nature of rhizobia due to a transfer of symbiotic plasmids between species.

Based on the symbiotic efficiency results, all rhizobium strains showed bean nodulation potential. However, the phylogenetic structure showed that these strains were not closely related. This would suggest that the rhizobia strains in the study are not restricted to one phylogenetic group [33].

5. CONCLUSION

The results of the study noted the presence of a wide diversity of bacteria which nodulate beans in Ivory Coast. These isolates were divided into four genera including *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium* and *Sinorhizobium*. Some of the bacterial species discovered in this study, notably *Allorhizobium taibaishanense*, had never previously been described as endosymbionts of *P. vulgaris*. In view of their agronomic and symbiotic performances, these isolates should be subjected to more in-depth investigations under different environmental conditions. Such research will provide a better understanding of the symbiosis between *P. vulgaris* and rhizobial bacteria. They will also make it possible to determine whether these promising strains can be used as effective commercial inoculants, thus contributing to the sustainability of cropping systems.

DISCLAIMER (ARTIFICIAL INTELLIGENCE)

Author(s) hereby declare that NO generative AI technologies such as Large Language Models

(ChatGPT, COPILOT, etc) and text-to-image generators have been used during writing or editing of manuscripts.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Uebersax MA, Cichy KA, Gomez FE, Porch TG, Heitholt J, Osorno JM et al. Dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a vital component of sustainable agriculture and food security. A review. Leg. Sci. 2023;5(1):155-168.
2. Sánchez AC, Gutiérrez RT, Santana RC, Urritia AR, Fauvart M, Michiels J, et al. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. Eur. J. Soil Biol. 2014;62:105-112.
3. Cortinovis G, Frascarelli G, Di Vittori V, Papa R. Current state and perspectives in population genomics of the common bean. Plants. 2020;9:330;
4. Koskey G, Mburu SW, Kimiti JM, Ombori O, Maingi JM, Njeru EM. Genetic characterization and diversity of *Rhizobium* isolated from root nodules of mid-altitude climbing bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. Front. Microbiol. 2018;9: 968-980.
5. Segovia L, Young JPW, Martinez-Romero E, Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov., Int. J. Syst. Bacteriol. 1993;43:347–377.
6. Martinez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA. *Rhizobium tropica*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* bean and *Leucaena* sp. Trees. Int. J. Syst. Bacteriol. 1991;41:417–426.
7. Amarger N, Macheret V, Laguerre G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int. J. Syst. Bacteriol. 1997;47:996–1006.
8. Jordan DC., Family III *rhizobiaceae*, in: Krieg NR, Holt J.G, editors. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984.

9. Garcia-Fraile P, Mulas-Garcia D, Peix A, Rivas R, GonzalezAndres F, Velazquez E. *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two nodC alleles present in American *Rhizobium etli* strains: Biogeographical and evolutionary implications. Can J Microbiol. 2010; 56:657–666.
10. Aguilar OM, Collavino MM, Mancini U. Nodulation competitiveness and diversification of symbiosis genes in common beans from the American centers of domestication. Scie. Rep. 2022;12:4591.
11. Efstathiadou E, Ntatsi G, Savvas D, Tampakak AP. Genetic characterization at the species and symbiovar level of indigenous rhizobial isolates nodulating *Phaseolus vulgaris* in Greece. Scie. Rep. 2021;11:8674.
12. Wekesa CS, Furch ACU, Oelmüller R. Isolation and characterization of high-efficiency rhizobia From Western Kenya Nodulating With Common Bean. Front. Microbiol. 2021;12:697567. DOI: 10.3389/fmicb.2021.697567
13. Diouf A, de Lajude P, Neyra M, Kersters K, Gillis M, Martinez E, et al. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000;50 (1): 159-170.
14. PNIA. Rapport final Novembre 2017. Abidjan(Côte d'Ivoire). 2017 ;156.
15. Coulibaly ND, N'gbesso MFDP, Gadjé AG, Ossey C-L, Fondio L, Berthé ID, et al. Agromorphologic characterisation of local and introduced Common Bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) varieties performances in Côte d'Ivoire central region. J. Anim. Plant Sci. 2021;48(1):8566-8580.
16. Chen W, Tsong-teh K. A simple and rapid method for the preparation of gram negative bacterial genomic DNA. Nucl. Acids. Res. 1993;21:2260-2260.
17. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol. 1991;173(2):697–703.
18. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 1987;4(4):406-425.
19. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 2018;35:1547-1549.
20. Gueï NKR. Caractérisation moléculaire et phénotypique des bactéries symbiotiques et associatives isolées des nodules du pois bambara [*Vigna subterranea* (L.) Verdc.]. Thèse de Doctorat en Microbiologie des sols et Biologie Moléculaire, UFR Agroforesterie, Université Jean Lorougnon Guede, Daloa, Côte d'Ivoire; 2019.
21. Zinga MK, Jaiswal SK, Dakora FD. Presence of diverse rhizobial communities responsible for nodulation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in South African and Mozambican soils. FEMS Microbiol Ecol. 2017;93(2):236.
22. Mwenda GM, O'Hara GW, De Meyer SE, Howieson JG, Terpolilli JJ. Genetic diversity and symbiotic effectiveness of *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia in Kenya. Syst Appl Microbiol. 2018;41:291–299.
23. Huo Y, Tong W, Wang J, Wang F, Bai W, Wang E, et al. *Rhizobium chutanense* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in China. Int J Syst Evol Microbiol. 2019;69: 2049–2056.
24. Shamseldin A, Velázquez E. The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: A review. W. J. Microbiol. and Biotech. 2020;63(36):63-75.
25. Gunnabo AH, Geurts R, Wolde-meskel E, DegefuT, Giller KE, van Heerwaarden J. Phylogeographic distribution of rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. FEMS Microbiol. Ecol. 2021;97(4):46.
26. Torres-Gutiérrez R, Granda-Mora KI, Saltos KRB, Robles-Carrión AR. Rhizobium diversity is the key to efficient interplay with *Phaseolus vulgaris*. Case of study of southern ecuador. Adv. Dom. Environ. Biotech. 2021 ;521–548.
27. Gunununu RP, Mohammed M, Jaiswal SK, Dakora FD. Phylogeny and symbiotic effectiveness of indigenous rhizobial microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Malkerns, Eswatini. Scie. Rep. 2023;13:17029.
28. Young JPW, Moeskjær S, Afonin A, et al. Defining the *Rhizobium leguminosarum* species complex. Gen. 2021;12:111.
29. Rajnovic I, Ramírez-Bahena MH, Sánchez-Juanes F, González-Buitrago JM, Kajic S, Peix Á, et al. Phylogenetic diversity of

- rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* in Croatia and definition of the symbiovar *phaseoli* within the species *Rhizobium pisi*. Syst. Appl. Microbiol. 2019;42: 126019.
30. Cao Y, Wang E-T, Zhao L, Chen W-M, Wei G-H. Diversity and distribution of rhizobia nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. Soil Biol. Biochem. 2014;78:128-137.
 31. Soares R, Trejo J, Veloso MM, Castro IV Biological nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris*. Rev. Ciên. Ag. 2016;39(4): 526-537.
 32. Yao LJ, Shen, YY, Zhan JP, Xu W, Cui GL, Wei GH. *Rhizobium taibaishanense* sp. nov., isolated from a root nodule of *Kummerowia striata*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012;62:335-341.
 33. Lu J, Yang F, Wang S, Ma H, Liang J, Chen Y. Co-existence of rhizobia and Diverse Non-rhizobial Bacteria in the Rhizosphere and Nodules of *Dalbergia odorifera* Seedlings Inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium multihospitium*-Like and *Burkholderia pyrrocinia*-Like Strains. Front. microbiol. 2017;8:2255.

© Copyright (2024): Author(s). The licensee is the journal publisher. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:

<https://www.sdiarticle5.com/review-history/117524>

COMMUNICATION ORALE

ATSE Marie-Paule Aboueu, N'GBESSO Mako François De Paul, KONATE Ibrahim, Coulibaly Noupé Diakari, OSSEY Christian-Landry, GADJI André, FONDIO Lacina & BUTARE Louis (2021). Evaluation de l'infestivité des bactéries nodulant le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) dans les sols de la Côte d'Ivoire. *Journées Scientifiques de l'Agroforesterie*

RESUME

La technologie d'inoculation par les rhizobia constituerait une pratique agroécologique de fertilisation pour accroître la production et revaloriser la culture du haricot sec (*Phaseolus vulgaris*, L.), marginalisée en Côte d'Ivoire. Malheureusement, peu d'information sont disponible sur les symbiotes du haricot sec capables d'améliorer sa production en Côte d'Ivoire. Cette étude a été initiée pour contribuer à l'amélioration de la production du haricot sec par la mise à la disposition des producteurs des inocula de rhizobia efficaces. Le matériel végétal utilisé a été composé de 35 accessions de haricot sec collectées et introduites. Ces accessions ont été évaluées sur la base de 16 caractères phénologiques et agronomiques à travers un dispositif en bloc aléatoire complet avec arrangement en blocs de Fisher. Puis les bactéries des sols de 12 localités de la Côte d'Ivoire ont été piégées et isolées de cinq accessions de haricot sur le milieu YEMA. Les isolats obtenus ont été authentifiés et leur spectre d'hôtes a été vérifié. Ensuite, leur capacité à tolérer différents facteurs environnementaux a été évaluée *in vitro*. L'aptitude de ces bactéries à améliorer les performances agronomiques du haricot sec a été évaluée sur la production de trois accessions en condition de champ sur deux sites à Bouaké. A l'issue de ce test, les isolats les plus performants ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire basée sur le séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S. Les résultats obtenus montrent une diversité entre les accessions. HARI4/BKE18, HARI5/BON18, HARI6/BON18, HARI14/GHA19, HARI22/GHA19, HARI28/GHA19 et HARI35/GHA19 ont présenté des caractéristiques agronomiques prometteuses. Par ailleurs, la présence de rhizobia a été observée dans certains sols ivoiriens. Ainsi, 108 isolats ont été sélectionnés avec 20 capables de réinfecter efficacement leur plante hôte. Ces derniers ont plus toléré les pH basiques que les pH acides. Ils ont montré une sensibilité à la salinité à l'exception de RPC108, RPC204 et RPC404 qui ont été les plus halotolérants. Quant aux pesticides, seul l'isolat RPC430 a été tolérant à la quasi-totalité de ces derniers. L'évaluation au champ a montré que les rhizobia locaux testés sont capables d'améliorer la production du haricot sec. Parmi ces isolats, RPC109, RPC114, RPC115, RPC208, RPC304, RPC404, RPC410, RPC430, RPC430, RPC431, RPC431 et RPC509 ont plus amélioré le rendement du haricot jusqu'à 3,7 t.ha⁻¹. Ils appartiennent aux genres *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Sinorhizobium*.

Mots-Clés : Production, *Phaseolus vulgaris* L., Inoculation, Rhizobia locaux, Séquençage.

Abstract

Rhizobia inoculation technology could be an agroecological fertilization practice to increase production and enhance the value of dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) cultivation, which is marginalized in Côte d'Ivoire. Unfortunately, little information is available on dry bean symbionts capable of improving its production in Côte d'Ivoire. This study was initiated to contribute to improving dry bean production by providing producers with efficient rhizobia inocula. The plant material used consisted of 35 collected and introduced dry bean accessions. These accessions were evaluated based on 16 phenological and agronomic traits using a randomized complete block design with Fisher block arrangement. Then, soil bacteria from 12 locations in Côte d'Ivoire were trapped and isolated from five bean accessions on YEMA medium. The isolates obtained were authenticated and their host range was verified. Then, their ability to tolerate different environmental factors was evaluated *in vitro*. The ability of these bacteria to improve the agronomic performance of dry beans was evaluated on the production of three accessions under field conditions at two sites in Bouaké. Following this test, the best-performing isolates were subjected to molecular characterization based on the sequencing of genes coding for 16S rRNA. The results obtained show diversity between the accessions. HARI4/BKE18, HARI5/BON18, HARI6/BON18, HARI14/GHA19, HARI22/GHA19, HARI28/GHA19 and HARI35/GHA19 presented promising agronomic characteristics. In addition, the presence of rhizobia was observed in some Ivorian soils. Thus, 108 isolates were selected with 20 capable of effectively reinfesting their host plant. The latter were more tolerant of basic pH than acidic pH. They showed sensitivity to salinity with the exception of RPC108, RPC204 and RPC404 which were the most halotolerant. As for pesticides, only isolate RPC430 was tolerant to almost all of them. Field evaluation showed that the local rhizobia tested are capable of improving dry bean production. Among these isolates, RPC109, RPC114, RPC115, RPC208, RPC304, RPC404, RPC410, RPC430, RPC430, RPC431, RPC431 and RPC509 improved bean yield up to 3.7 t.ha⁻¹. They belong to the genera *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Sinorhizobium*.

Keywords : Production, *Phaseolus vulgaris* L., Inoculation, Local Rhizobia, Sequencing.

RESUME

La technologie d'inoculation par les rhizobia constituerait une pratique agroécologique de fertilisation pour accroître la production et revaloriser la culture du haricot sec (*Phaseolus vulgaris*, L.), marginalisée en Côte d'Ivoire. Malheureusement, peu d'information sont disponible sur les symbiotes du haricot sec capables d'améliorer sa production en Côte d'Ivoire. Cette étude a été initiée pour contribuer à l'amélioration de la production du haricot sec par la mise à la disposition des producteurs des inocula de rhizobia efficaces. Le matériel végétal utilisé a été composé de 35 accessions de haricot sec collectées et introduites. Ces accessions ont été évaluées sur la base de 16 caractères phénologiques et agronomiques à travers un dispositif en bloc aléatoire complet avec arrangement en blocs de Fisher. Puis les bactéries des sols de 12 localités de la Côte d'Ivoire ont été piégées et isolées de cinq accessions de haricot sur le milieu YEMA. Les isolats obtenus ont été authentifiés et leur spectre d'hôtes a été vérifié. Ensuite, leur capacité à tolérer différents facteurs environnementaux a été évaluée *in vitro*. L'aptitude de ces bactéries à améliorer les performances agronomiques du haricot sec a été évaluée sur la production de trois accessions en condition de champ sur deux sites à Bouaké. A l'issue de ce test, les isolats les plus performants ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire basée sur le séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S. Les résultats obtenus montrent une diversité entre les accessions. HARI4/BKE18, HARI5/BON18, HARI6/BON18, HARI14/GHA19, HARI22/GHA19, HARI28/GHA19 et HARI35/GHA19 ont présenté des caractéristiques agronomiques prometteuses. Par ailleurs, la présence de rhizobia a été observée dans certains sols ivoiriens. Ainsi, 108 isolats ont été sélectionnés avec 20 capables de réinfecter efficacement leur plante hôte. Ces derniers ont plus toléré les pH basiques que les pH acides. Ils ont montré une sensibilité à la salinité à l'exception de RPC108, RPC204 et RPC404 qui ont été les plus halotolérants. Quant aux pesticides, seul l'isolat RPC430 a été tolérant à la quasi-totalité de ces derniers. L'évaluation au champ a montré que les rhizobia locaux testés sont capables d'améliorer la production du haricot sec. Parmi ces isolats, RPC109, RPC114, RPC115, RPC208, RPC304, RPC404, RPC410, RPC430, RPC430, RPC431, RPC431 et RPC509 ont plus amélioré le rendement du haricot jusqu'à 3,7 t.ha⁻¹. Ils appartiennent aux genres *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Sinorhizobium*.

Mots-Clés : Production, *Phaseolus vulgaris* L., Inoculation, Rhizobia locaux, Séquençage.

Abstract

Rhizobia inoculation technology could be an agroecological fertilization practice to increase production and enhance the value of dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) cultivation, which is marginalized in Côte d'Ivoire. Unfortunately, little information is available on dry bean symbionts capable of improving its production in Côte d'Ivoire. This study was initiated to contribute to improving dry bean production by providing producers with efficient rhizobia inocula. The plant material used consisted of 35 collected and introduced dry bean accessions. These accessions were evaluated based on 16 phenological and agronomic traits using a randomized complete block design with Fisher block arrangement. Then, soil bacteria from 12 locations in Côte d'Ivoire were trapped and isolated from five bean accessions on YEMA medium. The isolates obtained were authenticated and their host range was verified. Then, their ability to tolerate different environmental factors was evaluated *in vitro*. The ability of these bacteria to improve the agronomic performance of dry beans was evaluated on the production of three accessions under field conditions at two sites in Bouaké. Following this test, the best-performing isolates were subjected to molecular characterization based on the sequencing of genes coding for 16S rRNA. The results obtained show diversity between the accessions. HARI4/BKE18, HARI5/BON18, HARI6/BON18, HARI14/GHA19, HARI22/GHA19, HARI28/GHA19 and HARI35/GHA19 presented promising agronomic characteristics. In addition, the presence of rhizobia was observed in some Ivorian soils. Thus, 108 isolates were selected with 20 capable of effectively reinfesting their host plant. The latter were more tolerant of basic pH than acidic pH. They showed sensitivity to salinity with the exception of RPC108, RPC204 and RPC404 which were the most halotolerant. As for pesticides, only isolate RPC430 was tolerant to almost all of them. Field evaluation showed that the local rhizobia tested are capable of improving dry bean production. Among these isolates, RPC109, RPC114, RPC115, RPC208, RPC304, RPC404, RPC410, RPC430, RPC430, RPC431, RPC431 and RPC509 improved bean yield up to 3.7 t.ha⁻¹. They belong to the genera *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Sinorhizobium*.

Keywords : Production, *Phaseolus vulgaris* L., Inoculation, Local Rhizobia, Sequencing.

**UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE**

THESE DE DOCTORAT

**Evaluation d'accessions de haricot sec (*Phaseolus vulgaris*, L.) et identification de rhizobia locaux
efficacients pour l'amélioration de la production de
cette légumineuse dans le Centre de la Côte**

**ANNEE : 2024-2025
N : 133**

**ATSE
Marie-Paule Aboueuh**