

Remerciements

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche au sein du Laboratoire de Biotechnologie des Interactions Plantes - Microorganismes de l'université d'Oran Es-senia et L'unité de recherche INRAA de Sidi Bel Abbès.

Je remercie, tout d'abord, ALLAH, le tout puissant, de m'avoir aidé pour achever ce modeste travail.

Je remercie sincèrement, mon encadreur Mr BEKKI.A (Professeur à l'université d'Oran Es-senia), pour le temps et la patience qu'il m'a accordés tout au long de ce travail.

Je remercie particulièrement, Mr LABDI.M (Directeur de l'unité de recherche INRAA) qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et gratitude pour m'avoir guidé dans mon travail.

Nous ne pouvons passer sous silence l'apport scientifique, les conseils et remarques prodigués par toute l'équipe du laboratoire de Rhizobiologie.

Mes remerciements vont également à Mme FYAD LAMECH F. Z. (Professeur à l'université d'Oran Es-Senia) pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie également Mr KIHAL M. (Professeur à l'université d'Oran Es-Senia) et Mr SAIDI.N (Maître de conférences à l'université d'Oran Es-Senia), pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse un très grand merci à toute l'équipe de l'INRAA y compris Mm HAMDI, Mr HAMOU, Mr TEGGAR, Mr HADDAD, Mr METTERFI et Mr BEKRALED, sans oublier Nadia, Nadira, Sabrina, Fanina, Kheira et Fatima qui, grâce à eux, je me suis toujours sentie intégrée à l'équipe.

*M*erci aussi à tous mes collègues et amis du laboratoire, Merci à tous pour leur amitié et pour leur aide précieuse.

*J*e tiens également à remercier tous ceux qui ont participé à la réussite de ce travail de la famille *BOURAS* et *MAAFA*.

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier de tout cœur mes parents, mes frères et ma petite sœur.

*J*e suis reconnaissante à l'endroit de tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé à réaliser ce travail.

Bouras Fatima Zohra

Dédicace

*Avec l'aide d'Allah le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je
dédie :*

A mes très chers parents :

Qui ont attendu avec patience les fruits de leur bonne éducation

Pour toutes les peines endurées, toutes les privations et

Sacrifices consentis, pour faire de moi une femme modèle.

Je ne les remercierai jamais assez, pour tout ce qu'ils m'ont fait.

A tous mes enseignants

*En témoignage du respect et de ma profonde et éternelle gratitude que je leurs
porte.*

*A mes tendres sœur et frères, pour tant de confiance, d'amour, de patience et
d'abnégation.*

*A toutes les familles BOURAS et MAAFA pour tant de consolation et de
tendresse.*

A tous mes amis et mes collègues.

Spécialement à ma tante Jalila.

Bouras Fatima Zohra

Résumé :

Les légumineuses en symbiose avec les *Rhizobia*, sont une priorité pour les politiques de recherche en Algérie car, leur culture produit des graines et fourrages riches en protéines à partir d'azote atmosphérique. Afin de sélectionner une association « *Cicer arietinum*-*Rhizobium*-Sol » plus performante, un dispositif expérimental formé d'une culture de quatre variétés de pois chiche sur quatre sols prélevés de différentes localités, soumis à trois traitements (naturel, stérile, stérile fertilisé) où l'effet de la stérilisation et la fertilisation du sol est apprécié par une analyse statistique. La variété **93.93C** s'est montrée la plus productive sur le sol naturel de **Ain Témouchent**. Quinze isolats nodulant le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) sont caractérisés sur le plan phénotypique. L'analyse de leur caractérisation biochimique, leur tolérance à la salinité, aux températures élevées, aux pH acides et alcalins, et la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds, ainsi que leurs caractéristiques symbiotiques ont permis de mettre en évidence une certaine diversité physiologique au sein de ces populations de *Rhizobium*. Certains isolats ont présenté des caractéristiques intéressantes, ils sont efficaces et capables d'assimiler une multitude de substrats carbonés, de tolérer des pHs allant de 4 à 12, des concentrations en NaCl de **1 à 9 %**, des températures comprises entre **30 à 45 °C** et ils se sont même révélés très résistants à quelques métaux lourds et antibiotiques.

Mots clé : Biodiversité -*Cicer arietinum* -*Rhizobium*- caractérisation phénotypique-Sol

Summary:

The leguminous plants in symbiosis with *Rhizobium*, are a priority for the politics of research in Algeria because, their culture produces seeds and forage rich in proteins starting from atmospheric nitrogen. In order to select an association "*Cicer arietinum* - *Rhizobium* – Soil " more powerful an experimental device formed of a culture of four varieties of chickpea on four soils taken from various localities, subjected to three treatments (natural, sterile, sterile fertilized) where the effect of sterilization and the fertilization of soil are appreciated by a statistical analysis. The variety **93.93C** has shown good potentialité of production on natural soil of **Ain Témouchent**. Fifteen isolats nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) are characterized on the phenotypical level. The analysis of their biochemical characterization, their tolerance to salinity, the high temperatures, the alkaline and acid pHs, and resistance to antibiotics and heavy metals, as their symbiotic characteristics made it possible to highlight a physiological diversity within these populations of *Rhizobium*. Some isolats showed interesting characteristics, they are efficient and able to assimilate a multitude of carbohydrate substrates, to tolerate pHs going from 4 to 12, **NaCl** concentrations from **1 to 9 %**, temperatures ranging between **30 to 45 °C** and they even appeared very resistant to some heavy metals and antibiotics.

Key words: Biodiversity - *Cicer arietinum* - *Rhizobium* – phenotypical characterization - Soil

Sommaire

	Page
Introduction.....	01

Chapitre I : Etude bibliographique

I. Aperçu général sur les partenaires de la fixation symbiotique de l'azote	03
I.1 Les légumineuses	03
I.2 Le <i>Rhizobium</i>	04
I.2.1 Description	04
I.2.2 Principales caractéristiques	04
I.2.3 La taxonomie des BNL (Bactéries Nodulantes les Légumineuses)	05
I.3 La fixation symbiotique	09
II. La fixation symbiotique chez le pois chiche	14
II.1. Le genre <i>Cicer</i>	14
II.2. <i>Cicer arietinum</i>	15
II.2.1 Description botanique	15
II.2.2 Propriétés nutritionnelles	17
II.2.3 Types de cultures	17
II.2.4 Exigences culturales	18
II.2.5 Utilisation	19
II.2.6 Production international	20
II.2.7 Production en Algérie	21
II.3 La Symbiose <i>Cicer</i> - <i>Rhizobium</i>	22
II.4 Quelques facteurs affectant la fixation symbiotique.....	23
II.4.1 Effet de la salinité.....	23
II.4.2 Effet des nitrates	24
II.4.3 Effet du phosphore.....	25

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Matériel.....	27
1.1 Matériel végétal	27
1.2 Sol	27
2. Méthodes.....	29
2.1 Analyses physicochimiques du sol.....	29
2.1.1 Analyses physiques	29
Analyse granulométrique.....	29
Mesure du pH.....	29
2.1.2 Analyses chimiques	29
Mesure de la conductivité électrique.....	29
Dosage du calcaire total.....	30
Dosage du calcaire actif.....	30
Carbone total et matière organique.....	31
Dosage de l'azote total.....	31
Dosage du phosphore assimilable	32
2.2 Stérilisation du sol	32
2.3 Semis et mise en place des cultures de pois-chiche	33
2.3.1 Désinfection des graines	33
2.3.2 Culture des plantules.....	33
2.3.3 Dispositif expérimental	33
2.3.4 Analyse statistique.....	33
2.4 Etude microbiologique.....	34
2.4.1 Piégeage des Rhizobia	34
2.4.2 Purification et conservation.....	35
2.4.3 Observation macroscopique.....	35
2.4.4 Observation microscopique.....	35
2.4.5 Conservation des souches	35
2.4.6 Test de nodulation.....	35
2.5 Etude physiologique.....	38
2.5.1 La tolérance à la température.....	38

2.5.2 La tolérance à la salinité.....	38
2.5.3 La tolérance au pH	38
2.5.4 La résistance intrinsèque aux antibiotiques.....	38
2.5.5 La résistance aux métaux lourds	39
2.5.6 Utilisation des substrats carbonés.....	39
2.5.7 Test du bleu de Bromothymol.....	39
2.5.8 Hydrolyse de l'urée.....	39
2.5.9 Test de Mannitol Mobilité.....	39
2.5.10 Détection de la catalase.....	39

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Caractérisation pédologique des sols testés.....	41
2. Confirmation de la stérilité du sol.....	44
3. Caractéristiques symbiotiques	44
4. Effet de la variété, la stérilisation et la fertilisation sur le développement des plantes	48
Analyse statistique.....	51
5. Vérification de la pureté des isolats.....	65
5.1 Caractéristiques morphologiques et microscopiques des isolats.....	65
5.2 Test de nodulation.....	67
6. Effet des différents facteurs sur la croissance des isolats.....	69
6.1 Effet de la Température.....	69
6.2 Effet de la salinité.....	70
6.3 Effet du pH.....	72
6.4 Résistance aux antibiotiques.....	74
6.5 Résistance aux métaux lourds.....	78
6.6 Assimilation des sucres	80
6.7 Test du bleu de Bromothymol	81
6.8 Test de l'hydrolyse de l'urée.....	82
6.9 Détection de la Catalase.....	83

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives.....	86
Références bibliographiques.....	88

Liste des Tableaux

	Page
Tableau n°1 : La Taxonomie des BNL (B actérie N odulant les l égumineuses).....	07
Tableau n° 2 : Bilan de production de pois chiche dans le monde durant la période « 2002-2007 »	21
Tableau n°3 : Récapitulatif des superficies, des productions, des rendements et les taux d'accroissement 2005/2006	22
Tableau n°4 : Les résultats des analyses des quatre échantillons de sol prélevés de différentes localités de l'ouest Algérien.....	43
Tableau n°5 : Résistance intrinsèque des isolats testés à différents antibiotiques.....	75
Tableau n°6 : Les résultats du test de nodulation, tests biochimiques et l'effet des différents facteurs	85

Liste des Figures

	Page
Figure 1 : Dialogue moléculaire entre la racine et les <i>Rhizobiums</i>	10
Figure 2 : Les principales étapes de la formation des nodosités.....	13
Figure 3 : <i>Cicer arietinum</i> L	16
Figure 4 : Les types de cultivars de pois chiche.....	18
Figure 5 : Les quatre lignées de pois chiche utilisées pour l'étude	27
Figure 6 : Localisation des sites de prélèvement des quatre sols testés au cours de l'étude.....	28
Figure 7 : Dispositif expérimental.....	34
Figure 8 : Les graines de <i>Cicer arietinum</i> , variété 93.93C, après 7 jours de germination à l'obscurité et à température ambiante.....	36
Figure 9 : Test de nodulation en hydroponique.....	37
Figure 10 : Test de nodulation sur sable.....	37
Figure 11 : Confirmation de la stérilité des sols testés.....	44
Figure 12 : Forme des nodosités obtenues sur les racines de <i>Cicer arietinum</i> cultivé sur les sols de Tessala (A), ITGC (B), Zahana (C), Ain Témouchent (D).....	45
Figure 13 : Infectivité des souches autochtones de <i>Rhizobium</i> nodulant le pois chiche évaluée sur les quatre sols étudiés.....	47
Figure 14 : L'effet de la variété sur la croissance végétale.....	49
Figure 15 : L'effet du traitement sur la croissance végétale.....	50
Figure 16 : L'effet de la stérilisation et la fertilisation sur le développement végétal.....	51
Figure 17 : L'effet du sol sur la croissance végétale.....	52
Figure 18 : l'effet de l'interaction « Variété –traitement Naturel » sur la croissance végétale	55
Figure 19 : l'effet de l'interaction « Variété –traitement stérile » sur la croissance végétale.....	56

Figure 20 : l'effet de l'interaction « Variété –traitement stérile fertilisé » sur la croissance Végétale.....	57
Figure 21 : l'effet de l'interaction « Variété –Sol de AIT » sur la croissance végétale	58
Figure 22 : l'effet de l'interaction « Variété - Sol de l'ITGC » sur la croissance végétale	59
Figure 23 : l'effet de l'interaction « Variété - Sol de Tessala » sur la croissance végétale	60
Figure 24 : l'effet de l'interaction « Variété - Sol de Zahana » sur la croissance végétale	61
Figure 25 : l'effet de l'interaction « Sol – Traitement Naturel » sur la croissance végétale	62
Figure 26 : l'effet de l'interaction « Sol – Traitement Stérile » Sur la croissance végétale	63
Figure 27 : l'effet de l'interaction « Sol – Traitement Stérile Fertilisé » Sur la croissance Végétale.....	64
Figure 28 : Aspect de trois souches différentes après 72h d'incubation.....	66
Figure 29 : Observation microscopique des souches après coloration de Gram.....	67
Figure 30 : Formation des nodules sur les racines d'une plante de <i>Cicer arietinum</i> inoculée avec la souche Rch 39 , sur sable stérile après 43 jours de croissance.	68
Figure 31 : Croissance des souches testées à différentes températures.....	70
Figure 32 : Croissance des souches à différentes concentrations de NaCl	71
Figure 33 : Effet du pH sur la croissance des souches testées.....	73
Figure 34 : Effet des antibiotiques sur la croissance de 15 souches testées pour la nodulation du pois chiche.....	75
Figure 35 : Croissance des souches en présence de plusieurs antibiotiques à différentes Concentrations.....	77
Figure 36 : la croissance des souches testées en présence des différents métaux lourds.....	79
Figure 37 : Croissance et assimilation des sucres par les souches testées.....	80
Figure 38 : Réaction des souches nodulant <i>Cicer arietinum</i> sur le milieu YEM+BTB	82
Figure 39 : Dégradation de l'urée par les 15 souches testées.....	82

Introduction

Introduction

Introduction :

Les légumineuses en symbiose avec les *Rhizobium*, sont une priorité pour les politiques de recherche en Algérie.

En plus du rôle qu'elles jouent dans l'agriculture, l'économie et dans les balances alimentaires de nombreuses populations humaines, les légumineuses sont aussi très importantes écologiquement vu qu'elles sont responsables pour une partie substantielle de la conversion du flux global de l'azote atmosphérique en forme fixe tel que l'azote ammoniacal qui est à son tour converti en composés organiques assimilables.

Parmi les légumineuses alimentaires, le pois chiche représente un modèle intéressant pour l'étude de la fixation biologique de l'azote en raison de son importance économique et sa participation à l'enrichissement du sol en azote (précédent cultural pour les céréales).

A fin de sélectionner une association « *Cicer arietinum*-*Rhizobium*-Sol » plus performante, et estimer l'efficacité des souches autochtones de certaines localités de l'ouest algérien, un dispositif expérimental, formé d'une culture de quatre variétés de pois chiche sur quatre sols différentes, soumise à trois traitements (naturel, stérile, stérile fertilisé) dont l'effet est apprécié par une analyse statistique, a été mis en place.

La caractérisation phénotypique de 15 souches isolées à partir des nodosités de pois chiche nous permettra d'une part : de mettre en évidence l'étendue des variations phénotypiques qui existent entre les souches ; et d'autre part : d'exploiter ces variations pour la sélection de candidats pouvant maintenir une capacité supérieure de fixation d'azote sous les variations des facteurs du milieu.

En effet, les facteurs environnementaux affectent tous les aspects de la fixation symbiotique de l'azote. Parmi les facteurs les plus importants figurent le pH, la salinité et la température. Dans le sol, le pH affecte non seulement le développement des bactéries, mais aussi, la solubilité des différents cations métalliques qui influencent indirectement le développement bactérien.

Dans les régions arides ou semi-arides, les températures extrêmes affectent la survie des *Rhizobiums*. Elles agissent également sur leur mobilité et, sur leur potentiel infectieux en agissant sur le taux de l'humidité relative du sol.

La salinité constitue de nos jours une menace sérieuse à prendre en charge. Elle agit négativement sur la persistance et sur le développement des *Rhizobiums*.

Introduction

Il est donc primordial, d'identifier en premier lieu : les *Rhizobiums* autochtones nouvellement isolés et sélectionner ceux qui peuvent survivre et maintenir une haute performance symbiotique sous les différentes contraintes de l'environnement.

Dans cette optique, cette étude porte sur la détermination des caractéristiques phénotypiques des souches. L'ensemble de ces caractères pourra d'une part, constituer une base pour l'établissement de stratégies d'inoculations et être de ce fait une base d'étude de la diversité phénotypique, qui existe entre ces souches autochtones, et donner des indications sur leur position taxonomique.

Chapitre I

Etude bibliographique

Analyse bibliographique

I Aperçu général sur les partenaires de la fixation symbiotique de l'azote :

I.1 Les légumineuses :

Les Légumineuses représentent une superfamille chez les angiospermes, comprenant plus de 750 genres et entre 16000 et 19000 espèces (Dommergues *et al.*, 1999). Elles sont divisées en trois sous-familles : les Mimosoïdées, les Caesalpinoïdées et les Papilionoïdées (Udvardi *et al.*, 2005) .

De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines, d'huiles végétales (Graham et Vance, 2003) et constituent une importante source de nourriture humaine. C'est la raison pour laquelle, elles sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète. On peut citer par exemple : le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*) etc.

Ainsi, les légumineuses couvrent globalement 66% des besoins de subsistance des communautés rurales dans les pays en voie de développement, tout en assurant un maintien durable de la fertilité des sols (engrais vert), utilisées comme précédent cultural des céréales , et de l'équilibre des écosystèmes (Dommergue *et al.*, 2006).

La plus grande partie des Légumineuses (88% des espèces étudiées) interagissent avec les *Rhizobia* et forment des nodules fixateurs d'azote (Hirsch *et al.*, 2001 ; de Faria *et al.*, 1989). De ce fait, les légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées (Patriarca *et al.*, 2004 ; Gage *et al.*, 2004 ; Stacey *et al.*, 2006). Notamment, l'émergence de deux plantes modèles : *Lotus japonicus* (Handberg et Stougaard, 1992 ; Udvardi *et al.*, 2005) et *Medicago truncatula* (Barker *et al.*, 1990) a permis d'accélérer l'étude des mécanismes de mise en place de la symbiose.

Analyse bibliographique

I.2 Le *Rhizobium* :

I.2.1 Description :

Petites bactéries non sporulées hétérotrophes du genre *Rhizobium* appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, se développent bien dans le sol et en général sont présentes dans la terre cultivée (Obaton *et al.*, 1983).

I.2.2 Principales caractéristiques :

Les *Rhizobia* sont des bactéries asporulées, strictement aérobies (Pelmont, 1993). Ce sont des microorganismes typiquement Gram négatifs, très mobile quand ils sont jeunes, elles se présentent en coccobacilles ou en bâtonnet, (Jordan, 1984 ; Bekki, 1983), de 0,6 à 0,8 μ de large sur 1 à 4 μ de long, rencontrés dans le sol sous forme libre ou en bactéroïdes à l'intérieur des nodosités (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Vincent *et al.*, 1974). La morphologie de la bactérie est très voisine quelque soit l'espèce (Vincent *et al.*, 1977).

Les *Rhizobia* sont des bactéries mésophiles, leur température optimale de croissance se situe entre 25 et 30°C (Elkan *et al.*, 1992). Certaines espèces se développent à des températures allant de 40,5 à 42,5°C, c'est le cas de *Rhizobium meliloti* (Affiana et Alexander, 1992).

La plupart des *Rhizobia* préfèrent la neutralité (Jordan *et al.*, 1984), d'autres au contraire, tolèrent des pH très bas (Vincent *et al.*, 1977 ; Bergey's *et al.*, 1984). C'est le cas de *Bradyrhizobium japonicum* qui supporte des pH de l'ordre de 3.5 à 4 (Dommergues et Mangenot, 1970). Il a été montré que des souches de *Rhizobium* peuvent croître à des pH alcalins allant jusqu'à 12 (Kulkarni *et al.*, 2000).

Les *Rhizobia* produisent une gomme hydrosoluble abondante qui, par hydrolyse, donne le glucose et, chez de nombreuses souches, de l'acide galacturonique. Ce produit gommeux pourrait intervenir en tant qu'agent agrégatif dans le sol (Dommergues *et al.*, 1970). Elles se développent bien dans un milieu correctement aéré. L'élaboration de la leghémoglobine dépend de la présence de l'oxygène.

Analyse bibliographique

I.2.3 La taxonomie des BNL (Bactéries Nodulant les Légumineuses) :

Les *Rhizobia* ont été antérieurement définis comme des micro-organismes symbiotiques capables de former des nodosités au niveau du système racinaire des légumineuses.

En 1879, Frank a rapporté que ces micro-organismes étaient des champignons en leur affectant le nom de *Schinzia leguminosarum*. En 1888, Hellriegel et Willfarth ont fourni une explication scientifique pour la fixation biologique de l'azote.

Dans la même année, Beyerinck (1888) a pu isoler une bactérie d'une plante légumineuse et l'a nommée *Bacillus radicolica*. Qui a été par la suite renommée *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889).

Baldwin et Fred (1929) ont rapporté que la classification des différents *Rhizobia* devrait être basée sur la spécificité de l'espèce bactérienne par rapport à la plante hôte. Ainsi, Fred *et al.* (1932) ont pu identifier six groupes de nodulation croisée, *Rhizobium leguminosarum* pour *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* et *Lens* ; *R. trifolii* pour *Trifolium* ; *R. phaseoli* pour *Phaseolus* ; *R. meliloti* pour *Glycine max* et *R. lupini* pour *Lupinus*.

Cette première classification a connu par la suite plusieurs critiques (Wilson, 1944). En 1921, Lohnis et Hansen ont montré que les *Rhizobia* présentent une croissance soit lente soit rapide dans le milieu synthétique. Le concept du taux de croissance a été repris par Norris (1965) qui a défini en plus le critère de l'affinité symbiotique. Selon l'auteur, les bactéries à croissance lente n'acidifient pas le milieu de culture et nodulent les légumineuses des régions tropicales ; alors que les bactéries à croissance rapide acidifient le milieu de culture et nodulent les légumineuses des régions tempérées.

Cependant, plusieurs contre-exemples ont été rapportés. Ainsi, *Lupinus* et *Corallina* qui sont des légumineuses des régions tempérées, sont nodulées par des bactéries à croissance lente (Allen *et al.*, 1981). *Sesbania* et *leucaena* qui sont des légumineuses des régions tropicales, sont nodulées par des bactéries à croissance rapide (de Lajudie *et al.*, 1994).

Des bactéries à taux de croissance différent peuvent être également isolées à partir d'une même espèce comme *Glycine max* (Scholla et Elkan, 1984), voire même de la même plante comme *Acacia*. En fait, *Acacia* peut être nodulée par des *Rhizobium* (Barnett *et al.*, 1993), des *Bradyrhizobium* (Dupuy *et al.*, 1994) et par des *Sinorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1994).

Les observations discordantes entre la croissance de la bactérie et la gamme d'hôte ont jeté le doute sur la validité de cette classification.

Analyse bibliographique

Toutefois, sur la base du taux de croissance, en 1982, Jordan a pu classer les *Rhizobia* en deux genres, le genre *Rhizobium* pour les souches à croissance rapide et le genre *Bradyrhizobium* pour les souches à croissance lente.

Plusieurs méthodes comparatives comme la sérologie, SDS-PAGE des isoenzymes ou des protéines totales, FAME (Fatty Acid Methyl Esters), le coefficient de Chargaff, l'hybridation ARN / ADN ou ADN /ADN, et l'analyse des plasmides ont été adoptées pour la classification des *Rhizobia*.

En 1991, Graham *et al.*, ont rapporté que la description de toute nouvelle espèce doit se baser sur l'analyse génétique (Séquence de l'ADNr, homologie ADN / ADN) ainsi que sur l'analyse numérique. La combinaison de ces deux analyses a été ensuite reconnue sous le nom de l'approche polyphasique pour établir la taxonomie des *Rhizobia*.

Certains auteurs se sont plus intéressés aux légumineuses spontanées de quelques zones salées de l'Algérie et ont étudié la diversité des bactéries associées (Bekki, 1986 ; Bekki *et al.*, 1987 ; Bekki, 1994; Bekki, 1997; Bekki *et al.*, 1999 ; Bekki *et al.*, 2000 ; C.Merabet *et al.*, 2002). Ces chercheurs ont essayé de comprendre les mécanismes qui ont permis l'établissement et le maintien de l'association *Rhizobia/ Medicago* présentes dans les Sebkhass.

Récemment le terme *Rhizobium* a été substitué par le terme de BNL (Zakhia *et al.*, 2004). Des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques sont actuellement connues pour leur capacité symbiotique. Ainsi, les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia* (classe des α -protéobactéries), *Burkholderia* et *Ralstonia* (classe des β -protéobactéries) (Garrity *et al.*, 2004) ainsi que certaines δ -protéobactéries (Benhizia *et al.*, 2004), forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes de légumineuses . La taxonomie des BNL est illustrée dans le **Tableau n°1**.

Tableau n°1 : Classification des BNL (Thèse de Doctorat, C. Merabet, 2007).

Espèces	Plantes hôtes	Références
Rhizobium		Frank, 1889
R. leguminosarum		Frank, 1889; Jordan, 1984
biovar viciae	Pisum sativum, Vicia, Lathyrus, Lens	Frank, 1889 ; Jordan, 1984
biovar trifolii	Trifolium pratense	Frank, 1889 ; Jordan, 1984
biovar phaseoli	Phaseolus vulgaris L.	Frank, 1889; Jordan, 1984
R. tropici		
Type II A	P. vulgaris L., Leucaena	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
Type II B	P. vulgaris L., Leucaena	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
R. etli	Phaseolus vulgaris, Leucaena	Segovia <i>et al.</i> , 1993;
biovar phaseoli		Hernandez-Lucas <i>et al.</i> , 1995
R. etli	Mimosa affinis	Wang <i>et al.</i> , 1999a
biovar mimosae		
R. hainanense	Desmodium sinuatum, Stylosanthes, Centrosema, Tephrosia, Acacia, Zornia, Macroptilium.	Chen <i>et al.</i> , 1997
R. gallicum		Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar gallicum	Phaseolus vulgaris L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar phaseoli	Phaseolus vulgaris L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
R. mongolense	Medicago ruthenica	Van Berkum <i>et al.</i> , 1998
R. galegae		Lindström, 1989
biovar orientalis	Galega orientalis	Radeva <i>et al.</i> , 2001
biovar officinalis	Galega officinalis	Radeva <i>et al.</i> , 2001
R. giardinii		Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar giardinii	Phaseolus vulgaris L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar phaseoli	Phaseolus vulgaris L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
R. huautlense	Sesbania herbacea	Wang <i>et al.</i> , 1998
R. indigoferae	Indigofera	Wei <i>et al.</i> , 2002
R. sullae	Hedysarum coronarium	Squartini <i>et al.</i> , 2002
R. loessense	Astragalus, Lespedeza	Wei <i>et al.</i> , 2003
R. yanglingense	Coronilla, Amphicarpea, Gueldenstaedtia	Tan <i>et al.</i> , 2001
R. daejeonense	Medicago	Quan <i>et al.</i> , 2005
Rhizobium lusitanum	Phaseolus vulgaris	Valverde <i>et al.</i> , 2006
Rhizobium cellulosilyticum	isolated from sawdust of Populus alba	García-Fraile <i>et al.</i> , 2007
Mesorhizobium		
M. loti	Lotus corniculatus, Lupinus, Anthyllis, Leucaena	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
M. huakuii	Astragalus sinicus, Acacia spp.	Chen <i>et al.</i> , 1991
biovar loti		Turner <i>et al.</i> , 2002
M. ciceri	Cicer arietinum	Nour <i>et al.</i> , 1994
M. tianshanense	Glycyrrhiza pallidiflora, Sophora, Caragana, Halimodendron, Swainsonia, Glycine	Chen <i>et al.</i> , 1995
M. mediterraneum	Cicer arietinum	Nour <i>et al.</i> , 1995
M. plurifarum	Acacia, Prosopis	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998a

Analyse bibliographique

M. amorphae	Amorpha fruticosa	Wang <i>et al.</i> , 1999b
M. chacoense	Prosopis alba	Velasquez <i>et al.</i> , 2001
M. temperatum	Astragalus adsurgens	Gao <i>et al.</i> , 2004
M. septentrionale	Astragalus adsurgens	Gao <i>et al.</i> , 2004
M. thioanganeticum	Rhizosphère de Clitoria ternatea	Ghosh et Roy, 2006
Ensifer (Sinorhizobium)		Young, 2003.
E. meliloti	Medicago, Melilotus, Trigonella	Young, 2003
biovar meliloti		Villegas <i>et al.</i> , 2006
biovar acaciae		Bâ <i>et al.</i> , 2002
biovar medicaginis	M. lasciniata, M. sauvagei	Bena <i>et al.</i> , 2005; Villegas <i>et al.</i> , 2006
E. fredii		
chemovar fredii	Glycine max	Scholla et Elkan, 1984
chemovar siensis	Glycine max	Scholla et Elkan, 1984
E. xinjiangense	Glycine max,	Chen <i>et al.</i> , 1988
E. sahelense	Sesbania spp.	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
biovar acaciae	Acacia spp.	Boivin et Giraud, 1999
biovar sesbaniae	Sesbania spp.	Boivin et Giraud, 1999
E. terangae		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Trüper et de Clari, 1997
biovar acaciae	Acacia spp.	Lortet <i>et al.</i> , 1996
biovar sesbaniae	Sesbania spp.	Lortet <i>et al.</i> , 1996
E. medicae	Medicago spp.	Rome <i>et al.</i> , 1996
E. kostiense	Acacia, Prosopis	Nick <i>et al.</i> , 1999
E. morelense	Leucaena leucocephala	Wang <i>et al.</i> , 2002
E. americanum	Acacia spp.	Toledo <i>et al.</i> , 2003
E. arboris	Acacia, Prosopis	Nick <i>et al.</i> , 1999
E. kummerowiae	Kummerowia stipulacea	Wei <i>et al.</i> , 2002
E. adhaerens	Sesbania, Medicago	Casida, 1982
E. mexicanum	Acacia angustissima	Lloret <i>et al.</i> , 2007
Ensifer abri		Ogasawara <i>et al.</i> , 2003
Ensifer indiaense		Ogasawara <i>et al.</i> , 2003
Allorhizobium		de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b
A. undicola	Neptunia natans	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b
Devosia		
Devosia neptuniae	Neptunia natans	Rivas <i>et al.</i> , 2003
Azorhizobium		
A. caulinodans	Sesbania rostrata	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
Azorhizobium sp.	Sesbania rostrata	Rinaudo <i>et al.</i> , 1991
A. doebereinae	Sesbania virgata	Moreira <i>et al.</i> , 2006
Bradyrhizobium		
B. japonicum	Glycine max, Glycine soja	Kirchner, 1896; Jordan, 1984
biovar genistearum		Vinuesa <i>et al.</i> , 2004
biovar glycinearum		Vinuesa <i>et al.</i> , 2004
B. elkanii	Glycine max	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
B. liaoningense	Glycine max, Glycine soja	Xu <i>et al.</i> , 1995
biovar glycinearum		Vinuesa <i>et al.</i> , 2004
B. yuanmingense	Lespedeza spp.	Yao <i>et al.</i> , 2002
B. betae	Beta vulgaris	Rivas <i>et al.</i> , 2004
B. canariense	Genisteae et Loteae plants	Vinuesa <i>et al.</i> , 2005c
biovar genistearum		Vinuesa <i>et al.</i> , 2005c
biovar glycinearum		Vinuesa <i>et al.</i> , 2005c
Bradyrhizobium sp.	Vigna, Lupinus, Mimosa	Jordan, 1982

Analyse bibliographique

Bradyrhizobium sp.	Acacia	Dupuy <i>et al.</i> , 1994
Bradyrhizobium sp.	Aeschynomene	Alazard, 1985; Young <i>et al.</i> , 1991
Blastobacter		
B. denitrificans	Aeschynomene	van Berkum et Eardly, 2002
Methylobacterium		
M. nodulans	Crotalaria spp.;	Sy <i>et al.</i> , 2001, Jourand <i>et al.</i> , 2004
Burkholderia		
Burkholderia sp.	Machaerium lunatum, Aspalatus	Moulin <i>et al.</i> , 2001
B. caribensis		
B. cepacia		
B. tuberum		Vandamme <i>et al.</i> , 2003
B. phymatum		Vandamme <i>et al.</i> , 2003
B. mimosarum	Mimosa spp.	Chen <i>et al.</i> , 2006
Cupriavidus (Ralstonia)		
C. taiwanensis	Mimosa spp.	Chen <i>et al.</i> , 2001; Vaneechoutte <i>et al.</i> , 2004
Ochrobactrum sp.		Ngom <i>et al.</i> , 2004
Ochrobactrum lupini	Lupinus albus	Trugillo <i>et al.</i> , 2005
Herbaspirillum		
Herbaspirillum lusitanum	Phaseolus vulgaris	Valverde <i>et al.</i> , 2003
Phyllobacterium		
P. lupini	Trifolium pratense ; Lupinus	Valverde <i>et al.</i> , 2005
P. trifolii P. ifriqiense P. leguminum		
Gamma-Proteobacteria	Hedysarum carnosum, Hedysarum spinosissimum subsp. capltatum, Hedysarum pallidum	Benhizia <i>et al.</i> , 2004

I.3 La fixation symbiotique :

On connaît l'importance de l'azote dans la constitution d'un végétal, la chlorophylle, les acides aminés et les alcaloïdes.

On admet que l'approvisionnement en azote assimilable est si fréquemment, un facteur limitant pour la croissance des végétaux, que l'on a souvent et peut être trop couramment même, parlé de « *faim d'azote* » pour expliquer les croissances retardées (Boullard *et al.*, 1962).

Cependant, il faut envisager le cas particulier des légumineuses qui, grâce à une symbiose avec des microorganismes fixateurs d'azote moléculaire, appelés *Rhizobium*, synthétisent directement leurs tissus.

La symbiose se caractérise par la présence d'organes particuliers, situés au niveau des racines, appelés nodosités, au sein desquels la bactérie réduit l'azote atmosphérique en

Analyse bibliographique

ammoniac, assimilable par la plante. En contrepartie, la plante fournit à son symbiote une niche écologique et les substrats carbonés issus de la photosynthèse, nécessaires à son métabolisme (Kondorosi et Kondorosi, 2000).

L'établissement de cette interaction est très spécifique et résulte d'un dialogue moléculaire entre les deux partenaires (Garg et Geetanjali, 2007), schématisé dans la Figure (1).

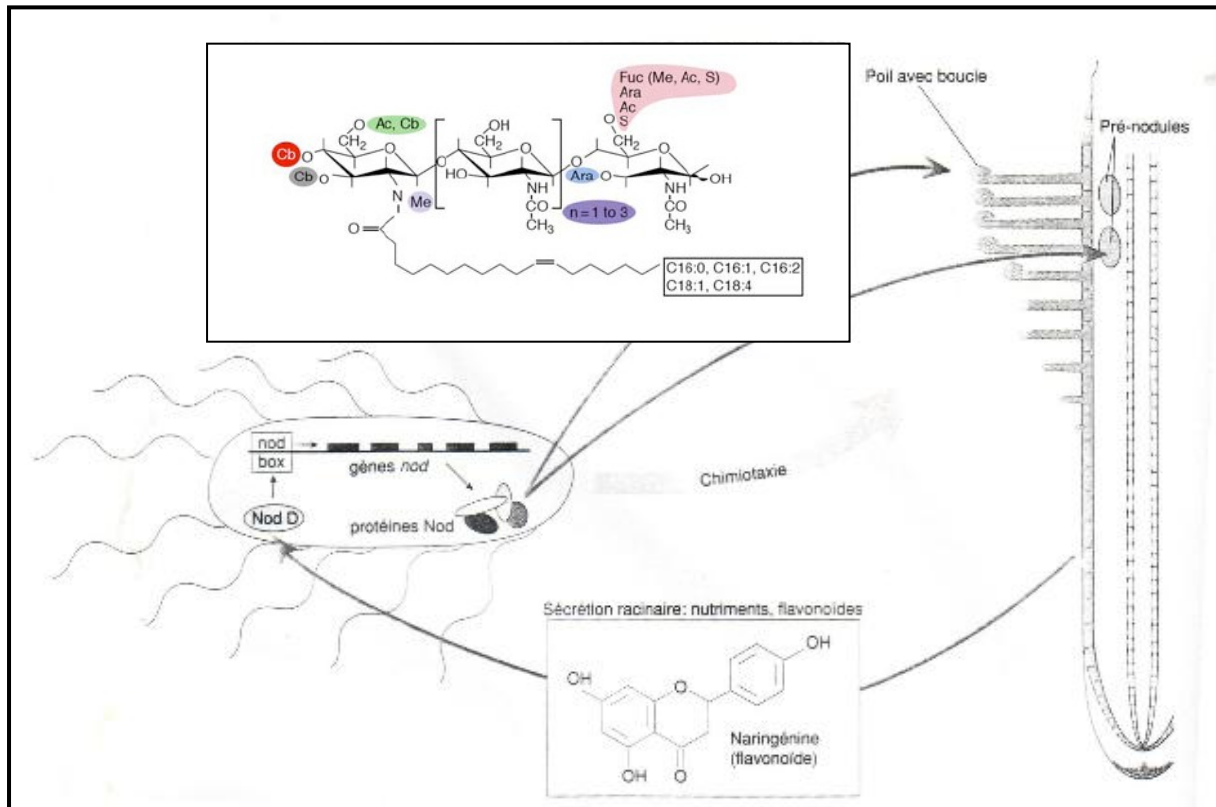


Figure n°1 : Dialogue moléculaire entre les racines et les *Rhizobiums*

(Gobat *et al.*, 1998)

La formation des nodosités suit plusieurs étapes (**Figure 2**):

I.3.1 Préinfection:

✓ Dans un premier temps, les *Rhizobiums* sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances, principalement par les Phénylpropanoïdes exsudés par la racine (Kape *et al.*, 1991). Une production plus importante est remarquée en condition de carence azotée (Coronado *et al.*, 1995).

Analyse bibliographique

✓ Les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires induisent l'expression des gènes *Nod* bactériens qui gouvernent la production des facteurs *Nod*, qui sont des lipochitooligosaccharides, dont les formes variables déterminent la spécificité de l'hôte (Perret *et al.*, 2000) .

✓ Ces facteurs induisent des changements morphologiques, physiologiques et moléculaires chez la plante hôte. Les poils racinaires peuvent adopter différentes formes en fonction de leur stade de développement, en crosse de berger, courbé, renflé, entrelacé, déformé, branché ou joints (Wood et Newcomb, 1989).

✓ Les facteurs Nod, isolés de différentes espèces de *Rhizobium*, possèdent tous la même structure de base : ce sont des lipo-chito-oligosaccharides constitués d'un squelette d'oligochitine de 3 à 5 résidus de N-acétyl-glucosamine, acylé à l'extrémité non réductrice par un acide gras. La nature de l'acide gras (longueur et degré d'insaturation) et des substituants chimiques présents sur le squelette d'oligochitine sont caractéristiques d'une espèce bactérienne donnée et déterminent la spécificité d'interaction entre la bactérie et sa plante hôte (Dénarié *et al.*, 1996).

I.3.2 Infection :

Au cours de l'infection, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire qui crée une zone confinée dans laquelle la bactérie est entourée par la paroi végétale. Un cordon d'infection (qui est une structure tubulaire qui croît à l'intérieur de la cellule et dans laquelle la bactérie prolifère) est initié à partir de ce point par hydrolyse de la paroi (Mateos *et al.*, 2001), invagination de la membrane végétale et production de matériel pariétal par la plante (Gage et Margolin, 2000 ; Gage, 2004).

I.3.3 Développement des nodosités :

✓ A la faveur d'une lyse localisée de la paroi, les bactéries colonisent le cordon d'infection, qui croît, progresse et se ramifie de cellule en cellule jusque dans le parenchyme cortical de la racine. Les cellules du cortex reprennent leurs divisions et édifient une nodosité (Foucher et Kondorosi, 2000).

✓ Au bout du cordon d'infection, les bactéries entrent dans les cellules en s'entourant d'une membrane péribactéroïde, dérivée du plasmalemmes, elles se transforment alors en bactéroïdes (augmentation de leur taille et déformation). Ces derniers, possèdent en

Analyse bibliographique

effet une enzyme, il s'agit de la nitrogénase qui catalyse la réduction de l'azote atmosphérique en azote ammoniacal utilisable par les cellules végétales (Duhoux et Nicole, 2004).

✓ L'azote offert par les bactéries est directement utilisé par la plante, ainsi, il est moins susceptible à la volatilisation, la dénitrification et au lessivage (Garg et Geetanjali, 2007).

✓ Les nodosités renferment un pigment rouge très voisin de l'hémoglobine, appelé lég'hémoglobine. La dégradation de ce dernier correspond à l'arrêt de la fixation de l'azote, et son apparition dans les nodosités coïncide avec le démarrage de la fixation. Cette pigmentation règle la pénétration d'oxygène qui se localise dans le cortex nodulaire interne et se dirige vers le bactéroïde (Dommergues et Mangenot, 1970).

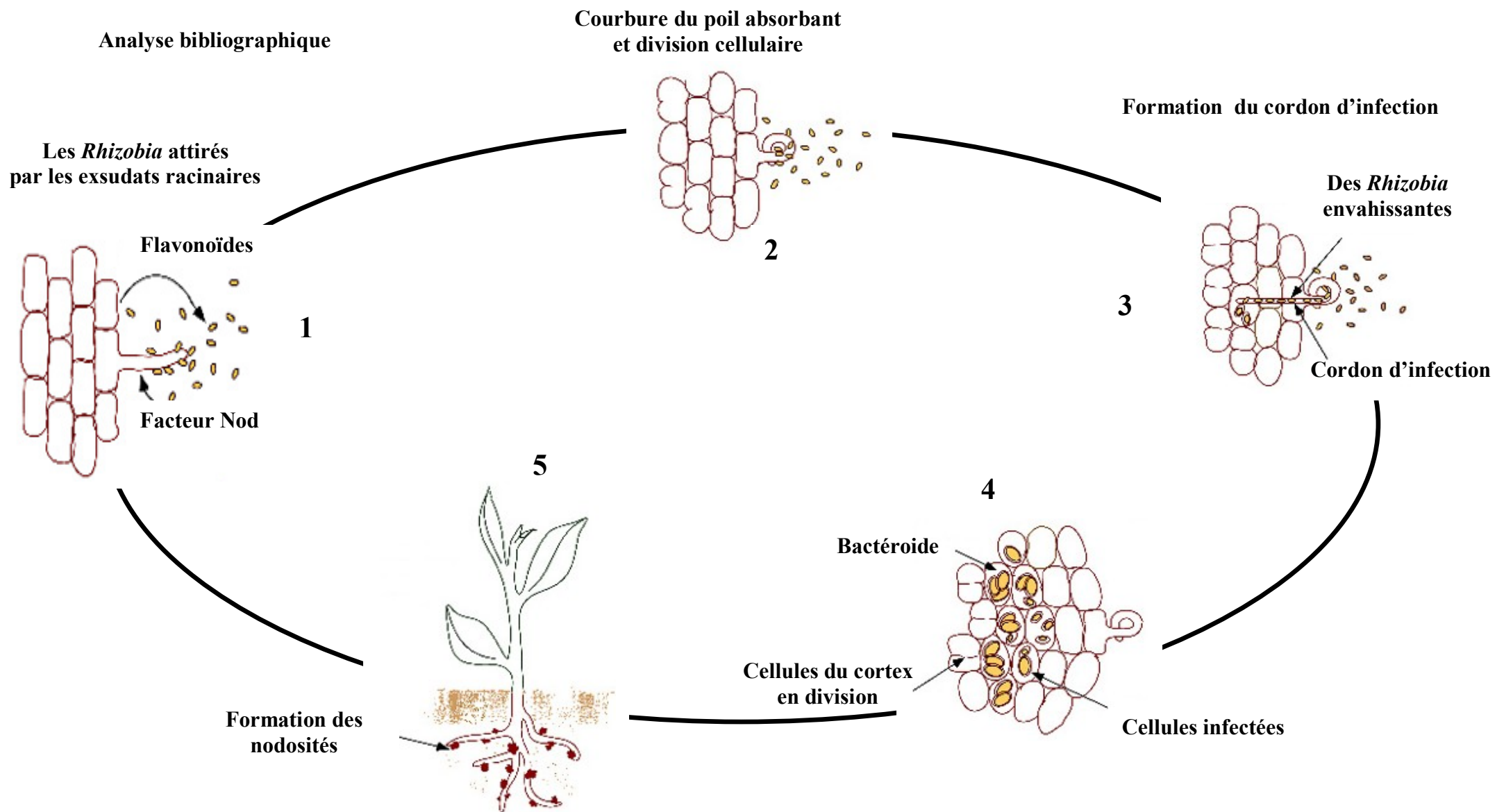


Figure n° 2 : Les principales étapes de la formation des nodosités (Long et Staskawicz, 1993)

Analyse bibliographique

Les nodosités ainsi formées peuvent adopter plusieurs formes :

✚ Nodosités à croissance indéterminée où l'activité méristématique se maintient (cas du pois et la luzerne). De nouvelles cellules apicales sont continuellement infectées. Cela résulte en une forme cylindrique de la nodosité.

✚ Nodosités à croissance déterminée où l'activité méristématique cesse tôt (cas du soja, de l'haricot et de l'arachide). Les cellules infectées engendrent d'autres cellules infectées et la nodosité en grandissant par expansion acquiert une forme sphérique. Ce type de nodosité existe seulement chez les légumineuses.

✚ Un troisième type intermédiaire a été identifié chez le genre *Lupinus* et *Sesbania rostrata*. (Les divisions cellulaires se font soit dans le cortex externe soit dans le cortex interne, conduisant à la formation de nodosités soit déterminées soit indéterminées) (Hirsch, 1992, Hirsch *et al.*, 2001).

II. La fixation symbiotique chez le pois chiche :

II.1. Le genre *Cicer* :

Le pois chiche est une légumineuse alimentaire de grande importance en Europe, l'Afrique du Nord, l'Inde et les pays du Moyen orient (Iqbal *et al.*, 2006 ; Viveros *et al.*, 2001). Il est cultivé principalement en Algérie, Ethiopie, Iran, l'Inde, le Mexique, le Maroc, le Pakistan, l'Espagne, la Syrie, la Tanzanie, la Tunisie et la Turquie (Naghavi et Jahansouza, 2005).

Il se développe dans les environnements écologiquement divers, semi-arides y compris l'Inde, la région méditerranéenne, l'Afrique orientale, les Amériques et l'Europe (Chandrasekaran *et al.*, 2007).

Le pois chiche a plusieurs noms vernaculaires tels que :

Le bengal gram (indien), Egyptian pea, Chestnut bean, chickpea (anglais), le chana (hindi), homms (arabe), le garbenzo ou le garavance (espagnol), garbanzo (Amérique latine), nohud, lablabi (Turquie) et shimbira (Ethiopie) (Redden et Berger, 2007).

Le genre *Cicer* comprend 43 espèces :

9 annuelles et 35 vivaces, les espèces sauvages de *Cicer* les plus étroitement apparentées à *Cicer arietinum* sont les annuelles *Cicer reticulatum* (Ladiz) et *Cicer echinospermum* (P.H.Davis).

Analyse bibliographique

Cicer reticulatum, est une espèce rare, originaire de Turquie, est parfois considérée comme une sous-espèce de *Cicer arietinum*, sur les plans morphologiques, biochimiques et caryologiques, il est très semblable et s'hybride sans problème avec lui.

Les autres espèces apparentées sont :

Cicer bijugum (RECH.f), *Cicer chorassanicum* (Bunge) popov, *Cicer cuneatum* Hochst .es A.Rich, *Cicer judaicum* (Boiss), *Cicer pinnatifidum* Jaub et Spach

Cicer yamashitae Kitam, (toutes des annuelles) et *Cicer anatolicum* Alef. (Une vivace), et certaines d'entre elles ont servi en croisement avec le pois chiche cultivé. (Bejiga et Vander maesen , 2006).

II.2. *Cicer arietinum* :

Classification :

Règne : plantae

Sous règne : tracheobionta (plantes vasculaires)

Embranchement : spermatophyta (plantes à graines)

Sous embranchement : magnoliophyta (=angiospermes, phanérogames ou plantes à fleurs)

Classe: magnoliopsida (ou dicotylédones)

Sous-classe : rosidae

Ordre : fabales

Famille : fabaceae (=fabacées, papilionacées ou légumineuses)

Genre : *Cicer* L.

Espèce : *Cicer arietinum* L (USDA, 2008)

II.2.1. Description botanique :

Plante membre de la famille des légumineuses, diploïde ($2n = 16$ chromosomes), annuelle et auto fécondée (Vail *et al.*, 2005), étalée à érigée, atteignant 100 cm de haut ;

Tige : simple ou ramifiée dès la base.

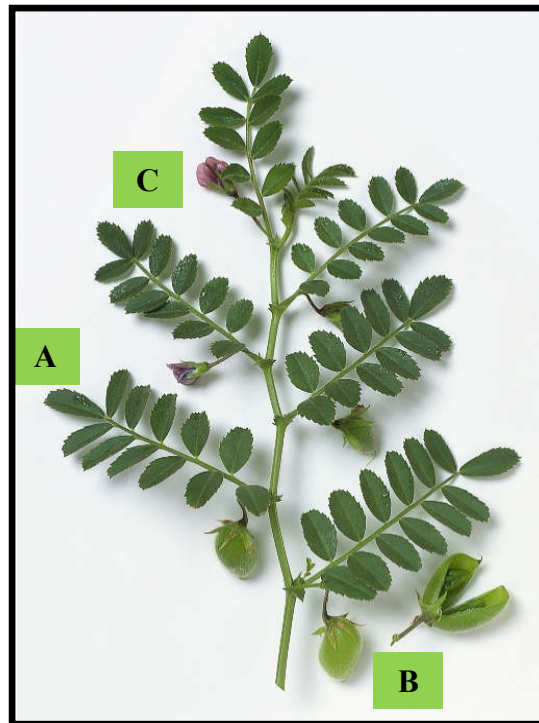
Racines : Racines pivotante atteignant 1-2 m de profondeur et racines secondaires pour la plupart étalées à 15-30 cm de profondeur dans le sol.

Feuille : Feuilles alternes, imparipennées, à (7-) 11-15(-17) folioles ; stipules 2-5 fides, ovales à triangulaires, de 3-5 mm × 2-4 mm, rachis de 2.5-8 cm de long, cannelé sur le dessus ; folioles sessiles, ovales à elliptiques, de 5-20 mm × 2-15mm, à bords fortement dentés dans les deux tiers supérieurs, pubescentes glandulaires des deux cotés. Inflorescence réduite à une fleur axillaire unique ; pédoncules de 3-20 (-37) mm de long ; bractées 1-3, linéaires à triangulaires, atteignant 3mm de long.

Analyse bibliographique

Fleurs : fleurs bisexuées, papilionacées ; pédicelle de 3-12 mm de long, récurvé au moment de la fructification ; calice campanulé, tube de 3-4 mm de long, dents lancéolées, de 4-5 mm de long, à nervures médianes prononcées ; corolle blanche, rose, violacée ou bleu, étendard obovale, de 8-10mm × 7-10(-17)mm, muni d'un large onglet, ailes obovales de 6-9 mm × environ 4mm, auriculées, carènes de 6-8 mm × environ 3mm munie d'un onglet long de 2-3 mm ; étamines 10,9 réunies sur 4-5 mm et 1 libre, anthères basi-dorsifixes ; ovaire supère, sessile, ovale, de 2-3 mm × 1-1.5 mm, 1-loculaire, style incurvé, de 3-4 mm de long, stigmate petit.

Fruit : Gousse renflée rhomboïde-ellipsoïde de 12-35 mm × 8-20 mm, densément pubescente glanduleuse, à 1-2 (-4) graines. La graine est globuleuse à anguleuse obovoïde, de 5-14 mm × 4-10 mm, à rainure médiane et à bec bien distinct surplombant le hile, crèmes à brunes, vertes ou noires, surface lisse ou ridée. Plantule à germination hypogée ; les deux premières feuilles sont écailleuses (Bejiga et Van der Maesen, 2007).



A: Folioles

B: Gousse

C: Fleur

Figure n°3: *Cicer arietinum* L.

Analyse bibliographique

Le pois chiche a une maturation tardive, a besoin habituellement d'un stress hydrique pour accélérer la maturité. Les plantes commencent à fleurir approximativement 50 jours après qu'elles émergent.

En général, les plantes mûrissent en 110 à 130 jours et atteignent une taille de 8 à 24 pouces (20 à 60 centimètres).

II.2.2. Propriétés nutritionnelles :

La composition des graines de pois chiche, par 100g de partie comestible, est :
Eau 11.5 g, Energie 1525 KJ (364 Kcal), protéines 19.3g, Lipides 6g, Glucides 60.7g, Fibres alimentaires 17.4 g, Ca 105 mg, Mg 115 mg, P 366 mg, Fe 6.2 mg, Zn 3.4 mg, Vitamine A 67 UI, Thiamine 0.48 mg riboflavine 0.21 mg, niacine 1.5 mg, Vitamine B6 0.54 mg, Folates 557µg et Acide ascorbique 4mg.

La composition en acides aminés essentiels, par 100g de partie comestible, est :
Tryptophane 185 mg, Lysine 1291 mg, Méthionine 253 mg, Phénylalanine 1034 mg, Thréonine 716 mg, Valine 809 mg, Leucine 1374 mg et isoleucine 828 mg.

Les principaux acides gras par 100g de partie comestible, sont :
Acide linoléique 2593 mg, Acide oléique 1346 mg, Acide palmitique 501 mg, Acide linolénique 101 mg et Acide stéarique 85 mg (USDA, 2004).

La teneur en protéine du pois chiche est plus faible que celle de la plupart des autres légumes secs. Elle est compensée par une meilleure digestibilité. Parmi les facteurs antinutritionnels, il faut citer des inhibiteurs de trypsine, les hémagglutinines, les tanins et les oligosaccharides (Bejiga et van der Maesen, 2006).

II.2.3. Types de cultures :

Il y a deux types principaux de pois chiche, qui se distinguent par la taille, la forme et la couleur des graines :

✚ L'un à petites graines de couleur sombre, lisses ou ridées, qui sont des plantes buissonnantes à folioles et fleurs relativement petites, à tiges contenant des pigments d'anthocyane violacés et à fleurs d'un bleu violet, sont cultivées surtout en Asie méridionale et en Ethiopie, appelé *le Desi* (**Figure 4.B, D**).

✚ l'autre à grosses graines de couleur crème, à croissance érigée et à fleurs blanches s'appelle *le kabuli* (**Figure 4.A, C**).

Les graines de pois chiche *de Kabuli* sont cultivées dans les régions tempérées, tandis que le type *desi* est cultivé dans les tropiques semi-arides (Naghavi et Jahansou, 2005 ; Iqbal *et al.*, 2006).

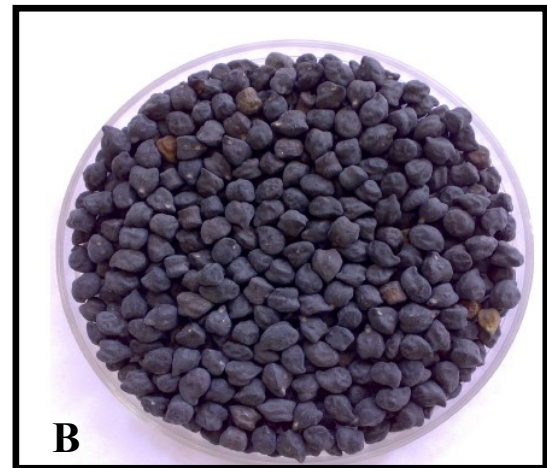


Figure n°4 : Les types de cultivars de pois chiche

(Maheri Sis *et al.*, 2008)

A : pois chiche de type Kabuli

B : pois chiche de type Desi

C: Pois chiche de type Kabuli

D: Pois chiche de type Desi

“Fleur blanche”

“Fleur violette”

II.2.4. Exigences culturelles :

La température exerce une forte influence sur les phases végétatives et reproductrices du pois chiche (Summerfield *et al.*, 1979). C'est une plante à climat intermédiaire. La température optimale exigée par le pois - chiche d'hiver varie entre 18°C et 29°C le jour et 20°C la nuit (Verret *et al.*, 1982 et Girrard *et al.*, 1985).

Analyse bibliographique

Il est considéré, comme étant une plante de jours long (Summerfield *et al.*, 1979). L'intensité de la lumière et de la durée d'éclairement sont des facteurs importants pour la nodulation et la fixation d'azote (Beddar *et al.*, 1990).

C'est aussi une espèce relativement résistante à la sécheresse. Sa consommation en eau a été estimée entre 110 et 240 mm par an pour produire des rendements en grains allant de 9 à 30 qx /ha en semis d'hiver (Singh et Bhushan, 1979 ; Sexana *et al.*, 1987). IL a été établi aussi que le pois- chiche consomme la majeure partie de son eau dans les soixante premiers centimètres (Keating et Cooper ,1983) où sa grande capacité d'absorption de l'eau s'effectue grâce à son système racinaire très développé à cette profondeur (Duke *et al.*, 1981).

Comme la plupart des légumineuses à graines, le pois -chiche est sensible à la sécheresse à certaines périodes ; Sa plus grande sensibilité se situe à la floraison (Girrard *et al.*, 1985), un déficit hydrique à ce stade là, se traduit par une diminution du nombre de gousses, de poids de 100 grains et par une augmentation de gousses vides (Wery *et al.*, 1986).

Le pois chiche est cultivé dans des régions arides et semi-arides. Il est considéré pour être une espèce sensible au sel (Ashraf et Waheed, 1993). Puisque le genre est indigène de ces régions, quelques génotypes peuvent avoir une certaine adaptation aux sels (Soussi *et al.*, 1999).

La tolérance aux sels se produit non seulement dans une espèce, mais diffère également dans les génotypes de la même espèce (Serraj *et al.*, 2002).

La variabilité génotypique parmi les cultivars desi et kabuli (avec le kabuli montrant une tolérance plus élevée), a été récemment rapportée (Rao *et al.*, 2002).

Cependant, les études sur les génotypes de desi et kabuli sont limitées à la croissance de plantes et les détails sur les marqueurs physiologiques et biochimique responsables de la tolérance au sel manquent. On peut en déduire que les rendements de pois chiche dans les sols salins peuvent être améliorés à une grande ampleur en choisissant un couple plante hôte-microsymbiote tolérant à la salinité.

Le pois chiche semble préférer les sols profonds, plus ou moins argileux avec une bonne capacité de rétention (Saxena *et al.*, 1987), il ne supporte pas les sols mal drainés qui favorisent le développement de maladies cryptogamiques (Planquart et Wery , 1991). Les sols très calcaires sont à exclure, car ils donnent des graines qui cuisent mal. Le pH du sol favorable à cette culture se situe entre 6 et 9 (Braune *et al.*, 1988).

II.2.5. Utilisation :

La plupart des pois chiches sont produits pour la consommation humaine puisqu'ils présentent un véritable stock de protéines et d'énergie (Christodoulou *et al.*, 2005).

Analyse bibliographique

Consommé seul ou avec des céréales, il constitue un plat d'accompagnement sous forme de sauce ou de soupe.

Le pois chiche entre également dans la composition d'aliments de sevrage. Les graines immatures se mangent crues ou grillées et salées en amuse-gueule. Les jeunes pousses de pois chiche se mangent comme légume.

Les graines brisées et les résidus provenant de la production de dal (confectionnées en cassant les graines et en enlevant l'enveloppe) s'emploient en alimentation animale, la paille sert de fourrage et les tiges séchées ainsi que les racines sont utilisées comme combustible pour faire la cuisine. L'amidon de pois chiche convient à l'apprêt du textile ; il donne aux vêtements de soie, de laine ou de coton une légère touche de finition ; il s'emploie également dans la fabrication du contreplaqué. Une teinture analogue à l'indigo s'obtient à partir des feuilles de pois chiche (Bejiga et Van der Maesen, 2006).

Pendant les dernières décennies, l'intérêt pour leur rôle dans le régime alimentaire chez l'animal a été grandissant (Dixon et Hosking, 1992). Cela est dû à l'interdiction des protéines d'origine animale et l'utilisation abondante des OGM (Lanza *et al.*, 2003).

II.2.6. Production internationale :

D'après les statistiques de la FAO (**Tableau 2**), la production mondiale annuelle de pois chiche et la superficie récoltée sont restées relativement stables entre 1961 et 2003, la première avoisinant les 7 millions de tonnes et l'autre les 10 millions d'hectares. Les principaux pays producteurs sont l'Inde, la Turquie, le Pakistan, le Canada, le Mexique, et l'Australie.

**Tableau n°2 : Bilan de production de pois chiche dans le monde durant la période
« 2002-2007 » (Skrypetz *et al.*, 2006)**

MONDE : BILAN DE POIS CHICHES					
	2002 -2003	2003 -2004	2004 -2005	2005 -2006^{ep}	2006 -2007^p
Superficie récoltée (kha)	9 900	10 925	10 545	10 710	10 800
Rendement moyen (t/ha)	0,72	0,80	0,79	0,82	0,80
	milliers de tonnes.....				
Stocks de report (e)	400	100	400	300	500
Production :					
Inde	4 240	5 720	5 470	5 650	5 700
Turquie	650	600	620	610	610
Pakistan	362	675	611	868	400
Australie	139	186	123	138	304
Iran	300	310	310	310	280
Mexique	235	240	240	240	240
Myanmar	212	228	230	230	230
Canada	156	68	51	104	163
Éthiopie	187	114	136	135	135
Irak	97	104	100	95	100
États-Unis	38	20	27	49	67
Syrie	89	87	45	55	55
Espagne	70	51	57	18	40
Maroc	51	43	42	42	40
Autre	259	275	271	288	286
Production totale	7 085	8 721	8 333	8 832	8 650
Production totale - kabuli (e)	2 103	1 885	1 871	1 914	2 005
Production totale - desi (e)	4 982	6 866	6 462	6 918	6 645
Offre totale	7 485	8 821	8 733	9 132	9 150
Utilisation totale (e)	7 385	8 421	8 433	8 632	8 650
Stocks de fin de campagne (e)	100	400	300	500	500
Rapport stocks/utilisation	1 %	5 %	4 %	6 %	6 %
e : estimation d'AAC, septembre 2006; ep : estimation provisoire					
p : prévision d'AAC et de Pulse Australia, septembre 2006 ; Source: FAO, India Department of Agriculture, ABARE, Pulse Australia, USDA et Statistique Canada					

II.2.7. Production en Algérie :

En Algérie, les espèces cultivées de légumineuses alimentaires ont bénéficié de peu d'intérêt dans le domaine des ressources phytogénétiques. Concernant le pois chiche, Les cultivars, populations ou variétés locaux ne sont pas bien connus actuellement bien qu'ils aient fait l'objet de plusieurs études de caractérisation dans les années 60 (Laumont et Chevassus ,1956a, 1956b).

Toutes ces espèces présentent des intérêts non négligeables. Leur perte, en tant que ressources génétiques, est due à des facteurs biotiques, abiotiques, mais essentiellement à des

Analyse bibliographique

facteurs anthropiques (perte du savoir, des pratiques traditionnelles, changement de semences, progrès agricoles ...) (Sadiki et Halila, 1997).

L'espèce *Cicer arietinum* occupe une grande place dans nos habitudes alimentaires ; elle est de ce fait très demandée par la population. La production actuelle de pois chiche est très faible et les surfaces occupées par cette espèce sont en diminution (Abdelguerfi Laouar *et al.*, 2001a). **(Tableau 3).**

Tableau n°3: Récapitulatif des superficies, des productions, des rendements et les taux D'accroissement 2005/2006 (Ministère de l'agriculture)

	2005			2006			Taux d'accroissement % 2005/2006		
	Sup ha	Prod qx	Rdt qx/ha	Sup ha	Prod qx	Rdt qx/ha	Sup	Prod	Rdt
	69240	471060	6,8	66866	440 690	6,6	-3	-6	-3
Fèves-féveroles	35082	268860	7,7	33537	242 986	7,2	-4	-10	-5
Pois secs	8 299	53 390	6,4	9 157	53 810	5,9	10	1	-9
Lentilles	1 090	4 230	3,9	1 218	6 584	5,4	12	56	39
Pois chiches	23348	137270	5,9	21252	127 058	6,0	-9	-7	2
Haricots secs	1 206	6 660	5,5	1 496	9 145	6,1	24	37	11

II.3. La Symbiose *Cicer - Rhizobium* :

Les classifications précédentes des bactéries nodulant le pois chiche ont été basées en grande partie sur la spécificité pour la plante hôte (Gaur *et al.*, 1979), les caractéristiques sérologiques et antigéniques (Kingsley *et al.*, 1983), les traits culturels et le polymorphisme du gène *nif*HD (Cadahia *et al.*, 1986) .

Cependant, sur la base du taux de croissance, ils ont été classés comme *R. loti*, *Rhizobia* à croissance rapide. (Crow *et al.*, 1981, Jarvis *et al.*, 1982) ou comme espèces de *Bradyrhizobium* , à croissance lente. (Jordan *et al.*, 1982) .

L'inclusion des *Rhizobia* de pois chiche dans deux genres différents basés sur l'éventail de temps de génération a été discutée (Chakrabarti *et al.*, 1986 ; Jordan *et al.*, 1984) . Ensuite, basées sur une étude polyphasique, deux nouvelles espèces génomiques, ont été identifiées,

Analyse bibliographique

Rhizobium ciceri et *Rhizobium mediterraneum* (Nour *et al.*, 1994a, Nour *et al.*, 1994b, Nour *et al.*, 1995). Puis, plus tard ont été transférées au genre *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997) Il s'agit des espèces : *M.ciceri* (Nour *et al.*, 1994) et *M.mediterraneum* (Nour *et al.*, 1995).

On a également signalé que les bactéries du genre *Sinorhizobium* peuvent établir une association symbiotique efficace avec le pois chiche. (Mhadhbi *et al.*, 2004).

La symbiose entre le pois chiche et son rhizobium spécifique a été récemment étudiée dans plusieurs pays, La Tunisie (Aouani *et al.*, 2001a), le Maroc (Maatallah *et al.*, 2002), le Canada (Kyei-Boahen *et al.*, 2002), la Turquie (Içgen *et al.*, 2002) et le Portugal (Laranjo *et al.*, 2001, 2002), l'Algérie (Ounana *et al.*, 2006 ; Irekti, 1989) en raison de l'utilité agricole prometteuse de cette récolte comme légumineuse à graines pour l'alimentation animale et humaine et en raison de la spécificité extrême de son *Rhizobium*.

La fixation d'azote présente un maximum au début du remplissage des graines (Wery *et al.*, 1985) ; la baisse qui se produit ensuite est généralement interprétée comme une conséquence de la compétition exercée par les gousses au cours de leur remplissage (Hardy et Havelka, 1975 ; Latimore *et al.*, 1977), se traduisant surtout par une diminution rapide de l'activité des nodosités les plus âgées (Pate et Minchin, 1980).

II.4 Quelques facteurs affectant la fixation symbiotique :

Le *Rhizobium*, local vivant à l'état libre dans le sol, est le premier à subir les effets négatifs liés aux facteurs édapho-climatiques tels la température. Ces facteurs ont un effet négatif à la fois sur le *Rhizobium*, sur la légumineuse hôte et sur la relation symbiotique. Parmi eux, on peut citer :

II.4.1 Effet de la salinité :

La salinité des sols et des eaux d'irrigation sont des facteurs limitant la production végétale en Algérie (Halitim, 1973). Sous le climat aride et semi-aride, les croutes de sel accumulées après l'évaporation de ces eaux donnent naissance à de vastes étendues salées. Cette salinité peut affecter :

✚ La survie et la multiplication du *Rhizobium* dans le sol et la rhizosphère (Alexander, 1984), et touche aussi le processus de l'établissement d'infection du *Rhizobia* (Rai, 1983).

✚ Les premiers pas de l'initiation nodulaire sont extrêmement sensibles aux basses concentrations de NaCl, ceci est probablement dû à la sensibilité aux sels des sites d'infection dans la racine (Singleton et Bohlool, 1984).

Analyse bibliographique

✚ La réduction du nombre des poils absorbants qui portent les cordons d'infection (Zahran et Sprent, 1986 ; Lakshmi-Kumari *et al.*, 1974), en induisant leur contraction en 1981, Tu a montré que la réduction de la nodulation chez le soja sous des conditions de stress salin étaient attribuée au rétrécissement des poils absorbants.

✚ La fonction de la nodosité qui est déterminée comme contenu en légghémoglobine (Delgado *et al.*, 1994) et activité respiratoire des bactéroïdes (Delgado *et al.*, 1993).

✚ Le contenu azoté de la plante (Yousef et Sprent, 1983) et l'efficience et l'effectivité symbiotique, due à une diminution de l'activité nitrogénase (Hafeez *et al.*, 1988) à cause de la fourniture en carbohydrates des nodosités (Bekki *et al.*, 1987).

La tolérance au sel chez la plante hôte, est liée à plusieurs aspects physiologiques du développement, En effet, la sensibilité saline augmente avec l'âge :

✚ Lorsque le sel est fourni immédiatement au moment de l'inoculation durant la germination et l'apparition des plantules, la fixation d'azote est plus sensible à la salinité qu'à la croissance des plantes (Cordovilla *et al.*, 1995).

✚ Cependant, si différentes concentrations de sel sont ajoutées quatre semaines après le début de croissance, durant la période de développement végétative, la nodulation n'est pas affectée par le stress salin, en outre la fixation d'azote et la concentration totale de l'azote de la plante sont moins affectées (Cordovifla *et al.*, 1994).

II.4.2 Effet des nitrates :

Depuis la découverte de l'action inhibitrice de l'azote combiné sur la formation des nodosités chez *Vicia faba* (Rautenberg et Kuhn 1964 in Gonzalez, 1987), de nombreux travaux portant sur diverses légumineuses ont eu pour objectif d'en expliquer le mode d'action. Celui-ci est certainement complexe car le nitrate affecte à la fois le processus d'infection des racines par les bactéries, le développement des nodosités et l'expression de la nitrogénase.

L'analyse bibliographique montre l'existence d'une relation complexe mettant en jeu la plante, le *Rhizobium*, la forme ou la teneur en azote, la période d'application et l'environnement (Gordon *et al.*, 2002 ; Fujikake *et al.*, 2003) . Dans l'état actuel des connaissances, l'influence des nitrates dans la symbiose *Rhizobium*-légumineuses reste encore mal connue surtout sur le plan des mécanismes. Cependant, plusieurs hypothèses ont été adoptées :

✚ Il est admis que le facteur majeur qui induit des changements dans l'activité nitrogénase est la concentration d'oxygène libre à l'intérieur de la nodosité. La présence de

Analyse bibliographique

nitrate peut réduire la disponibilité de cet élément en augmentant la résistance à la diffusion des gaz dans le cortex nodulaire (Neo et Layzell, 1997).

✚ De plus, comme les cellules hôtes de la nodosité possèdent une nitrate réductase active ; on observe une accumulation des nitrates dépendante de la pression en oxygène dans les nodosités (Heckmann et Drevon, 1987). Ces nitrates pourraient se combiner avec la leghémoglobine, le transporteur d'oxygène de la nodosité, pour former un composé inactif, d'où l'interruption de l'apport d'oxygène, donc de l'ATP nécessaire au fonctionnement de la nitrogénase (Rigaud et Puppo, 1977 ; Bekki *et al.*, 1987).

✚ Une autre hypothèse met en évidence un lien indirect entre la fixation de l'azote et le feed-back de l'azote soluble des feuilles vers les nodosités (Parson *et al.*, 1993 ; Hartwig, 1998 ; Serraj *et al.*, 1999). Dans ce cas, l'absorption des nitrates peut avoir des répercussions sur le métabolisme général de la plante. Il est possible alors, que la réduction du nitrate dans les feuilles produise des acides aminés et amides qui seraient exportés au reste de la plante et qui seraient vraisemblablement impliqués dans la réduction de la fixation de l'azote.

✚ Le métabolisme dans les nodosités de la légumineuse a besoin d'être régulé pour assurer une coordination entre la quantité d'azote fixée, la croissance et les exigences en azote de la plante. Il est maintenant établi qu'il y a généralement des interactions régulatrices entre photosynthèse, accumulation des hydrates de carbone et croissance qui impliquent des besoins précis en sucre, nitrate ou d'autres composés azotés (Stitt et Krapp, 1999).

II.4.3 Effet du phosphore :

Selon Munns et Mosse (1980), les légumineuses, en général, requièrent de grandes quantités de phosphore et leur capacité à en prélever du sol est souvent moins importante que celle des céréales.

Les légumineuses disposent d'un système racinaire moins développé par rapport aux graminées ; ce qui limite l'absorption du phosphore qui se diffuse très lentement à travers la solution du sol vers la rhizosphère (Munns et Mosse, 1980).

La fertilisation phosphatée augmente significativement les rendements en grains des fèves (Lewis et Hawthorne, 1996 ; Bolland *et al.*, 1999). Le poids du grain ainsi que sa qualité sont positivement affectée par la fertilisation phosphatée (Farouk et Abdella, 1986).

Une déficience en phosphore chez les légumineuses n'affecte pas seulement l'établissement de la culture et sa croissance mais aussi la nodulation et la fixation biologique d'azote (Tang *et al.*, 2001a).

Dans une expérimentation sur différentes légumineuses (fève, petit pois et haricot), Koala Saidou (1986) a trouvé que l'augmentation des apports de P augmente le nombre et le poids

Analyse bibliographique

des nodules parallèlement à l'amélioration de la matière sèche des racines et de la partie aérienne. Ce qui suggère que le phosphore améliore la fixation biologique d'azote par l'amélioration de la biomasse de la plante et par la suite la mise en place des photoassimilats pour la fixation biologique d'azote plutôt que par l'amélioration directe de l'initiation ou du fonctionnement des nodules.

Par contre, Tang et al. (2001b), en étudiant l'effet de la déficience phosphatée chez la luzerne, ont conclu que le P joue également un rôle dans le fonctionnement des nodules. En effet, l'activité de l'enzyme nitrogénase requiert 21 moles d'ATP pour réduire l'azote en ammonium (Barea *et al.*, 1988). Selon les mêmes auteurs, c'est pour cette raison que, généralement, les nodules contiennent deux à trois fois plus de phosphore par unité de matière sèche que les racines sur lesquelles elles sont fixées.

Almeida *et al.* (2000) ont montré chez le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) que sous déficience phosphatée très élevée, la nodulation et la fixation biologique d'azote sont régulées par feed back suite à la réduction de la demande en azote. Chez le pois-chiche (*Cicer arietinum*), Kurdali (1996) a montré que la compétition entre les nodules et les gousses pour le P peut contribuer à la réduction de la fixation biologique d'azote après la floraison.

Comme pour la déficience phosphatée, l'excès de P peut aussi nuire à la fixation biologique d'azote. Selon, Barea *et al.* (1988) cet effet est attribué à l'antagonisme du phosphore avec le Zn.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

1 Matériel :

1.1 Matériel végétal :

Quatre variétés de pois chiche (*Cicer arietinum*.L) ont été choisies : 93.93C, 662.25, 81680 et 81677, elles ont été fournies par l'Unité de Recherche INRAA de Sidi Bel Abbès.

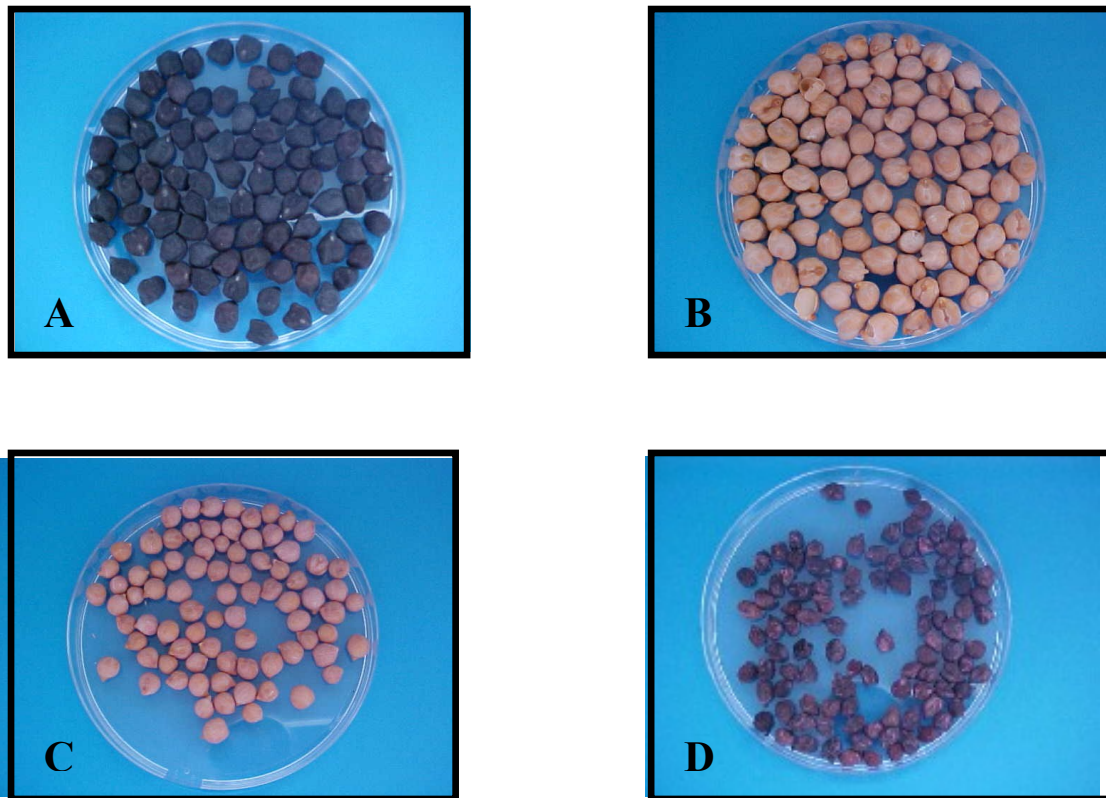


Figure n°5 : Les quatre lignées de pois chiche utilisées pour l'étude.

A) La variété **662.25**

B) la variété **93.93C**

C) La variété **81677**

D) la variété **81680**

1.2 Le sol :

Quatre échantillons de sol, originaire de l'ouest algérien sont testés pour la nodulation du pois chiche. Il s'agit de : Ain Témouchent, Tessala, Zahana et la station de l'ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures). Les caractéristiques physico-chimiques de ces sols ont été déterminées par le laboratoire d'analyse des sols de l'Unité de Recherche INRAA de Sidi Bel Abbès et le laboratoire TECHANAL de Tlemcen et sont présentées dans le **Tableau 4**.

Matériels et méthodes

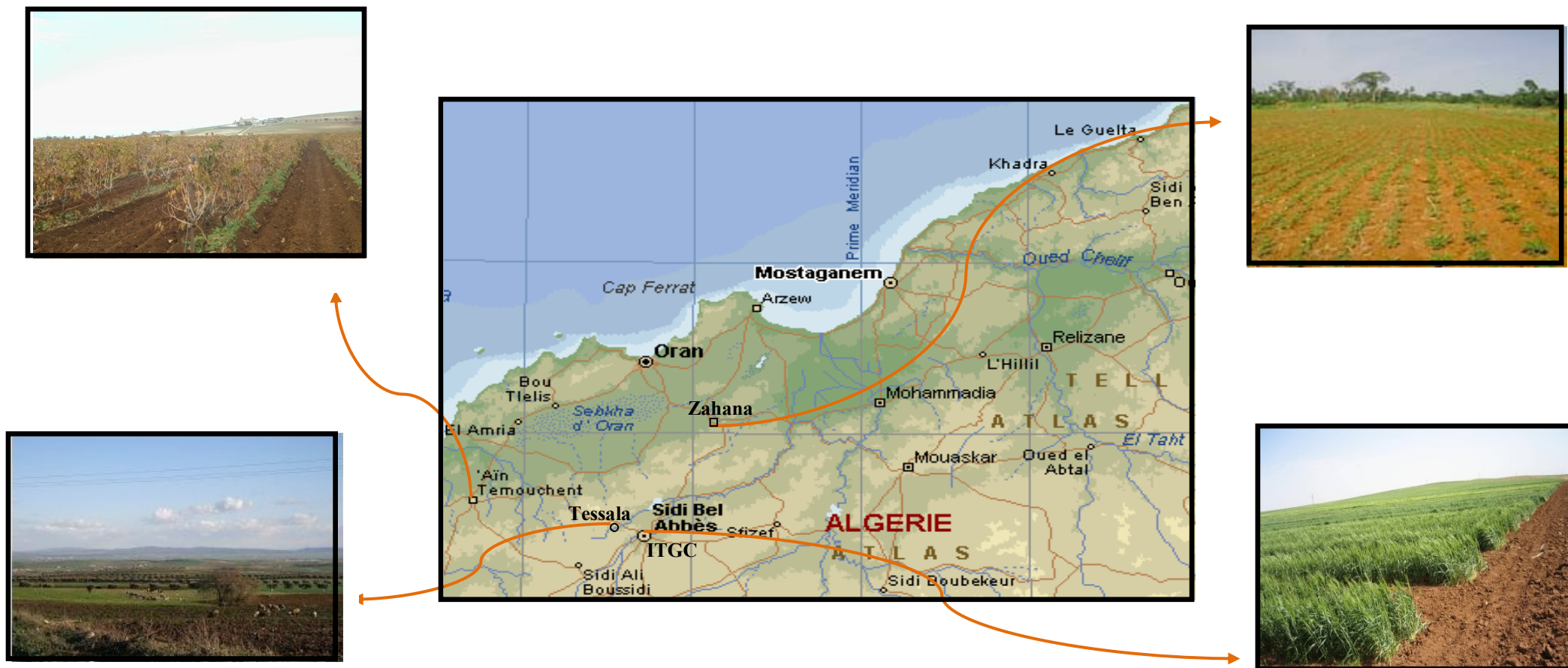


Figure n°6 : Localisation des sites de prélèvement des quatre sols testés au cours de l'étude.

Matériels et méthodes

2 Méthodes :

2.1 Analyses physico-chimiques du sol :

2.1.1 Analyses physiques :

a- Analyse granulométrique :

Cette analyse a été effectuée selon la technique de Rouiller, 1994 :

L'analyse granulométrique du sol ou encore appelée analyse mécanique, ou analyse physique consiste à classer les éléments du sol d'après leur grosseur et à déterminer le pourcentage de chaque fraction (sable, limon, argile).

L'analyse granulométrique a pour but de définir la texture d'un sol, c'est à dire le pourcentage de ces divers constituants, et par là d'expliquer les propriétés physiques de ce sol son comportement vis à vis de l'eau, de l'air et des racines et d'évaluer sa stabilité structurale (c'est-à-dire la solidité de l'état de la structure du sol et sa résistance aux agents de dégradation). On utilise pour cette analyse de la terre fine obtenue par tamisage au tamis à mailles 2mm, on élimine la matière organique par un oxydant énergétique (H_2O_2), la durée d'exposition dépend de la teneur en matière organique (24h à 48h).

Les particules minérales sont ensuite dispersées à l'aide d'un dispersant alcalin (hexametaphosphate de sodium). Les particules grossières de diamètre supérieur à 50 mm sont séparées par tamisage, les particules moyennes et fines sont obtenues par la mesure de la vitesse de sédimentation. D'après le triangle des textures, on définit la texture de notre sol.

b- Mesure du pH :

La mesure du pH a été réalisée selon la méthode de Callot-Dupuis, 1980.

A 20g de terre fine (séchée à l'air), on ajoute 50 ml d'eau distillée (pour mesurer le pH_{eau}). Le contenu est agité pendant quelques minutes, puis laissé à reposer 2h. Le pH est ensuite mesuré à l'aide d'un pH-mètre après une brève agitation.

2.1.2 Analyses chimiques :

Sur l'homogénat des quatre échantillons prélevés, on a effectué la mesure de la salinité. Le dosage du calcaire total et actif ; le dosage de carbone et de la matière organique et enfin le dosage du phosphore assimilable et l'azote total.

a) Mesure de la conductivité électrique :

La conductivité électrique a été mesurée selon la méthode Aubert, 1978

Le principe consiste à déterminer la conductivité électrique (C. E.) de l'eau pour déterminer la salinité de l'extrait du sol. Elle est effectuée en mélangeant 1/5 du sol avec 4/5 d'eau distillée. Après une agitation de quelques minutes, la solution est chauffée à une température T (25°C).

Matériels et méthodes

Une première lecture est réalisée à cette température (CT), puis chauffée à une température $T'(35^{\circ}C)$. Une deuxième lecture est réalisée avec le conductivimètre (CT').

Le coefficient de température β est calculé comme suit :

$$\beta = (C_{T'} - C_T) \times 100 / (T' - T) \times C_T$$

Le conductimètre (EC 215) est réglé à la valeur β et la mesure de la C.E s'exprime en milli Siemens (mS). On évaluera le degré de la salinité du sol en se référant aux normes internationales (**Annexe 2**).

b) Dosage du calcaire total :

Le dosage du calcaire total est réalisé selon la méthode de (Callot-Dupuis, 1980).

Le calcaire n'est pas un constituant toujours présent dans le sol. Par contre pratiquement tous les sols contiennent du calcium si peu soit-il, cet élément se trouvant en particulier fixé sur l'argile sous forme d'ion calcique ou en solution sous forme de sels solubles de calcium. Le calcaire ou carbonate de calcium, $CaCO_3$, est un sel insoluble. Mais l'eau chargée de gaz carbonique peut le dissoudre lentement le transformant en un sel soluble, le bicarbonate de calcium. C'est ainsi que peu à peu le calcaire disparaît d'un sol donné. Mais la solution du sol, et l'argile gardent très longtemps du calcium provenant de la dissolution du calcaire. On utilise la propriété du carbonate de calcium qui se décompose sous l'action d'un acide (HCl) en eau et gaz carbonique, ce dernier est recueilli dans un tube gradué en ml.

$$CaCO_3\% = (p \times V) \times 100 / (P \times v)$$

p : poids du $CaCO_3$ pure utilisé pour l'étalonnage.

V : volume du gaz carbonique dégagé par l'échantillon du sol.

P : poids de l'échantillon du sol.

v : volume de gaz carbonique dégagé par le $CaCO_3$.

c) Dosage du calcaire actif :

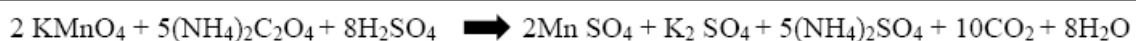
Le dosage du calcaire actif est fait selon la méthode de (Drouineau, 1942).

Dans le sol, une partie plus ou moins importante de calcaire total se trouve à l'état de fines

Matériels et méthodes

particules actives pour les végétaux, cette fraction est facilement solubilisée par les eaux riches en gaz carbonique.

On utilise la propriété du calcium se combinant aux oxalates d'ammonium pour donner de l'oxalate de calcium insoluble, pour le dosage du calcaire actif. L'excès de solution d'oxalate d'ammonium est ensuite dosé par une solution de permanganate de potassium en milieu sulfurique.



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

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

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

N: nombre de ml KMnO_4 utilisés pour titrer la solution d'oxalate d'ammonium.

n: nombre de ml KMnO_4 utilisés pour titrer l'extrait du sol

d) Carbone total et matière organique :

Le carbone total est dosé selon la méthode Anne, 1945

La teneur en matière organique totale du sol s'obtient généralement en dosant la teneur en carbone. On estime que le rapport matière organique / carbone est à peu près constant et égal à **MO/C = 1.72**.

Le carbone de la matière organique est oxydé par un mélange de bichromate de potassium et d'acide sulfurique (H_2SO_4). On admet que l'oxygène consommé est proportionnel au carbone que l'on veut doser. L'excès de bichromate inutilisé dans la réaction est dosé par le sel de Mohr.

e) Dosage de l'azote total : (John M *et al.*, 2005)

L'azote total a été dosé selon la méthode de Kjeldhal. Cette méthode connue depuis 1883, repose sur la destruction des matières organiques par l'acide sulfurique concentré, à l'ébullition, avec formation de sulfate d'ammonium. Après avoir rendu la solution alcaline,

Matériels et méthodes

L'ammoniac déplacé par une base fixe, est entraîné par la vapeur d'eau et le distillat obtenu doit être titré par une solution étalon acide.

On admet que, l'acide sulfurique en oxydant les matières organiques, est partiellement réduit à l'état de SO_2 , ce dernier réduit l'azote qui passe à l'état de sulfate d'ammonium dissous dans l'excès d'acide sulfurique. En prenant les quantités et les concentrations indiquées sur le tableau en (**Annexe 1**), on obtient le pourcentage d'azote dans l'échantillon par la formule suivante :

$$\frac{(b-a) \times 0.1 \times 14 \times 100}{\text{Masse de l'échantillon (g)}}$$

f) Dosage du phosphore assimilable : (Jackson et Peterson, 1964)

Le dosage du phosphore assimilable est réalisé selon la méthode Olsen

La méthode Olsen, au fluorure d'ammonium + bicarbonate de soude (FNH_4 0, 5 N + CO_3NaH 0, 5 N pH 8, 5) sur des sols artificiellement enrichis en acide phosphorique, permet de récupérer 65 % du phosphore ajouté, en outre, elle a l'avantage de conserver la même concentration en FNH_4 (0,5 N).

Le sol est agité à froid, pendant 1heure, dans une solution mixte de fluorure d'ammonium + bicarbonate de soude (FNH_4 0,5 N + CO_3NaH 0,5 N pH 8,5). Le rapport sol/solution=1/50

La solution d'extraction est centrifugée et une aliquote est prélevée. Cette solution, plus ou moins fortement colorée par l'humus, est purifiée par acidification à l'acide sulfurique concentré, l'humus est précipité et séparé par filtration.

La technique de dosage est celle préconisée par DUVAL, c'est-à-dire formation du complexe Phospho-molybdique et réduction par un excès d'acide ascorbique à chaud; il se développe une coloration bleue qui est colorimétrée, soit manuellement soit à l'autoanalyseur.

2.2 Stérilisation des sols :

Les sols ont été homogénéisés et humidifiés avec de l'eau et le tout est porté à ébullition pendant 1heure, selon la méthode de Bergerac (Messiaen C.M ., Blancard D., Rouxel F., Lafon R, 1993).

Pour confirmer l'efficacité de la stérilisation, un ensemencement d'un milieu nutritif a été réalisé, puis incubé à 28°C pendant plusieurs jours.

Matériels et méthodes

2.3 Semis et mise en place des cultures de pois-chiche :

Dans cette étude, les sols sont prélevés de quatre localités de l'ouest Algérien, où le pois chiche est souvent cultivé ou devrait être introduit en rotation avec les céréales. Il s'agit des sols de : Ain Témouchent, Tessala, Zahana et la station d'ITGC.

Pour chaque localité, le sol préalablement homogénéisé et stérilisé, est réparti dans des pots de 2 litre de volume, déjà lavés et désinfectés à l'eau de Javel.

2.3.1. Désinfection des graines :

Les graines sont désinfectées à l'hypochlorite de sodium (2%) pendant 10 min, puis rincées 6 à 10 fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer les traces du désinfectant.

Elles sont ensuite mises à germer aseptiquement sur de l'eau gélosée à (0.8%) (**Annexe 3**) (Tillard et Drevon, 1988) ; les boîtes ainsi préparées sont mises à l'obscurité, à température ambiante.

2.3.2. Culture des plantules:

Chaque pot est aseptiquement ensemencé avec 8 graines germées, dont la longueur de la radicule varie de 2.5 à 3cm, d'une des 4 lignées de pois chiche choisies.

2.3.3. Dispositif expérimental :

Pour répondre aux objectifs signalés à l'introduction, trois traitements ont été retenus :

1. Témoin (-) : sol stérile sans apport d'azote
2. Témoin (+) : sol stérile avec apport d'azote, sous forme d'urée (Super 46), à base de 20g/m^2 avec un intervalle de 10 jours.
3. Naturel : sol avec souches autochtones de *Rhizobium*

Ces trois traitements ont été implantés sous serre, selon un dispositif factoriel en blocs avec trois répétitions.

Matériels et méthodes



Figure n°7 : Dispositif expérimental

L'irrigation a été effectuée régulièrement. Une seule plante par pot, soit les 8 plantes par localité, cultivées jusqu'à mi-floraison (**42 jours après semis**), ont survécu pour inspecter la présence ou l'absence de nodosités, et déterminer la croissance des parties aériennes et racinaires.

2.3.4. Analyse statistique :

L'effet de la stérilisation et la fertilisation sur les différents paramètres de la culture du pois-chiche est apprécié par l'analyse de variance. Les écarts entre les intervalles de récolte, sont évalués par le test de NEWMAN et KEULS.

Tous les traitements statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel STATITCF.

2.4 Etude microbiologique :

2.4.1 Piégeage des *Rhizobia* :

Différentes combinaisons de piégeage sont exécutées avec les variétés de pois chiche sur différents sols à fin d'estimer leur pouvoir d'infectiosité.

Les souches de *Rhizobia* sont isolées à partir des nodules de jeunes plantes de pois chiche (*Cicer arietinum* L.)

Les nodosités sont immergées dans de l'hypochlorite de sodium à 32° pendant 10 minutes, ensuite rincées à l'eau distillée stérile. A l'aide d'une pince flambée à l'alcool, elles sont transférées dans de l'alcool absolu pendant 5 minutes et rincées 5 à 6 fois dans de l'eau distillée stérile.

Matériels et méthodes

Les nodosités ainsi traitées, sont écrasées sur le milieu YEM gélosé (Yeast Extrait Mannitol) (Vincent, 1970), et l'extrait de chaque nodule estensemencé par des stries d'épuisement. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 5 jours. (**Annexe 4**)

2.4.2 Purification des isolats :

De chaque boîte incubée, des colonies bien isolées sont repiquées sur le milieu YEM et incubées à 28°C pendant 48 à 72 h. l'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention de cultures pures.

2.4.3 Etude macroscopique :

Les cultures bactériennes développées permettent de relever l'aspect des colonies : le contour, la forme, la couleur, la surface, le diamètre et la viscosité.

2.4.4 Etude microscopique :

Après coloration de Gram (**Annexe 5**), les cultures sont examinées au microscope photonique pour déterminer le Gram, la forme des cellules, le mode d'association et la pureté de la culture.

2.4.5 Conservation des souches :

Les colonies pures dont les cellules sont des bacilles courts et Gram négatif, sont repiquées stérilement sur le milieu YEM incliné et incubées à 28°C pendant 48 à 72h. Les tubes sont placés à 4°C pour une conservation de courte durée.

Pour une conservation de longue durée, les souches sont conservées, dans du milieu YEM liquide additionné de glycérol à 40% (v/v), à -20°C.

2.4.6 Test de nodulation :

Le test de nodulation est un critère important dans la caractérisation des *Rhizobium*, les isolats extraits des nodosités de *Cicer arietinum* ne peuvent être identifiés comme *Rhizobia* qu'après avoir prouvé leur capacité à former des nodosités sur leur plante hôte en conditions bactériologiques contrôlées (Graham *et al.*, 1991).

Après germination des graines, l'ensemble des plantules obtenues dont la longueur des racines ne dépasse pas 2 cm (**Figure 8**), sont transférées dans des tubes à essai (Longueur 18 cm, diamètre 2 cm, et une capacité de 35 ml) contenant une solution nutritive (**Annexe 6**), décrite par Broughton et Dilworth (1971).



Figure n° 8 : Les graines de *Cicer arietinum*, variété 93.93C, après 7 jours de germination à l'obscurité et à température ambiante

Après leur inoculation par 2 ml de la suspension bactérienne de la souche à identifier d'une concentration de 10^8 cellules/ml (cette concentration est obtenue en comparant la turbidité du milieuensemencé avec celle de Mac Farland n°1 (**Annexe 7**), les plantules sont transférées dans une chambre de culture (de type Sanyo Electrobiomedical. Co. LTd. Prints. Japon) à une température de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, une photo périodicité de 16 heures et une intensité lumineuse de 2000 luxes.

Les racines doivent être maintenues à l'obscurité dans une boîte en carton trouée permettant l'introduction de la moitié inférieure des tubes.

Une agitation quotidienne est réalisée pour faciliter le contact des bactéries avec les racines des plantules. Des plantules non inoculées, servent de témoins (**Figure 9**).



Figure n° 9 : Test de nodulation en hydroponique

Un test de nodulation sur support sable stérile est aussi réalisé, des pots sont remplis par 100g de sable stérilisé, les graines germées sont placées et inoculées avec 2ml d'une suspension bactérienne d'une concentration de 10^8 cellules/ml de chaque souche testée. Les pots sont ensuite placés dans une chambre de culture, les plantules sont arrosées chaque deux jours avec la solution nutritive dépourvue d'azote (**Annexe 6**). Des pots témoins non inoculés sont aussi préparés (**Figure 10**).

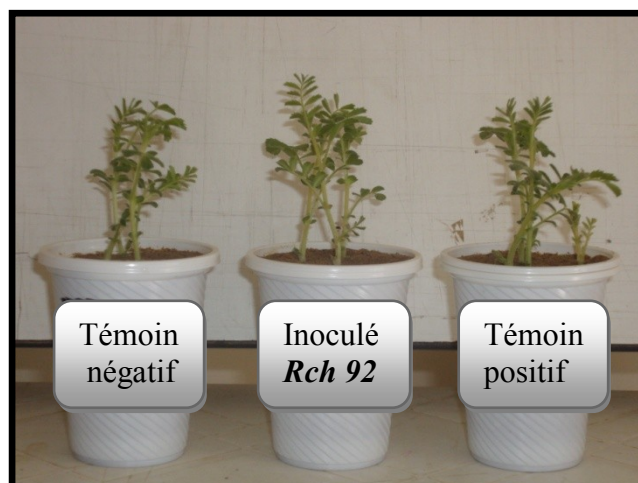


Figure n°10 : Test de nodulation sur sable

Matériels et méthodes

2.5 Etude physiologique :

Tous les tests suivants sont menés sur des boîtes de milieu YEM solide divisés en 20 carrés identiques, chaque carré est inoculé (spot-inoculé) avec 10 μ L de culture de souches préalablement cultivées sur un YEM liquide jusqu'à la phase exponentielle ($+ 10^8$ cel/ml). Les boîtes inoculées sont incubées à 28°C pendant 7 jours.

2.5.1 La tolérance à la température :

La croissance bactérienne à différentes températures est déterminée sur des boîtes de milieu YEM solide inoculées, comme il a été décrit au dessus, et incubées aux températures suivantes : 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 et 45 °C.

2.5.2 La tolérance à la salinité :

La tolérance au chlore de sodium (Na Cl) est déterminée par la croissance sur milieu YEM solide additionné avec 0 à 9% (w/v) de Na Cl après 7 jours d'incubation à 28°C.

2.5.3 La tolérance au pH :

La tolérance au pH est testée sur milieu YEM solide préparé à différents pH : de 4 à 12.

2.5. 4 La résistance intrinsèque aux antibiotiques :

Les tests ont été réalisés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu YEM solide. Les boîtes ont été subdivisées en 20 carrés. Chaque carré a étéensemencé avec 10 μ l d'une préculture fraîchement préparée d'une concentration de 10^8 cel/ml. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement et pour chaque souche. Pour chaque test, des boîtes témoins ont été préparées. Ces témoins ont été réalisés sous des conditions standard avec 0,1% (w/v) NaCl, pH 7,0 et à 28°C. Les résultats de chaque test ont été évalués après une semaine d'incubation. Par comparaison avec les boîtes témoins, les souches ont été notées sensibles (pas de croissance) ou résistantes (bonne croissance).

Le milieu a été additionné de différentes quantités d'antibiotiques, selon la méthode décrite par Somasegaran et Hoben (1985).

Les solutions d'antibiotiques ont été stérilisées par filtration (**Annexe 8**) puis additionnées au milieu YEM préalablement autoclavé et maintenu à une température de 55°C.

Les antibiotiques ont été testés en μ g/ml à des concentrations variant de 10 à 100 pour :

Kanamycine (10 et 100), Streptomycine (25 et 100), Ampicilline (50), Chloramphénicol(20), Erythromycine(100) et la Tétracycline(20).

Matériels et méthodes

2.5.5 La résistance aux métaux lourds :

Ce test a été conduit pour évaluer la capacité des souches à résister à six différents types de métaux lourds. Les solutions de différents métaux ont été stérilisées par filtration (Millipore 0,22 μm , Sigma) puis additionnées au milieu YEM gélosé pour aboutir à des concentrations en $\mu\text{g/ml}$ variant de 25 à 500 : $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (250), ZnSO_4 (50) et $\text{MnCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (500), CoCl_3 (25), HgCl_2 (10) et CuSO_4 (50).

2.5.6 L'utilisation des substrats carbonés:

La capacité des souches à métaboliser différents substrats comme seule source de carbone est testée en utilisant plusieurs sucres :

Saccharose, maltose, inositol, raffinose, galactose, cellobiose, sorbitol, malt, glucose, lactose, glycérol, citrate de sodium, acétate de sodium

Le test est réalisé sur milieu YEM dont le mannitol est remplacé par ces différents sucres. Les boîtes sontensemencées comme il a été précédemment décrit, puis incubées à 28°C pendant une semaine.

2.5.7 Test du bleu de Bromothymol :

La capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YEM a été évalué par l'addition de l'indicateur coloré bleu de Bromophénol à une concentration de 0.0024% (w/v) (**Annexe 9**). Les boîtes inoculées ont été incubées à 28°C pendant 24h.

Les réactions ont été identifiées par le virage de la coloration du milieu. Une coloration jaune indique une réaction acide et une coloration bleu foncée indique une réaction basique.

2.5.8 Hydrolyse de l'urée :

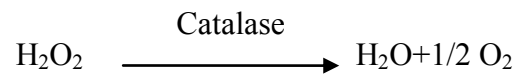
Pour chaque souche, 10 μl de la préculture fraîchement préparée dans le milieu YEM ont été utilisés pour ensemencer des boîtes contenant le même milieu solide additionné de 2% d'urée et 0,012% de rouge de phénol (Jarvis *et al.*, 1977). Les solutions de ces deux produits ont été stérilisées par filtration. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 24 heures. Les résultats ont été évalués par le virage de la couleur du milieu. Une coloration rouge indigo indique l'hydrolyse de l'urée alors qu'une coloration jaunâtre indique une réaction négative.

2.5.9 Détection de la catalase :

Au cours de la respiration des bactéries, il se produit des réactions qui aboutissent à la formation de H_2O_2 toxique pour les bactéries.

Matériels et méthodes

Cette bactérie synthétise une enzyme de détoxification = **Catalase**.



L'O₂ libéré est mise en évidence par contact d'une colonie de souches de *Rhizobium* avec une goutte d'H₂O₂ à 10V.

Si : formation de bulles d'air $\longrightarrow$ R(+) = catalase (+)

Pas de bulles d'air $\longrightarrow$ R(-) = catalase (-)

Chapitre III

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Caractérisation pédologique des sols testés :

Les analyses pédologiques et physico-chimiques d'un sol donné permettent d'apprécier la fertilité naturelle d'un sol, d'expliquer les déficiences de rendements et d'orienter vers le choix des cultures (Soltner, 2005). Elles permettent aussi de rechercher d'éventuelles corrélations entre la présence ou l'absence des *Rhizobia*.

Selon le triangle de la texture (**Annexe 11 ; Tableau 4**), les sols analysés sont classés comme suit :

Le sol d'Ain Témouchent	}	dans l'aire limono-argileuse
Le sol de l'ITGC		
Le sol de Zahana		
Le sol de Tessala : dans l'aire argile limoneuse,		

En termes de granulométrie, les sols analysés renferment des éléments grossiers en quantité parfois élevée allant de 11,2% dans le sol de Zahana, à 26% dans le sol d'Ain Témouchent. La teneur en argile augmente sensiblement au niveau des quatre sols pour atteindre un maximum de 40 % dans le sol de Tessala.

Les sols qui contiennent une grande quantité d'argile ou d'humus peuvent bénéficier d'un effet tampon contre le changement de pH à cause de leur capacité d'échange cationique (CEC). Cet effet tampon signifie que, lorsque le sol devient acide, la capacité tampon permet au pH de demeurer dans la marge de neutralité pour une plus longue période.

Les résultats obtenus indiquent que : les sols testés sont de pH alcalin variant entre 8,38 et 8,70, ayant une teneur importante en matière organique de 2,10 à 3,8 %, favorisant toute activité microbienne.

D'après les valeurs du tableau (5), le sol de Tessala, est le sol le plus calcaire avec une concentration de 42,10%, ce qui explique la dureté de cette terre et sa faible capacité à retenir l'eau (Aubert, 1978).

La teneur en azote total des sols de Ain Témouchent et l'ITGC est satisfaisante, elle oscille entre 1.42 et 1.37 ‰, contrairement aux sols de Tessala où la concentration de l'azote était un peu forte (1.93‰) et le sol de Zahana où la teneur la plus élevée a été signalée (5,12‰). Selon les normes, tous les sols testés présentent des concentrations très faibles en phosphore. Ces résultats sont conformes avec ceux d'Orphanos, qui a rapporté en 1995, que la plupart des sols en région méditerranéenne sont déficitaires en P.

Selon les normes (**Annexe 2**) et les valeurs du rapport C/N des sols étudiés mentionnées dans le tableau n° 5, nous constatons que les sols de Tessala, Zahana et Ain Témouchent présentent un rapport C/N faible (< 8) et cela signifie que la matière organique est orientée

Résultats et discussion

vers une forte minéralisation due probablement à une bonne activité biologique. Par contre, le sol de l'ITGC présente un rapport C/N élevé (> 12) indiquant une matière organique mal décomposée.

La conductivité électrique comprise entre 0,08 et 0,18 mS, indique des sols non salés.

Résultats et discussion

Tableau n°4 : Les résultats des analyses physico-chimiques des quatre échantillons de sol prélevés de différentes localités de l'ouest Algérien

Réalisé à l'INRAA de Sidi Bel Abbès et TECHANAL de Tlemcen

Localisation	N (‰)	P ppm	pH	CE (ms)	C (%)	MO (%)	Calcaire Total (%)	Calcaire Actif (%)	Granulométrie (%)				Rapport C/N	Texture du sol Diagramme de GEPPA
									Argile	Sable	Limon fin	Limon grossier		
Sol Tessala	1.93	34.3	8.38	0.18	1.3	2.6	42.10	5.37	40	35	10	25	6.73	Argile limoneuse
Sol Zahana	5.12	36- 36.5	8.68	0.08	1.9	3.8	4.76	/	25.5	42.6	18.5	11.2	3,71	Limono-argileux
Sol ITGC	1.37	26.7	8.64	0.11	1.87	3.74	26.92	7.12	24.18	44.52	9.55	21.75	13.64	Limono-argileux
Sol Ain Témouchent	1.42	3.1- 3.15	8.70	0.15	1.05	2.10	6.42	2.37	27.18	33.27	12.93	26.62	7.39	Limono-argileux

N : Azote total

C : Carbone

P : Phosphore assimilable

MO : Matière Organique

CE : Conductivité électrique

Résultats et discussion

2. Confirmation de la stérilité des sols :

Après plusieurs jours d'incubation, aucune trace de croissance bactérienne n'a été signalée dans les boîtes ensemencées à partir de la suspension de sols stériles comme le montre la **Figure (11)**.

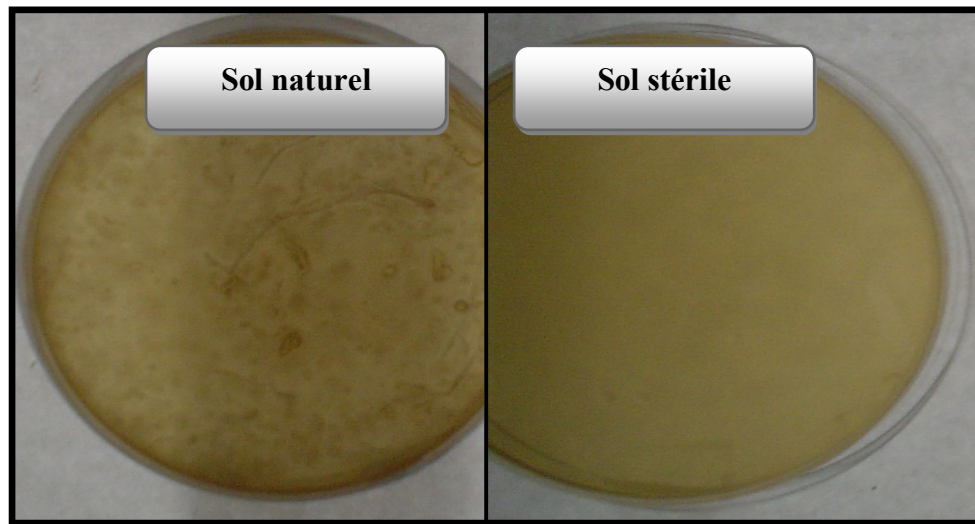


Figure n°11 : confirmation de la stérilité des sols testés.

Un autre moyen a pu nous rassurer sur la stérilité totale des sols, est l'absence de nodules dans les racines de toutes les plantes cultivées sur ces sols.

3. Caractéristiques symbiotiques :

Cette caractérisation a été effectuée afin d'évaluer la diversité des souches de *Rhizobium* autochtones, par leur potentiel infectieux et fixateur et afin de repérer les souches les plus efficaces.

La capacité symbiotique d'une souche de *Rhizobium* est évaluée par deux paramètres : son infectivité et son efficacité.

L'infectivité de chaque souche est appréciée par le nombre de nodosités formées sur la racine de chaque plante. (ou le poids des nodules). L'efficacité est estimée par la détermination du pourcentage de gain en matière sèche de la partie aérienne des plantes inoculées par rapport au témoin azoté.

Résultats et discussion

Les plantes ont été déterrées au même stade végétatif afin que les performances symbiotiques puissent être comparables.

Les résultats obtenus indiquent une plasticité de nodulation chez *Cicer arietinum*. Il a pu être nodulé par les souches de *Rhizobium* autochtones des différents sols étudiés.

La localisation des nodosités sur le système racinaire de la plante a montré également une grande variabilité. Les nodules, qui sont du type indéterminé (Lee et Copeland, 1994), sont répartis essentiellement sur le pivot au détriment des racines latérales et sur 30 cm de profondeur. Cette situation explique leur exposition aux variations du milieu, en particulier au déficit hydrique qui réduit leur taille, leur nombre et l'intensité de leur couleur (réduction de la concentration en leghémoglobine) (**Figure 12**).

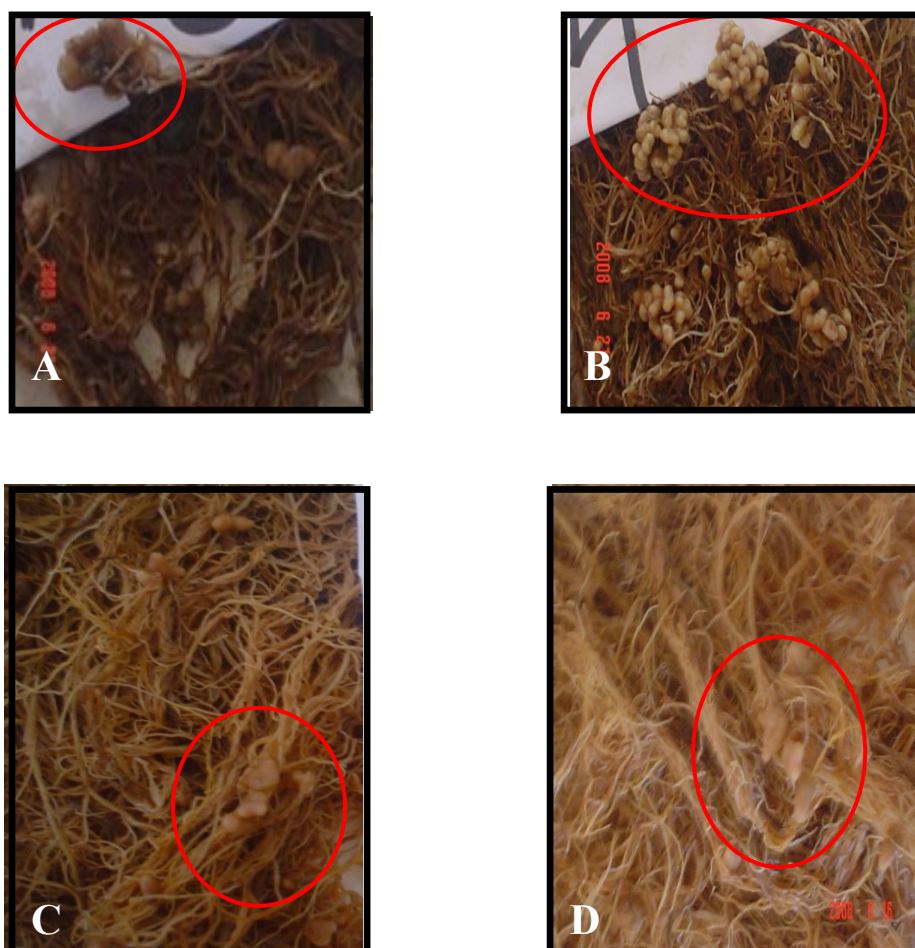


Figure n°12 : Forme des nodosités obtenues sur les racines de *Cicer arietinum*.L. Cultivé sur les sols de Tessala (A), ITGC (B), Zahana (C), Ain Témouchent (D).

Résultats et discussion

L'efficacité symbiotique de la population locale de *Rhizobium*, est l'un des paramètres importants pour choisir des souches pour la production d'inoculum. C'est également un facteur important pour la détermination de l'incidence et l'importance de la réponse de la légumineuse à l'inoculation (Singleton et Tavares 1986 ; Thies *et al.*, 1991).

Bien qu'on ne connaisse rien sur les potentialités métaboliques des souches autochtones des quatre sols testés, il semble qu'elles ont induit une nodulation assez comparable.

Les souches autochtones ont montré une large diversité dans leur capacité d'infecter la plante hôte et à fixer l'azote atmosphérique. Le poids moyen de nodule par plante varie entre 0,1g pour l'isolat ***Rch 73*** à 3,9 g pour l'isolat ***Rch 72***, étant l'isolat le plus performant (**Figure 13**).

Le nombre de nodules varie de 10 à 38/plant avec 60-500 mg de poids sec/plant, leur longueur est de 3-4 mm. Elles deviennent rouges après deux semaines grâce à la production de la leghémoglobine. Quelques bactéries non spécifiques comme : *Sinorhizobium medicas*, *Agrobacterium sp* et *Ochrobacterium sp*, ont été isolées à partir des nodosités de pois chiche, cependant, *S.medicas* était inefficace (Aouni *et al.*, 2001).

Les nodosités du pois chiche portent aussi des bactéries non symbiotiques. Une souche d'*Agrobacterium* a été isolée et qui a la capacité de solubiliser le phosphate *in vitro* (Hameed *et al.*, 2005). Le rôle de ces bactéries reste à élucider, mais elles peuvent intervenir dans le processus de la nodulation (Hameed *et al.*, 2004).

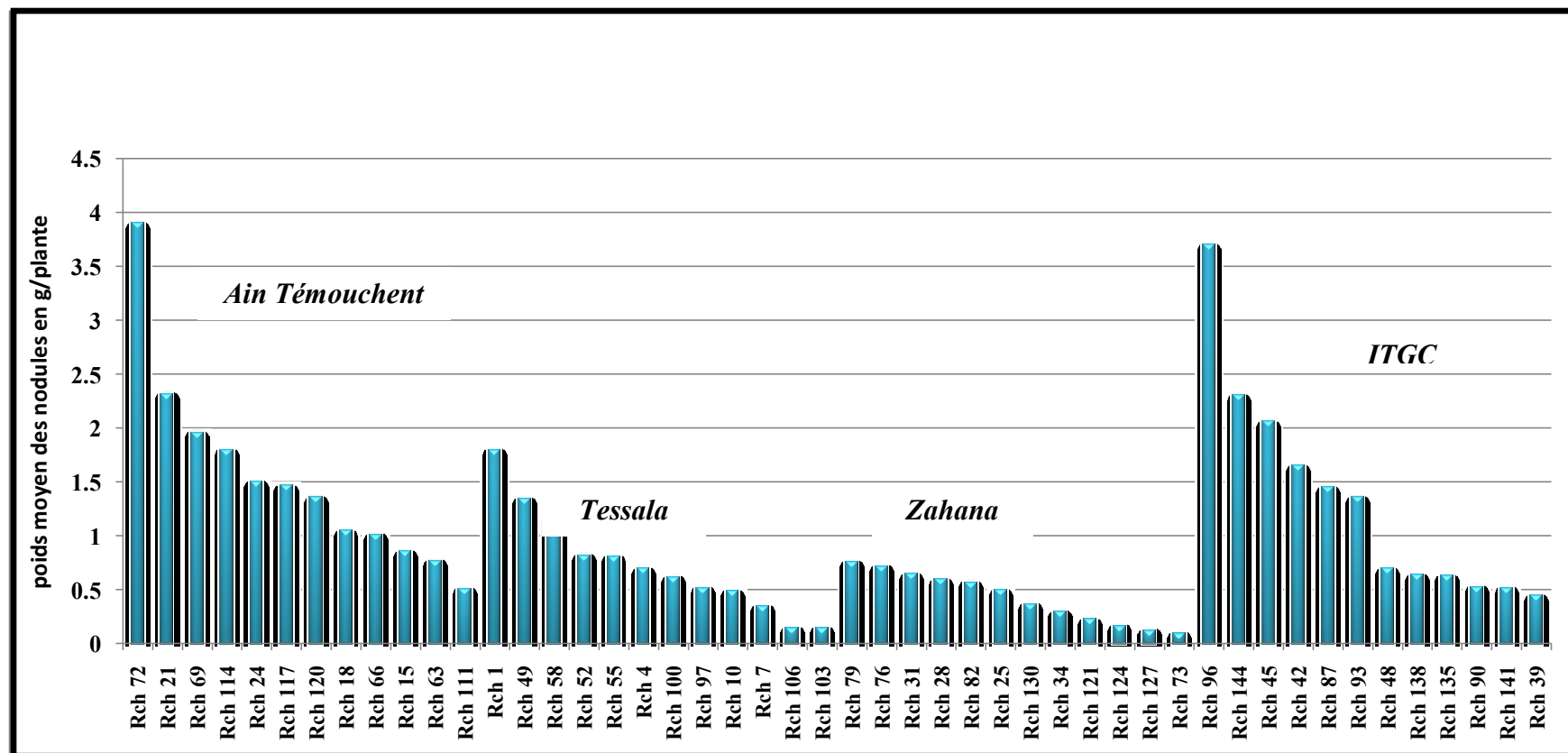


Figure n°13 : Infectivité des souches autochtones de *Rhizobium* nodulant le pois chiche évaluée sur les quatre sols étudiés exprimée par le poids moyen des nodosités formés.

Résultats et discussion

On peut en conclure que les populations de *Rhizobiums* autochtones sont très importantes et dynamiques. Leur pouvoir d'infectivité, exprimé par la biomasse nodulaire, est différents et assez important.

Ces résultats semblent en accord avec ceux de Boughalem (1989) et Abadli (1991) qui rapportent que le pois chiche cultivé sans inoculation nodule facilement. Ils sont ainsi comparables à ceux trouvées par Tillard et Drevon (1988) dans les sols du Sud de la France et montre la grande variabilité de l'infectivité des populations natives.

4. Effet de la variété, la stérilisation et la fertilisation sur le développement des plantes :

Afin de mettre en évidence d'éventuelles différences entre les traitements, les sols et les variétés, après 45 jours de culture en pots sous serre, une analyse de la variance a été utilisée. Les moyennes sont comparées selon la méthode de la plus petite différence significative à la probabilité ≤ 0.05 . Les résultats ont été exploités et organisés par facteur

Résultats et discussion

Facteur 1 : Effets de la variété

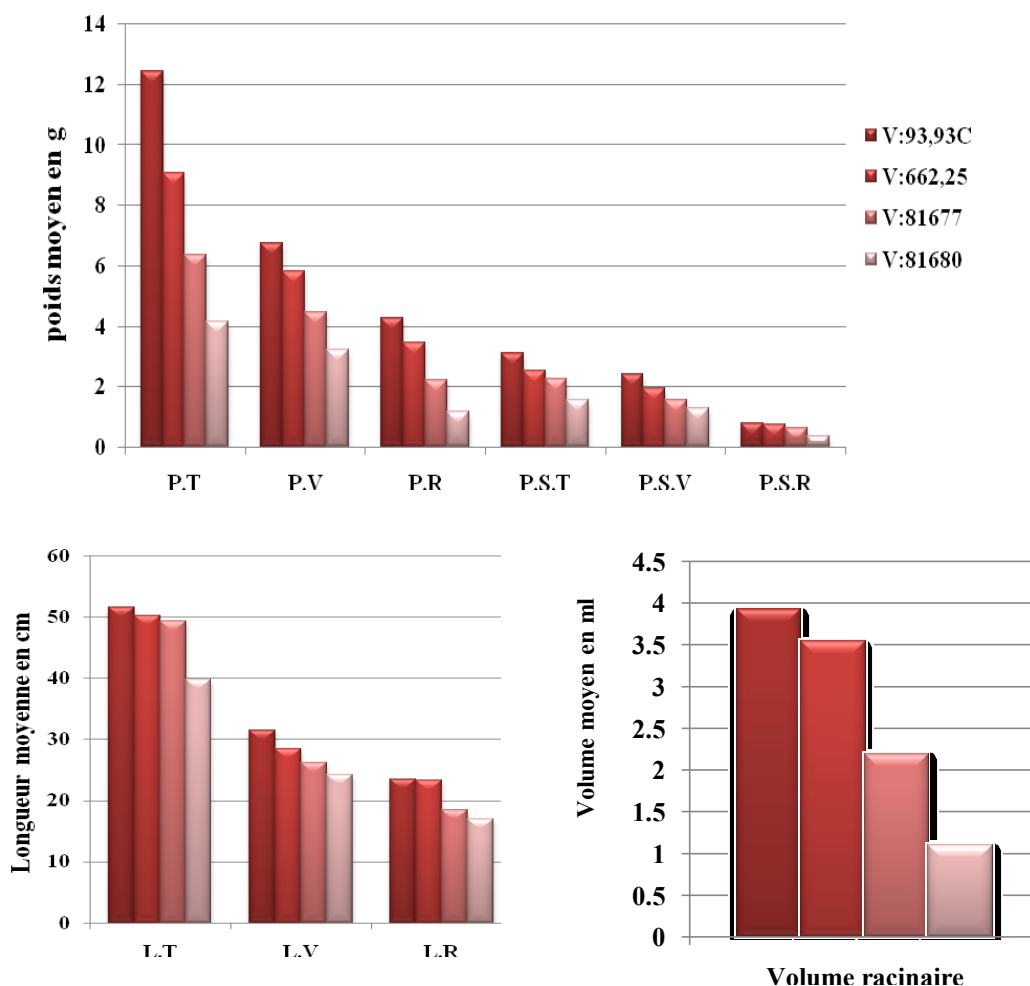


Figure n°14 : L'effet de la variété sur la croissance végétale.

La différence de croissance entre les quatre variétés est bien montrée dans la Figure (14). L'analyse de la variance des poids frais (Poids Total, Poids Aérien, Poids Racinaire), des poids de la matière sèche (Poids Sec Total, Aérien et Racinaire), des tailles (Taille Totale Aérienne et Racinaire) et des Volumes Racinaires, montre une différence significative entre les quatre variétés testées ($p < 0.05$).

Les résultats obtenus ont montré des différences significatives entre les potentiels de production des variétés testées.

Si l'on compare les résultats des productions aériennes et racinaires au stade floraison, (**Annexe 12**), On constate que la variété **93.93C** s'est montrée plus performante que les autres variétés.

Résultats et discussion

Le maximum des poids frais a été marqué chez la variété **93.93C** avec des moyennes de 4,5, 7 et 12,5 g respectivement. Par conséquent, cette variété a donné les poids secs les plus élevés qui varient entre 1 et 3g.

Le même comportement a été observé concernant les tailles des plants. C'est toujours la variété **93.93C** qui donne les valeurs les plus importants. Le volume racinaire est un autre paramètre mesuré, dont les résultats obtenus confirment la supériorité de la variété **93.93C**.

En ce qui concerne les autres variétés, la variété **662.25** a montré une bonne croissance suivie de la variété **81677**. Cependant, la variété **81680** a donné les plus faibles rendements.

Facteur 2 : Effets du Traitement

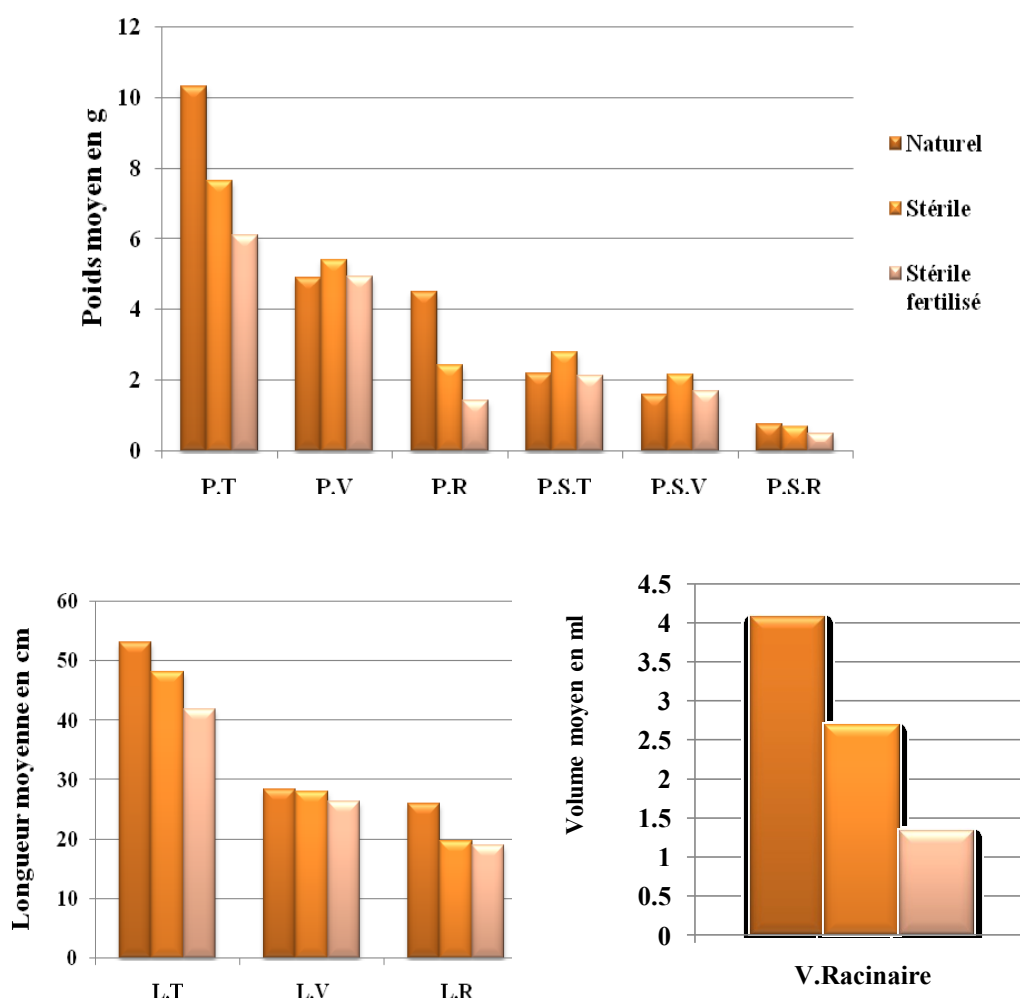


Figure n°15 :L'effet du traitement sur la croissance végétale.

L'efficacité des populations natives de *Rhizobium* a été estimée en comparant les plantes cultivées sur un sol stérile et celles cultivées sur un sol naturel. D'après les résultats de

Résultats et discussion

l'analyse statistique (**Annexe 13**), une différence significative a été révélée entre les traitements appliqués (**Figure 16**). Ainsi, le gain de rendement obtenu sur le sol Naturel diffère statistiquement du rendement du témoin positif (sol stérile fertilisé) et de celui du témoin négatif (sol stérile non fertilisé).

On a remarqué une certaine hétérogénéité des résultats :

La culture des plantes sur un sol naturel a eu un effet positif sur un grand nombre de paramètres étudiés y compris, Poids frais Total, Poids frais Racinaire, Poids Sec Racinaire, Longueur Totale, Longueur Racinaire, Volume Racinaire.

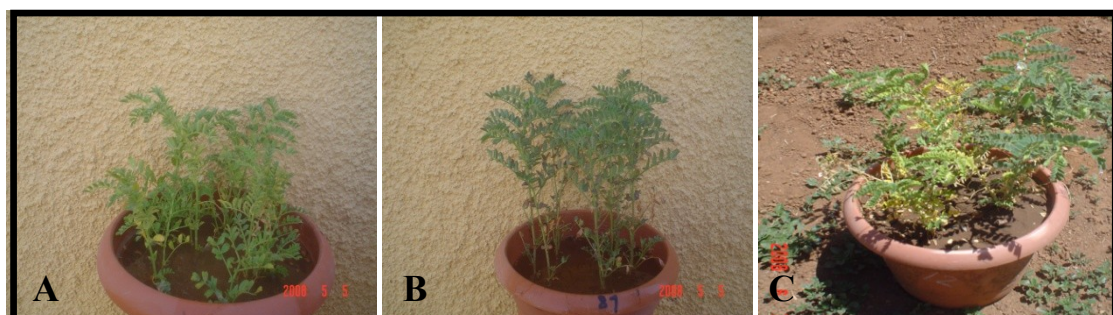


Figure n°16 : Effet de la stérilisation et la fertilisation sur le développement végétal.

- A. Témoin positif (Sol Stérile + urée).**
- B. Croissance en sol Naturel (+*Rch 31*).**
- C. Témoin négatif (Sol Stérile).**

L'effet positif des *Rhizobium* a été rapporté par plusieurs auteurs (Lal et Khanna, 1993 ; Ndoye *et al.*, 1995). Les souches locales de *Rhizobium*, une fois associées à la plante hôte, ont montré une infectivité et une efficacité importante, ce qui a permis l'amélioration de la nutrition azotée des plantes de pois chiche et par conséquent l'amélioration de leur croissance.

A noter qu'au niveau des : Poids frais Végétal, Poids Sec Végétal, Poids Sec Total : c'est le traitement stérile qui semble donner les moyennes les plus élevées.

Comme il a été signalé dans le chapitre précédent, la stérilisation du sol a été faite par chaleur humide. Sous l'effet de la température élevée de stérilisation, la minéralisation de la matière organique du sol est accélérée, (y compris l'azote combiné) conduisant aussi à la décomposition des molécules organiques sous des formes simples et solubles (surtout les ions

Résultats et discussion

NH_4^+) qui servent de nutriments facilement assimilables par les microorganismes et les plantes.

Certains *Rhizobium* de pois chiche ont une large distribution, alors que d'autres espèces sont confinées à une zone géographique. *M. ciceri* est rencontrée dans la méditerranée, le nord de l'Afrique, nord de l'Amérique, l'Inde et la Russie (Nour *et al.*, 1995). Les sols sableux ou les sols hydromorphe, ne contiennent aucune population de *Rhizobium* de pois chiche (Aouni *et al.*, 2001).

Facteur 3 : Effets du sol

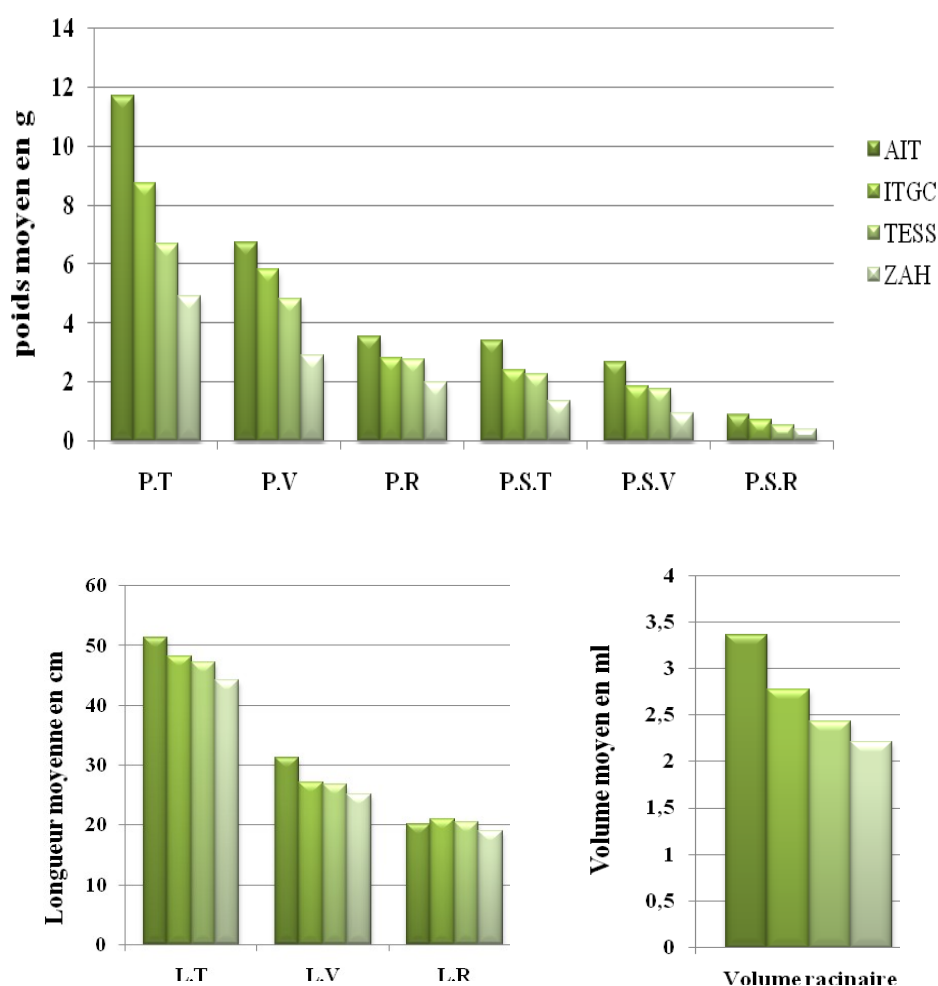


Figure n°17 : L'effet du sol sur la croissance végétale.

Résultats et discussion

Le sol est le substrat de la culture des plantes, la variabilité des sols testés est représentée sur la Figure (17). L'analyse de la variance montre que globalement l'effet sol est significatif ($p < 0.05$).

Les variétés étudiées sont bien adaptées sur le sol de Ain Témouchent et montrent une bonne croissance. Cette adaptation est moins exprimée sur le sol de l'ITGC et le sol de Tessala. On note que les rendements les plus faibles ont été obtenus sur le sol de Zahana. Sachant qu'Ain Témouchent, décrite comme zone de référence de culture des légumineuses alimentaires, ainsi que la station d'ITGC, sont des régions où le pois chiche est habituellement cultivé. D'après Aouni *et al.* (2001) et Laranjo *et al.* (2002), ces sols se caractérisent par la présence des *Mesorhizobium* spécifiques du pois chiche.

Dans l'aperçu global, la croissance des plantes n'est pas corrélée uniquement avec la présence ou l'absence de nodule par plante. Ceci suggère que la fixation de l'azote n'a pas été le seul facteur limitant de la croissance du pois chiche cultivé.

Ce sont les sols d'Ain Témouchent et l'ITGC qui sont les plus favorables à la nodulation. En revanche, sur le sol de Tessala et Zahana, la nodulation des plantes semble être inhibée puisque l'on observe une réduction du poids des nodules par rapport aux deux premiers sols. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer la mauvaise croissance des plantes dans ces sols :

1. Soit, il s'agit d'un problème lié aux sols plus riches en argile et en limon, donc plus compact que les autres sols : en effet, dans un sol compact, la diffusion de l'oxygène est limitée, ce qui porte préjudice à la nodulation, sachant que le sol de Tessala est très riche en argile **40%** et en limon **35%** ainsi que le sol de Zahana dont les fractions d'argile et de limon sont **25.5%** et **29.7%** respectivement.

2. Soit, les teneurs élevées en azote dans les sols de Tessala (**1,93g/kg**) et Zahana (**5,12g/kg**) par rapport aux sols d'Ain Témouchent (**1,42 g/kg**) et l'ITGC (**1,37 g/kg**) dont la teneur en azote est satisfaisante, sont responsables d'une inhibition partielle de la nodulation du pois chiche par les souches natives de *Rhizobium*.

- L'effet des nitrates du sol se manifeste d'abord par une stimulation de la nodulation à une concentration satisfaisante, suivi par une réduction, puis, une forte inhibition de la nodulation à des concentrations importantes.

Résultats et discussion

- En effet, les légumineuses, y compris le pois chiche, ne fixent l'azote qu'après la formation des nodosités ; le fonctionnement optimum de la nitrogénase correspond en général au stade début floraison. Entre temps, la légumineuse puise la majorité de ses besoins en azote sous forme combinée du sol (Dommergues et Mangenot, 1970). Cet azote contribue directement à la croissance et au bon développement de la plante, et indirectement, à la mise en place du système fixateur (racines+ nodosités). En 1984, Jessop *et al* ont pu montrer que des concentrations entre 1.5 et 3 meq stimulent la nodulation chez le pois chiche. De même, Rawsthorne *et al.* (1985) confirment cette tendance sur la même espèce mais avec une concentration légèrement supérieure (3.5 mM).

3. La limitation de nodules peut être due aussi au déficit du phosphore. Des recherches ont montré que l'azote réduit la nodulation tandis que le phosphore l'augmente (Jebara *et al.*, 2005).

- Le Phosphore est indispensable pour les plantes surtout au stade jeune. Il intervient dans la plus part des réactions fondamentales de la cellule. Les molécules $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} sont les formes assimilables même si on estime le phosphore sous forme de P_2O_5 . Les quantités du phosphore peuvent être insuffisantes soit parce que le sol en est naturellement mal pourvu, soit parce que ses réserves ont été progressivement épuisées par des cultures successives.

- En réponse au manque de P, les plantes développent plus leur enracinement, augmentent le taux de prélèvement via le sol, mobilisent plus de P à partir des feuilles âgées, et mobilisent celui stocké dans les vacuoles (Schachtman *et al.*, 1998). En plus, les mycorhizes peuvent coloniser davantage les racines.

Résultats et discussion

Les interactions :

1. Interaction « Variété –Traitement » :

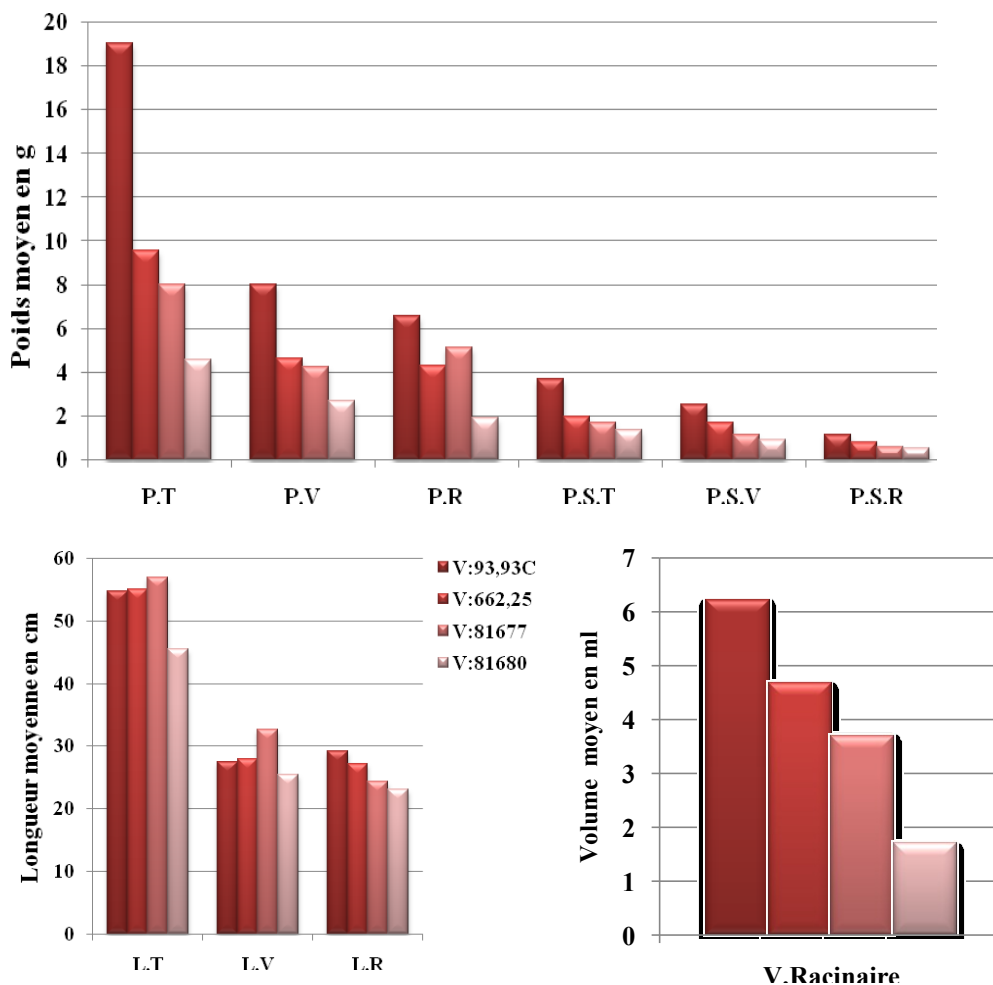


Figure n°18 : l'effet de l'interaction « Variété –traitement Naturel »
Sur la croissance végétale.

La supériorité de la variété **93.93C** tend à se confirmer au niveau de tous les traitements. La variété **93.93C**, cultivée sur sol naturel, en présence des populations natives de *Rhizobium*, a produit les plus grandes quantités : poids frais (en moyenne **19 g**) et sec (en moyenne **3,9g**), volume racinaire (**6,5 ml**) ainsi qu'une longueur racinaire atteignant **29cm** de moyenne.

Résultats et discussion

Concernant la variété **662.25**, elle est toujours classée en deuxième position au niveau de tous les paramètres mesurés, sauf le cas du poids racinaire où elle a donné une moyenne plus faible de **4,1g**.

Quand aux longueurs totales et longueurs des parties aériennes des plantes, **57 cm** et **34 cm** ont été respectivement signalées chez la variété **81677**. Les rendements les plus faibles ont été observés chez la variété **81680**.

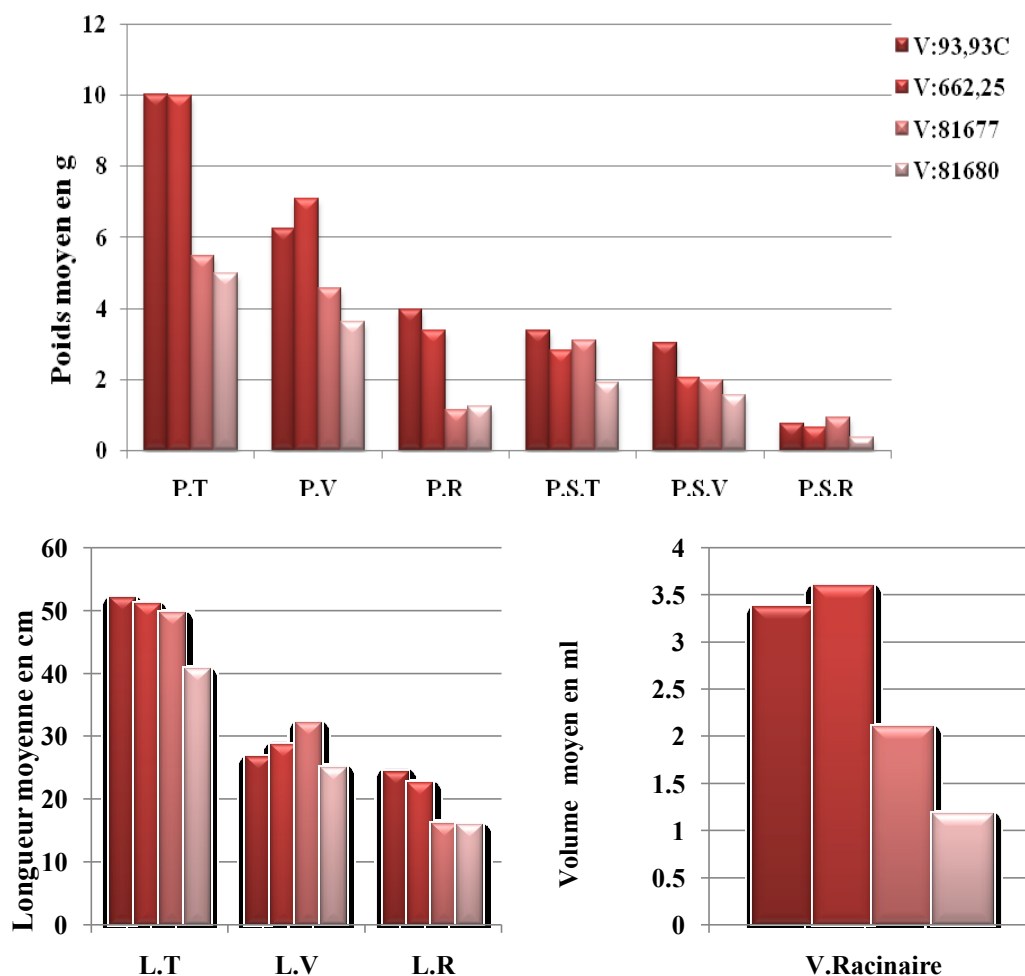


Figure n°19 : l'effet de l'interaction « Variété –traitement stérile »
Sur la croissance végétale.

L'interaction des quatre variétés sur le sol stérile semble être moins productive en comparaison avec leur rendement sur le sol naturel. Il paraît que la stérilisation a un effet négatif sur le développement des plantes

Résultats et discussion

Un maximum de poids frais égal à **10g**, a été donné par les deux variétés **93.93C** et **662.25**. A nouveau, la variété **93.93C** a produit les Poids frais Racinaire, Poids Sec Total, Poids Sec Végétal, Longueur Totale et Longueur Racinaire les plus élevés. Un Poids frais Végétal ainsi qu'un Volume Racinaire maximal de **7g** et **3,6 ml** ont été signalé chez la variété **662.25**. La meilleure Longueur Végétale a été donnée par la variété **81677** ; à l'opposé de la variété **81680** a montré la plus mauvaise interaction sur le sol stérile.

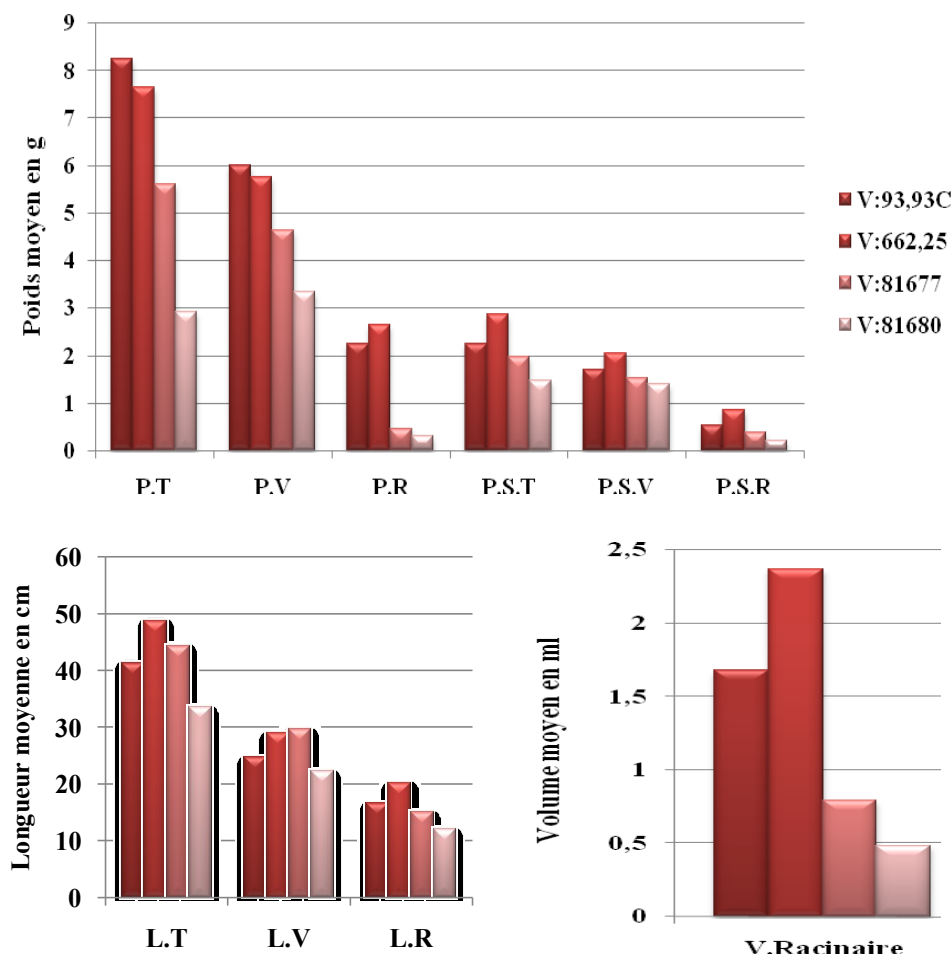


Figure n°20 : Effet de l'interaction « Variété –traitement stérile fertilisé »
Sur la croissance végétale

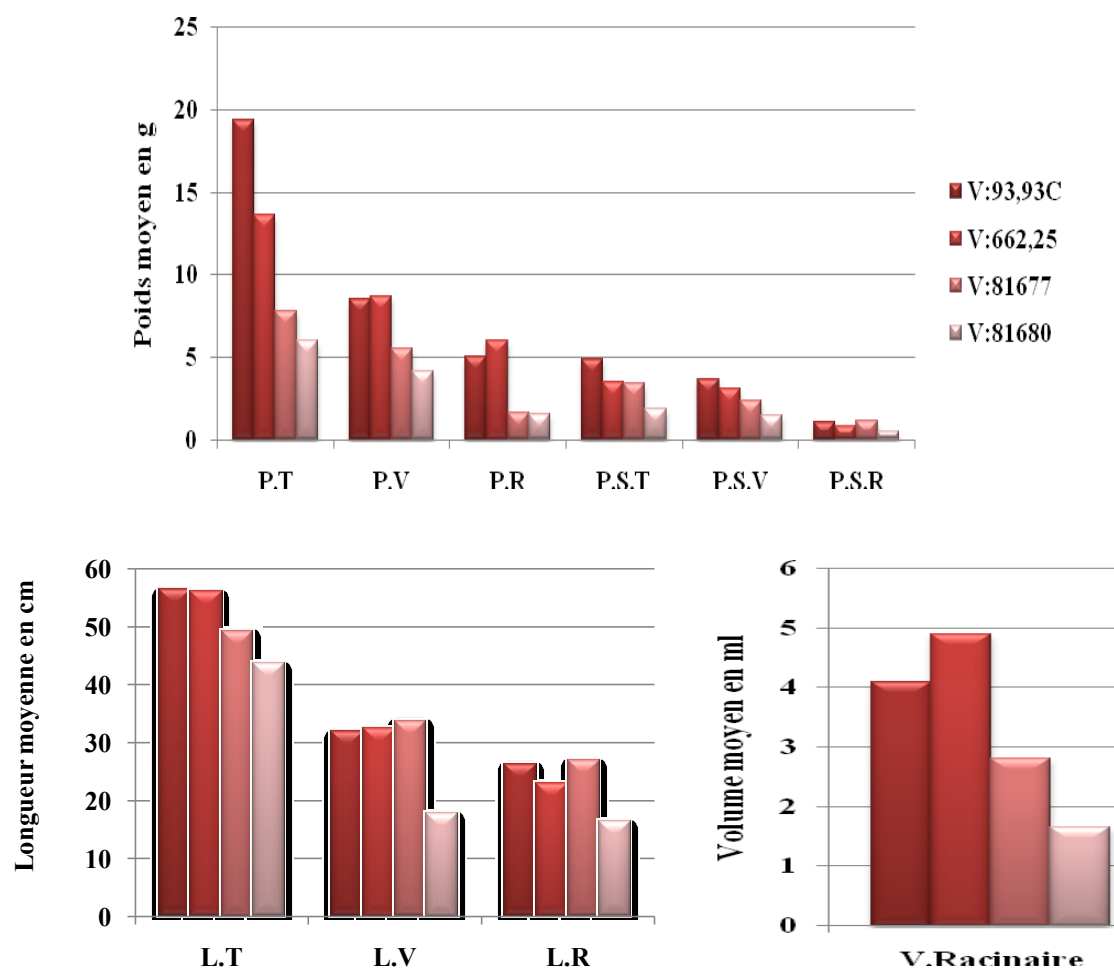
Il s'avère que la fertilisation a un effet inverse sur la production de la matière verte, chez le pois chiche. L'analyse statistique a révélé une diminution significative qui a touché les différents paramètres mesurés.

Résultats et discussion

Contrairement aux deux premiers traitements, les meilleures productions en Poids frais Racinaire, Poids Sec Total, Poids Sec Végétal, Poids Sec Racinaire, Volume Racinaire, Longueur Totale et Longueur Racinaire étaient fournies par la variété **662.25**.

Quand au Poids frais Végétal, c'est la variété **93.93C** qui a donné le poids le plus élevé. La variété **81677** a donné la meilleure Longueur Végétale. Concernant la variété **81680**, elle n'a montré aucune amélioration, elle est caractérisée par les plus faibles rendements.

2. Interaction « Variété – Sol » :



Une augmentation prononcée des rendements a été remarquée chez les plantes cultivées sur le sol de **Ain Témouchent**.

Résultats et discussion

Les quatre variétés ont montré une adaptation élevée et hétérogène au sol de **Ain Témouchent**. La variété **93.93C** a donné le poids total le plus élevé atteignant **19g** de moyenne. Ainsi les meilleurs Longueur Totale, Poids Sec Total et Poids Sec Racinaire sont donnés par cette variété. La variété **662.25** a donné le Volume Racinaire le plus élevé.

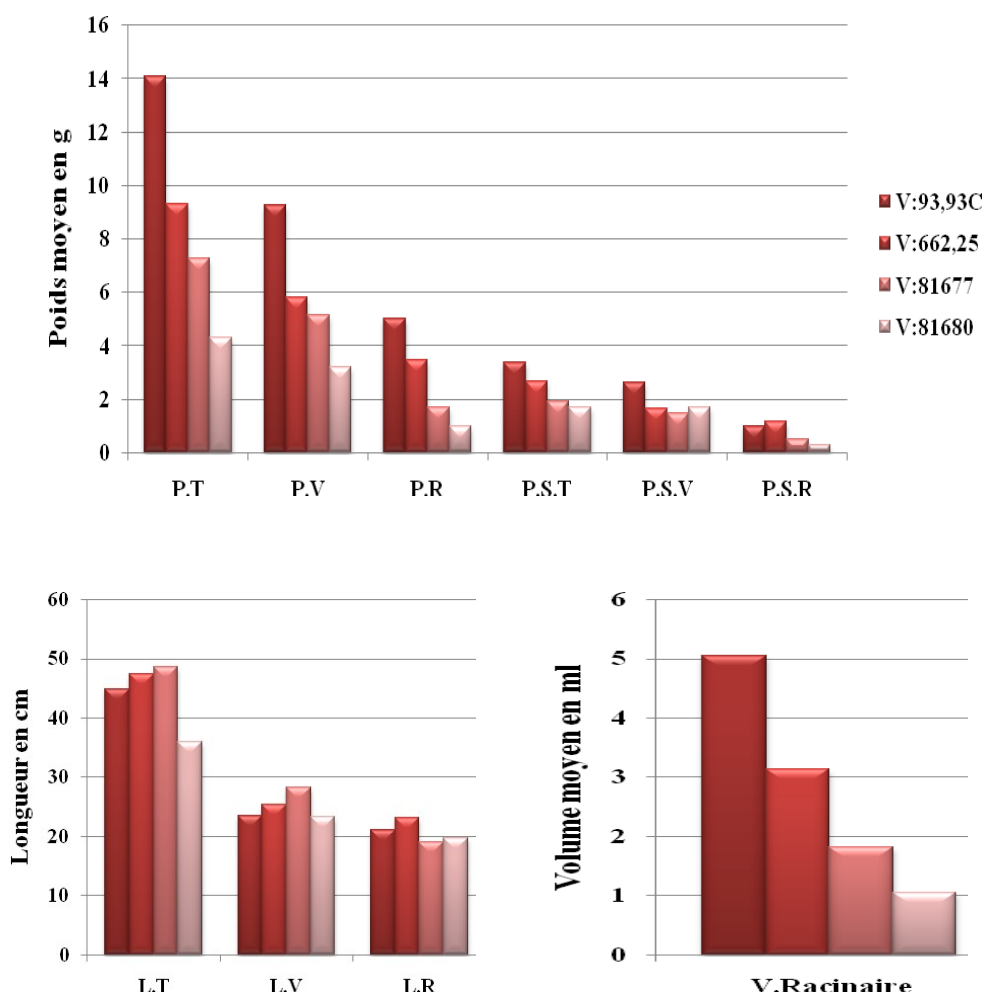


Figure n°22 : Effet de l'interaction « Variété - Sol de l'ITGC »
Sur la croissance végétale.

Quoique la production végétale fût un peu moins que celle constatée sur le sol de **Ain Témouchent**, les meilleures masses sont notés chez le couple variété **93.93C**, sol **ITGC**, avec on poids total de **14g**, et un volume racinaire de **5ml**.

Résultats et discussion

On a remarqué les plus importantes Longueur Totale chez les variétés **81677**, **662.25** et **93.93C**. La variété **81680** semble être la moins adapté au sol de l'ITGC.

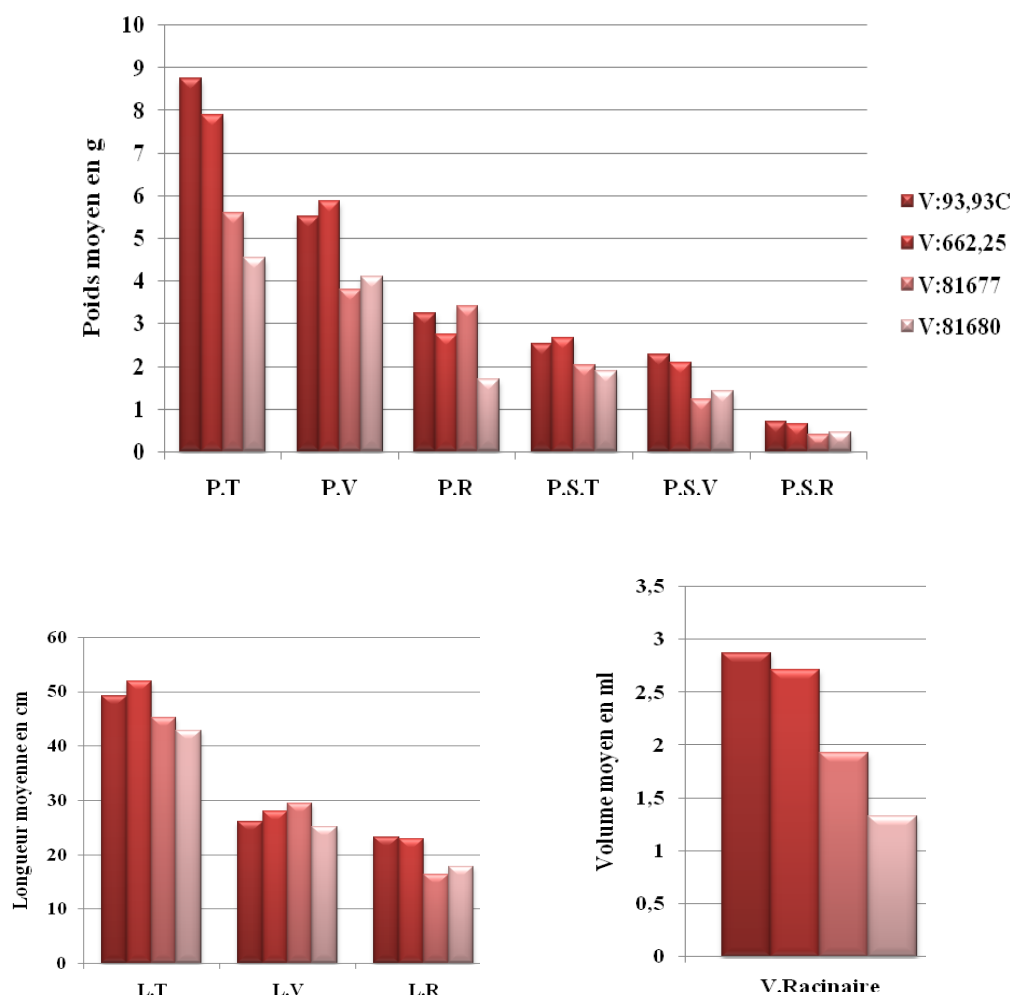


Figure n°23: Effet de l'interaction « Variété - Sol de Tessala »
Sur la croissance végétale.

L'adaptation des variétés au sol de **Tessala** est plus ou moins diminuée. Un poids frais de **8,9g** et un Volume Racinaire de **2,7ml** sont donnés par la variété **93.93C**.

Une Longueur Totale de **52cm** a été signalée chez la variété **662.25** suivi de la **93.93C**, la **81677** et en fin la **81680**.

Résultats et discussion

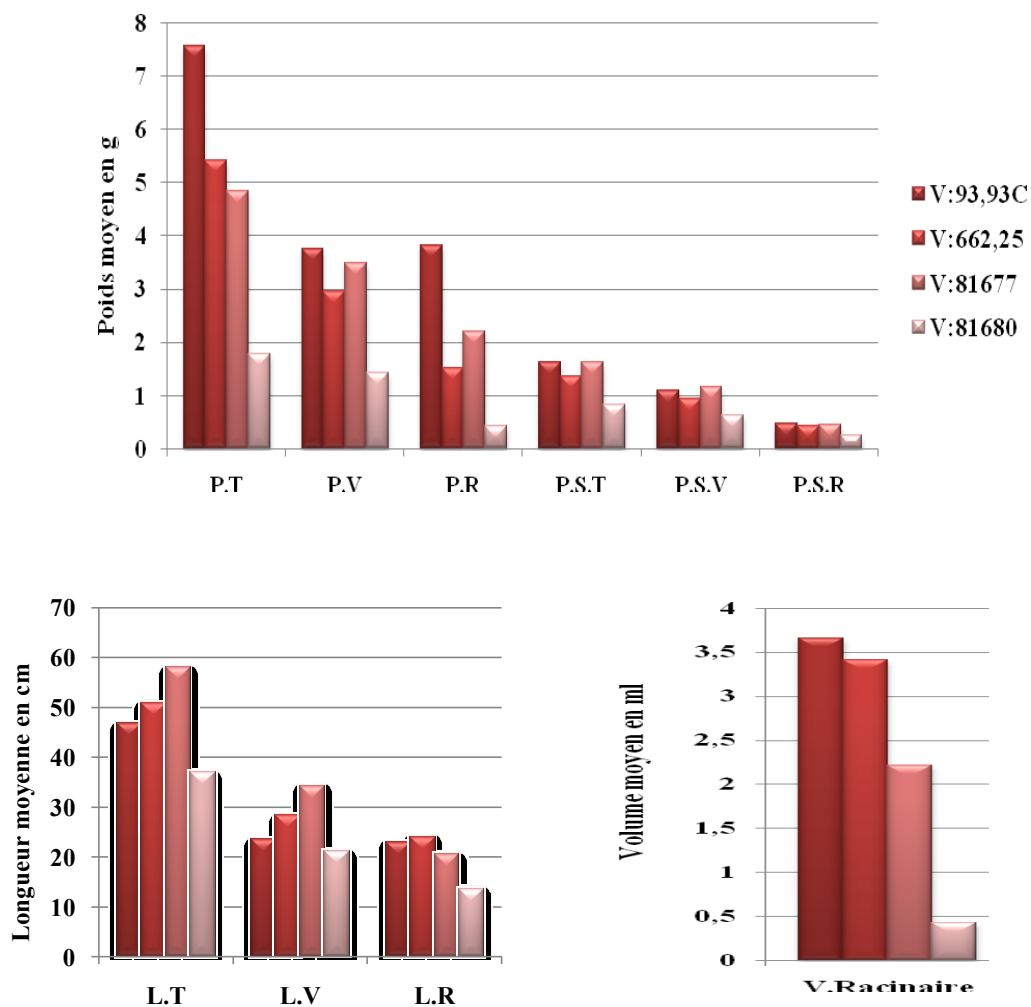


Figure n°24: Effet de l'interaction « Variété - Sol de Zahana »
Sur la croissance végétale.

Le sol de Zahana paraît le moins favorable pour la croissance des quatre variétés. Le poids frais maximal est de **7,5g**, donné par la variété **93.93C**, ainsi qu'un volume racinaire de **3,7g**. Les meilleures longueurs sont données par la variété **81677** suivi par la **662.25** et la **81680**. La variété **81680**, a donné la plus faible production.

3. Interaction « Sol – Traitement » :

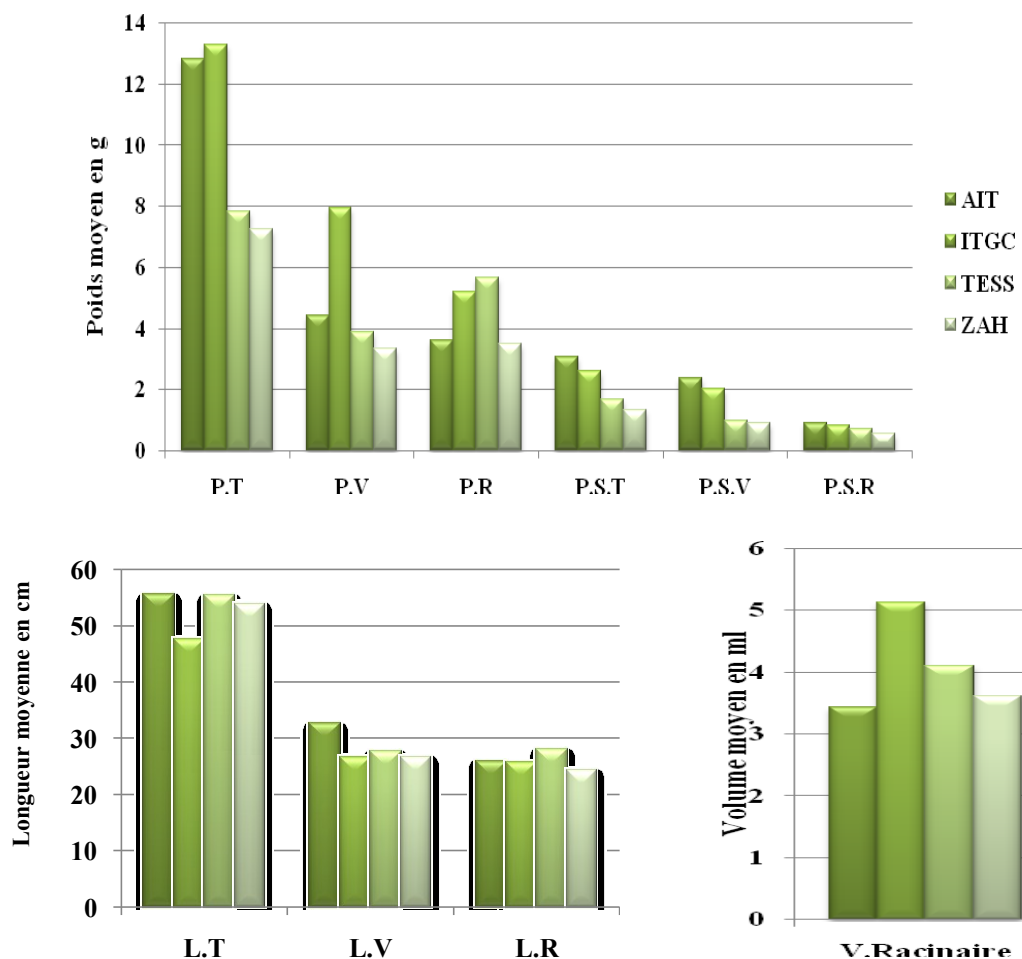


Figure n° 25: Effet de l'interaction « Sol – Traitement Naturel »
Sur la croissance végétale.

Les analyses statistiques montrent que le traitement naturel stimule significativement la production végétale.

Un poids total de **13,5 g** a été noté chez le sol naturel de **Ain Témouchent**, suivi du sol naturel de l'**ITGC** où on a marqué une moyenne de poids frais de **12,5 g**.

Quand au poids racinaire, c'est le sol naturel de **Tessala** qui a donné le meilleur rendement **5,7 g**.

Concernant la Longueur Totale des plantes, une moyenne de **55 cm** a été notée aussi bien sur le sol naturel de **Ain Témouchent** que le sol de l'**ITGC**. Une amélioration remarquable

Résultats et discussion

du rendement sur le sol naturel de Zahana a été constatée, avec une moyenne longueur de **53cm**.

La symbiose, est soumise à de nombreux facteurs : Telles les caractéristiques physico-chimiques du sol qui semblent influencer le plus nettement les processus de la fixation de l'azote (O'hara *et al.*, 1988 ; Peoples and Craswell, 1992).

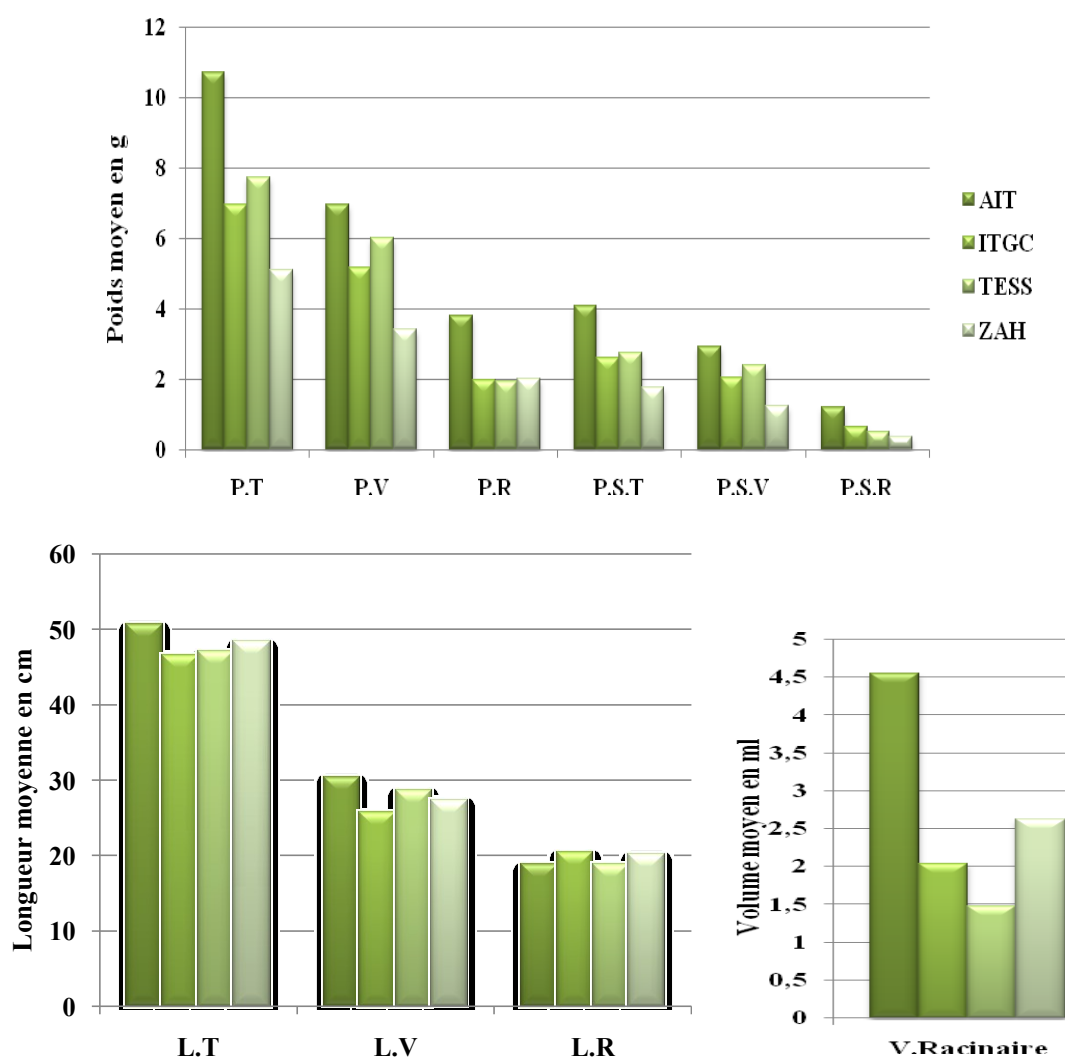


Figure n°26: Effet de l'interaction « Sol – Traitement Stérile »

Sur la croissance végétale.

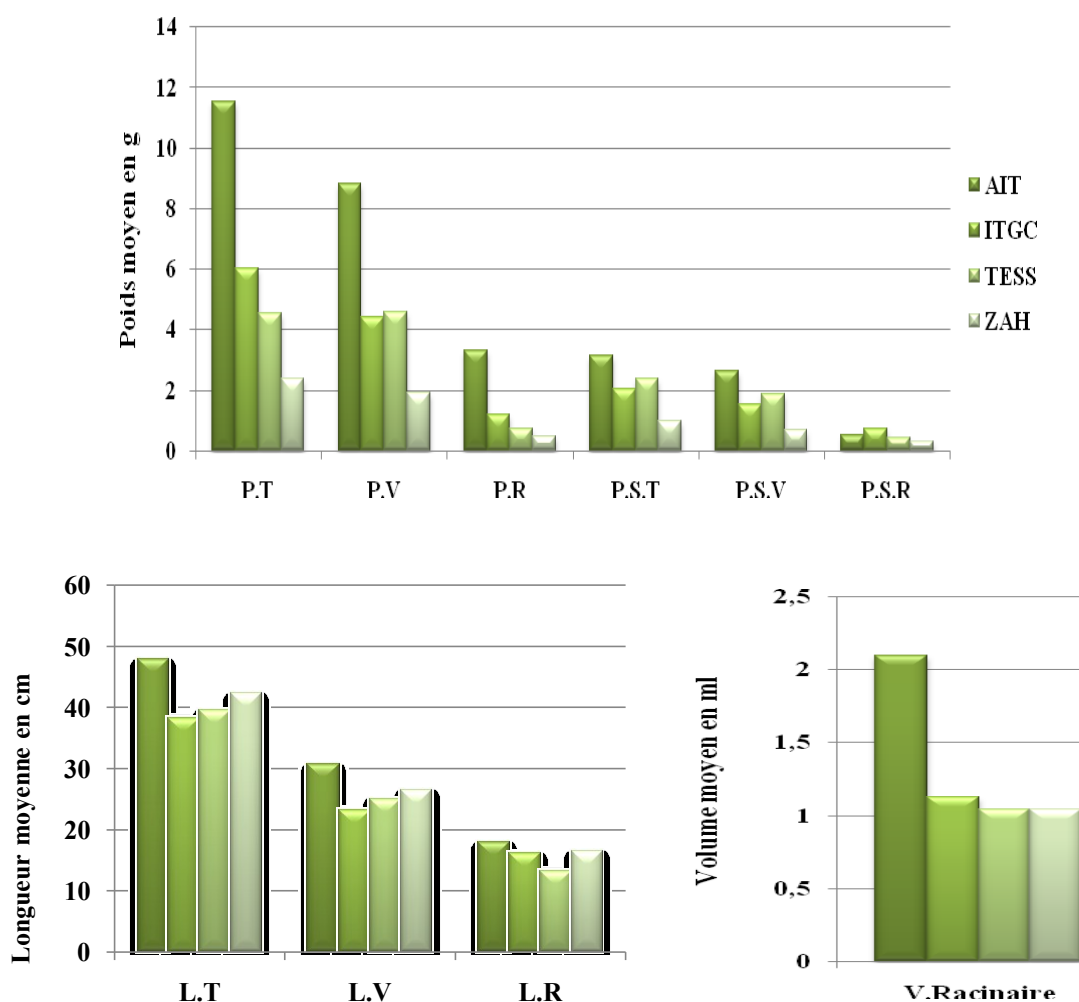
L'analyse de l'interaction sol- traitement stérile, confirme l'effet négatif de la stérilisation du sol (élimination des *Rhizobium*) sur la culture de pois chiche.

Le sol stérile de **Ain Témouchent** a dominé la production de matière fraîche totale, **10,8g**, végétale, **5g** et racinaires, **3,9g**, de matière sèche totale **4g**, aérienne, **3g** et racinaire **1,7g**.

Résultats et discussion

On constate aussi, le volume racinaire le plus élevé au niveau du sol stérile de **Ain Témouchent**. Suivi du sol stérile de l'**ITGC** ; le sol stérile de Tessala est classé cette fois ci, en deuxième position avec un **Poids frais Total** de **7,9g**, un **Poids Végétal** de **6g**, et une longueur végétale et racinaire de **29** et **19 cm** respectivement.

Quand au sol stérile de **Zahana**, il était favorable pour l'augmentation de la taille des plantes, où on a noté une **Longueur Totale** de **48 cm** en moyenne, une **Longueur Végétale** de **28 cm** ainsi qu'une **Longueur Racinaire** de **20cm**.



Résultats et discussion

L'application de fertilisants azotés (comme l'urée), en absence totale d'autres sources d'azote (sauf l'azote contenu dans le sol) a marqué une légère amélioration de la production végétale au niveau des différents sols testés.

Le couple le plus productif c'est le sol fertilisé de **Ain Témouchent**, avec un Poids frais maximal de **11,8g**, une moyenne de Poids Végétal égale à **9g**, Poids Racinaire de **3,8g** ainsi que des masses sèches totales, végétales et racinaires de **3, 2.5** et **0.5 g** respectivement.

En ce qui concerne les longueurs des plantes, des Longueur Totale, Végétale et Racinaire de **48, 30** et **29 cm** sont obtenues sur le sol fertilisé de **Ain Témouchent** qui a donné aussi le Volume Racinaire le plus élevé.

En deuxième position est classé :

Le sol fertilisé de l'**ITGC**, avec un Poids frais Total de **6g** et un Poids frais Racinaire de **1g**, une Longueur Racinaire de **15cm**, ainsi qu'un Volume Racinaire de **1.1ml** en moyenne.

Le sol fertilisé de **Tessala**, avec un Poids Végétal de **4.3g**, un PST de **2.2 g**, un PSV de **2g** en moyenne.

Le sol fertilisé de **Zahana**, avec une Longueur Totale de **43 cm**, Longueur Végétale de **26cm** et une Longueur Racinaire de **16cm** en moyenne.

Au stade de floraison, le témoin négatif (sol stérile) a produit une masse de matière sèche racinaire, statistiquement supérieure par rapport au traitement stérile fertilisé, ceci peut être expliqué par la réaction de la plante à combler le déficit en azote par le développement de son système racinaire à la recherche d'éventuelle source d'azote.

5. Vérification de la pureté des isolats :

5.1. Caractéristiques morphologiques et microscopiques des isolats:

Les 15 isolats purifiés, isolés des nodosités de *Cicer arietinum*, présentent 3 aspects macroscopiques :

L'isolat **Rch 72** : les colonies obtenues sont circulaires, beiges, translucides, à contour régulier de surface lisse et visqueuse.

Les isolats : **Rch 96, Rch 4, Rch 45, Rch 48, Rch 49** : sont de couleur blanche, bombées, translucides à contour régulier.

Les isolats : **Rch10, Rch18, Rch21, Rch28, Rch31, Rch34, Rch39, Rch25, Rch55** : sont bombées, blanchâtres, compactes à contour régulier et se caractérisent par une forte viscosité due à une production excessive d'exopolysaccharides (Zahran, 1994).

Résultats et discussion

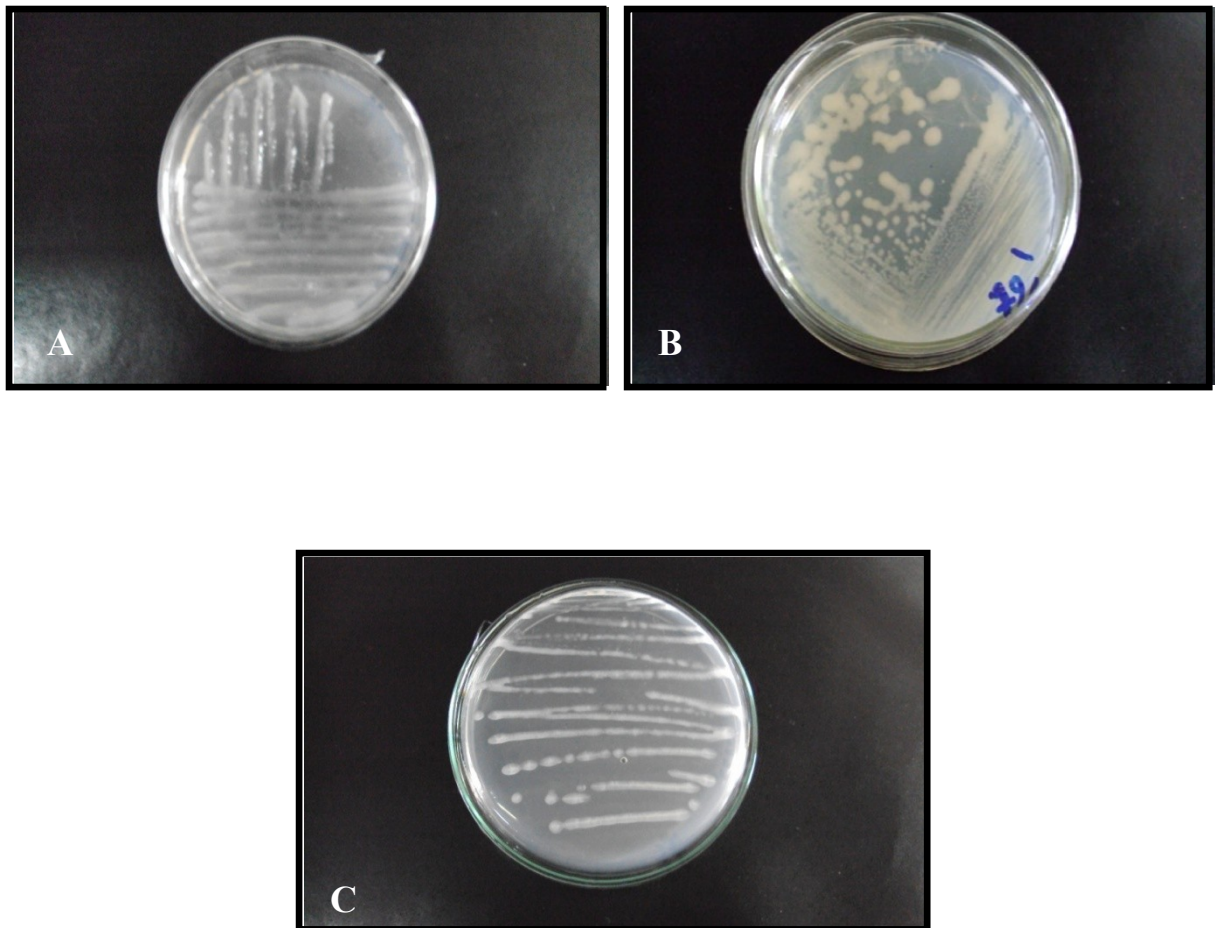


Figure n°28 : Aspect morphologique des isolats après 72h d'incubation à 28°C.

A : Aspect de l'isolat *Rch 18* B: Aspect de l'isolat *Rch 72*

C: Aspect de l'isolat *Rch 45*

Résultats et discussion

L'observation microscopique des isolats après coloration de Gram indique des formes de bacille à coccobacilles, Gram négatif de couleur rose.

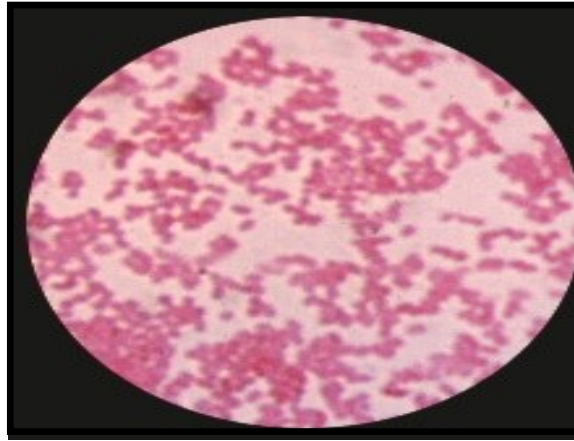


Figure n°29: Observation microscopique de l'isolat *Rch 72* après coloration de Gram.

5.2. Test de nodulation :

La formation de nodules sur les racines de la plante hôte après 48 jours d'incubation confirme l'appartenance des souches isolées au groupe des BNL (**Figure n°30**).

Résultats et discussion

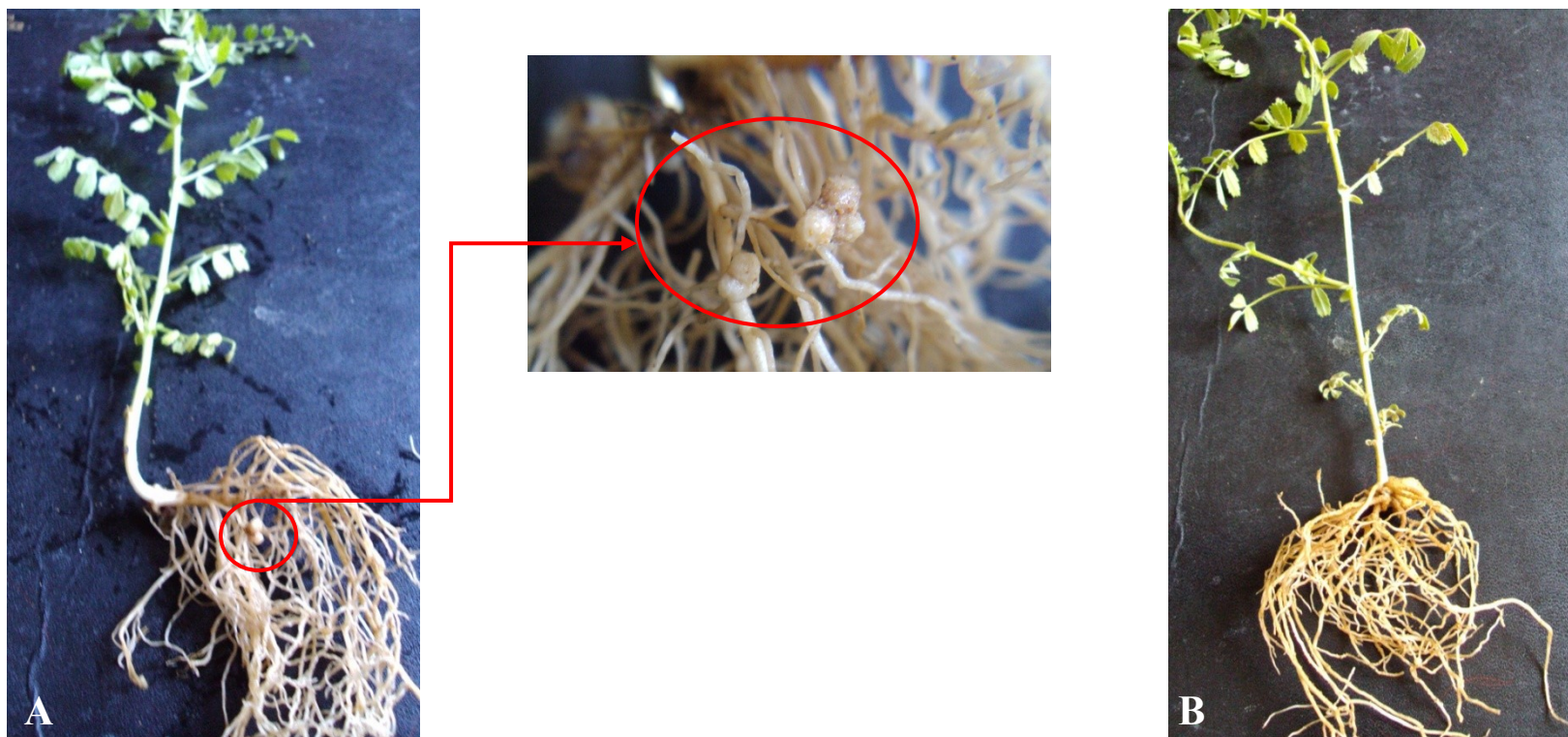


Figure n°30 : Aspect et couleur des nodosités formées sur les racines d'une plante de *Cicer arietinum* L. inoculée avec la souche ***Rch 39***, sur sable après 43 jours de croissance à une température ambiante.

A : Inoculée avec la souche ***Rch 39*** **B:** Témoin

Résultats et discussion

Certaines bactéries isolées à partir des nodosités racinaires du pois chiche sont incapables de renoduler leur plante hôte lors d'un test de nodulation (Mrabet *et al.*, 2004) ce qui est du :

- 1) Soit à un dysfonctionnement du dispositif,
- 2) Soit aux conditions défavorables à l'établissement de la symbiose,
- 3) Soit à la perte de la capacité à noduler au cours des repiquages successifs. Une de ces raisons peut justifier l'absence de nodules dans les plantes de pois chiche inoculées avec les souches : ***Rch 18, Rch 21, Rch 28, Rch 31, Rch 49, Rch 55.***

6. Effet des différents facteurs sur la croissance des souches :

Plusieurs étapes importantes dans les processus de la symbiose, comme la formation des nodules et la fixation d'azote, proprement dite, sont affectés par différents stress, pouvant être des facteurs limitant (Zahran *et al.*, 1999).

6.1 Effet de la température :

Comme c'est prévu pour les *Rhizobium*, les isolats se sont bien développés à **28°C** (Somasegaran *et al.*, 1994).

Les isolats testés ont montré une bonne croissance à **30, 35** jusqu'à **40°C**. Nos résultats sont en accord avec ceux de Nour *et al* (1994 ; 1995), qui ont décrit une température maximale de croissance de **40°C** pour les *Rhizobium* isolés du pois chiche, aussi bien pour *M.ciceri* que *M.mediterraneum*. A noter que les isolats ***Rch 55, Rch72, Rch96*** ont montré une faible croissance à **45°C**.

Aucune croissance n'a été signalée à la température **4°C**, puisque c'est la température de conservation.

Résultats et discussion

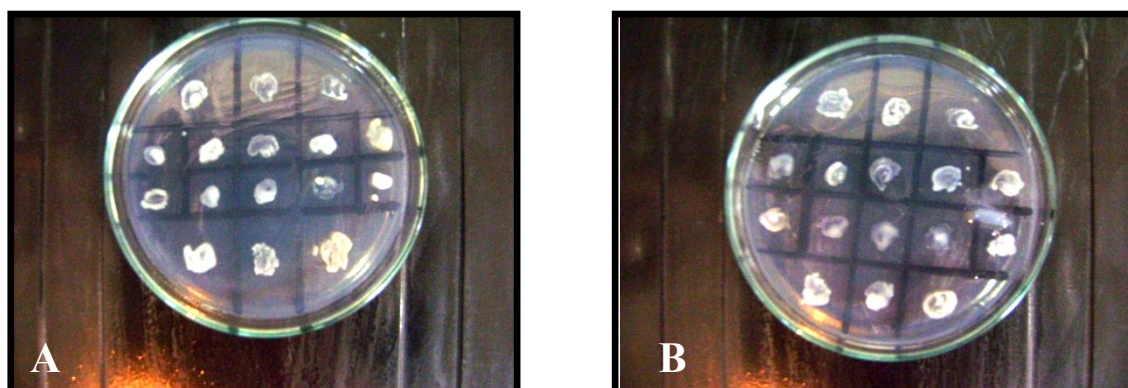


Figure n° 31 : Effet de la température sur la croissance des isolats testés.

A: croissance des souches testées à 10°C

B: croissance des souches testées à 42°C

L'incubation à des températures élevées, conduit assez souvent à la perte des propriétés de nodulation et celle de l'aptitude à fixer l'azote chez *Sinorhizobium meliloti* et *Rhizobium trifolii* (Toro *et al.*, 1986, Zurkowski *et al.*, 1982).

Des travaux réalisés sur les nodosités du niébé montrent que l'activité de la nitrogénase n'est pas affectée sous des températures élevées allant de 15 à 35°C, mais elle est sévèrement touchée à des températures au dessus de 38°C (Rainbird *et al.*, 1983).

Au niveau des cellules, la réponse au choc thermique se caractérise par une surproduction de certaines protéines appelées HSPs : heat shock proteins (Nocker *et al.*, 2001).

Plusieurs études étaient réalisées sur les HSPs des *Rhizobium* (Zahran *et al.*, 1999), mais aucune n'a été rapportée sur le *Rhizobium* du pois chiche.

6.2 Effet de la salinité :

L'étude est réalisée afin de déterminer le seuil de tolérance des souches isolées vis-à-vis du NaCl, sel dominant dans les régions de l'ouest Algérien (Dellel et Bouchnafa, 2005).

Les données sur la (**Figure 32**), montrent que les *Rhizobium* isolés du pois chiche ont exhibé une large diversité dans leur tolérance au sel. La concentration inhibitrice de sel varie en fonction des souches ainsi que la nature du sel. (Bekki *et al.*, 1987).

En effet, la tolérance au chlorure de sodium (NaCl), a été marquée puisque 100% des souches testés se sont développées à une concentration de 1% et allant jusqu'à 7% de NaCl.

Résultats et discussion

L'isolat ***Rch 72*** a montré une tolérance à 9% de NaCl. Des résultats similaires étaient rapportés par Maâtallah *et al.* (2002) qui ont pu identifier des souches nodulant le pois chiche tolérant 850 mM (5%) NaCl.

Une telle résistance a été signalée chez des *Rhizobia* nodulant le fenugrec, qui sont capables de croître à une concentration en NaCl pouvant atteindre 2380 mM (14%) (Abdelmoumen *et al.*, 1999).

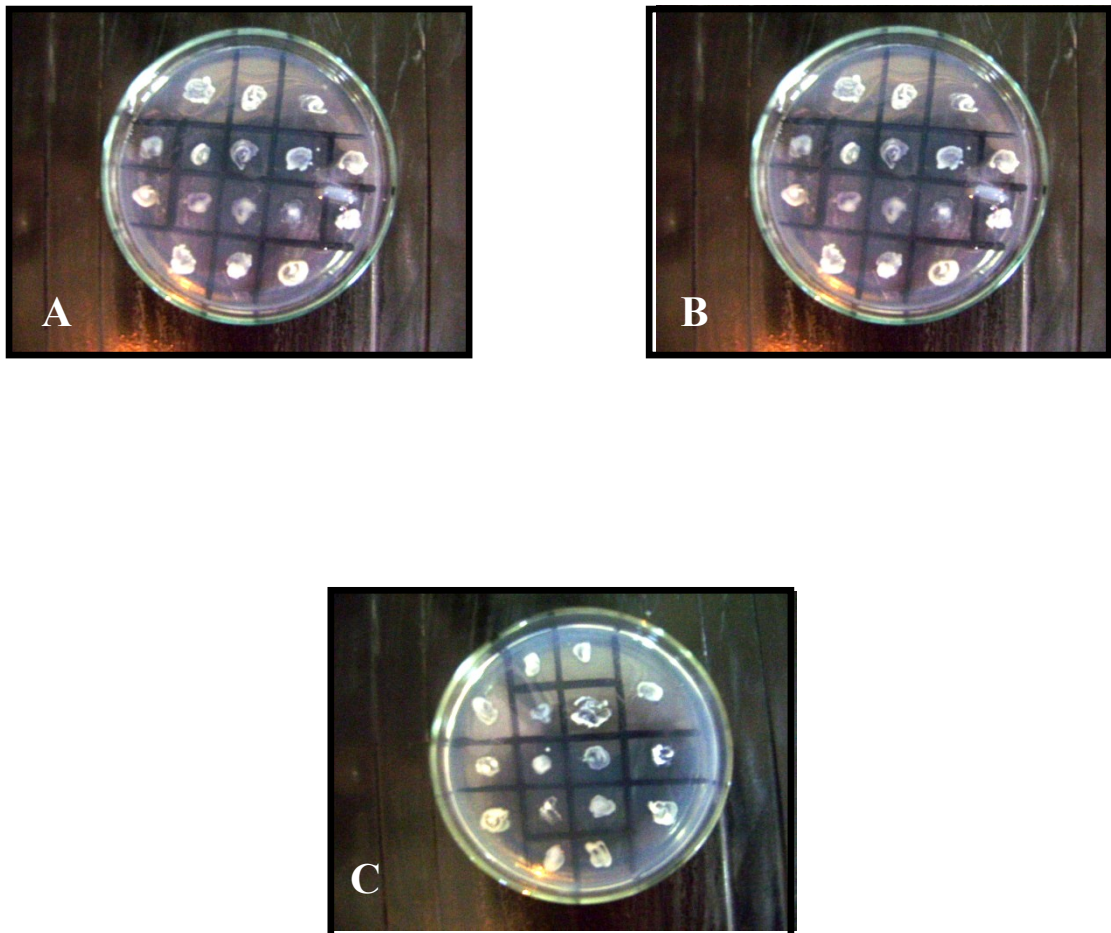


Figure n°32 : Effet du NaCl sur la croissance des isolats testés.

A : croissance des isolats à 28°C pendant 72h d'incubation (Témoin).

B : croissance des isolats testés à 1% de NaCl

C : croissance des isolats testés à 7% de NaCl

Résultats et discussion

Les limites de tolérance des souches de *Rhizobium* varient généralement (de 50 à 400 mM de NaCl; Wilson et Norris, 1970; Rai, 1983). *R. meliloti* est particulièrement résistant (Subba Rao *et al.*, 1972 ; Le Rudulier *et al.*, 1983 ; Sauvage *et al.*, 1983).

Généralement, cette gamme de concentration est plus étendue que celle des plantes-hôtes. D'ailleurs plusieurs travaux soulignent l'intérêt de la sélection simultanée des deux partenaires de l'association, pour une meilleure fixation symbiotique ; toutefois, la tolérance de la plante hôte est le facteur le plus déterminant dans l'efficacité de l'association *Rhizobium* - légumineuse (Rai *et al.*, 1985 ; Bekki *et al.*, 1987 ; Craig *et al.*, 1991).

6.3 Effet du pH :

Le pH a un effet sur la nodulation et la fixation d'azote (Graham *et al.*, 1992). L'acidité du sol menace la survie des *Rhizobiums* et affecte les signaux moléculaires entre les deux partenaires et par conséquent limite la nodulation (Graham *et al.*, 1994, Hungria *et al.*, 2000) .

La fixation d'azote dépend en premier lieu de l'état physiologique de la plante (Zahran *et al.*, 1999). En second lieu, de l'efficacité des microsymbiotes (Somasegaran *et al.*, 1994) et, en dernier de la réaction entre les deux partenaires.

Par exemple : La culture du pois chiche est très réussie sur les sols alcalins (Priefer *et al.*, 2001) . Cependant, la symbiose *Cicer-Rhizobium* est mieux adaptée à l'acidité (Howieson *et al.*, 2000, Siddique *et al.*, 1999) , ce qui justifie l'adaptation de nos isolats aux pH acides et basiques. Par contre, Priefer *et al.* (2001), ont cité l'absence de corrélation entre la tolérance des *Rhizobium* du à différents pH et le pH du sol d'origine.

Le pH optimal décrit pour les *Rhizobium* est 6-7 (Somasegaran *et al.*, 1994) . Tous les souches ont montré une bonne croissance sur des pH allant de 4 jusqu'à 12. Nos résultats sont conformes avec ceux de Nour (Nour *et al.*, 1994), qui a rapporté que les souches de pois chiche sont plus tolérantes que les *Rhizobium* en général. Cependant, d'autres auteurs ont rapporté un spectre de pH compris entre 5-8 (Maatalah *et al.*, 2002).

Résultats et discussion

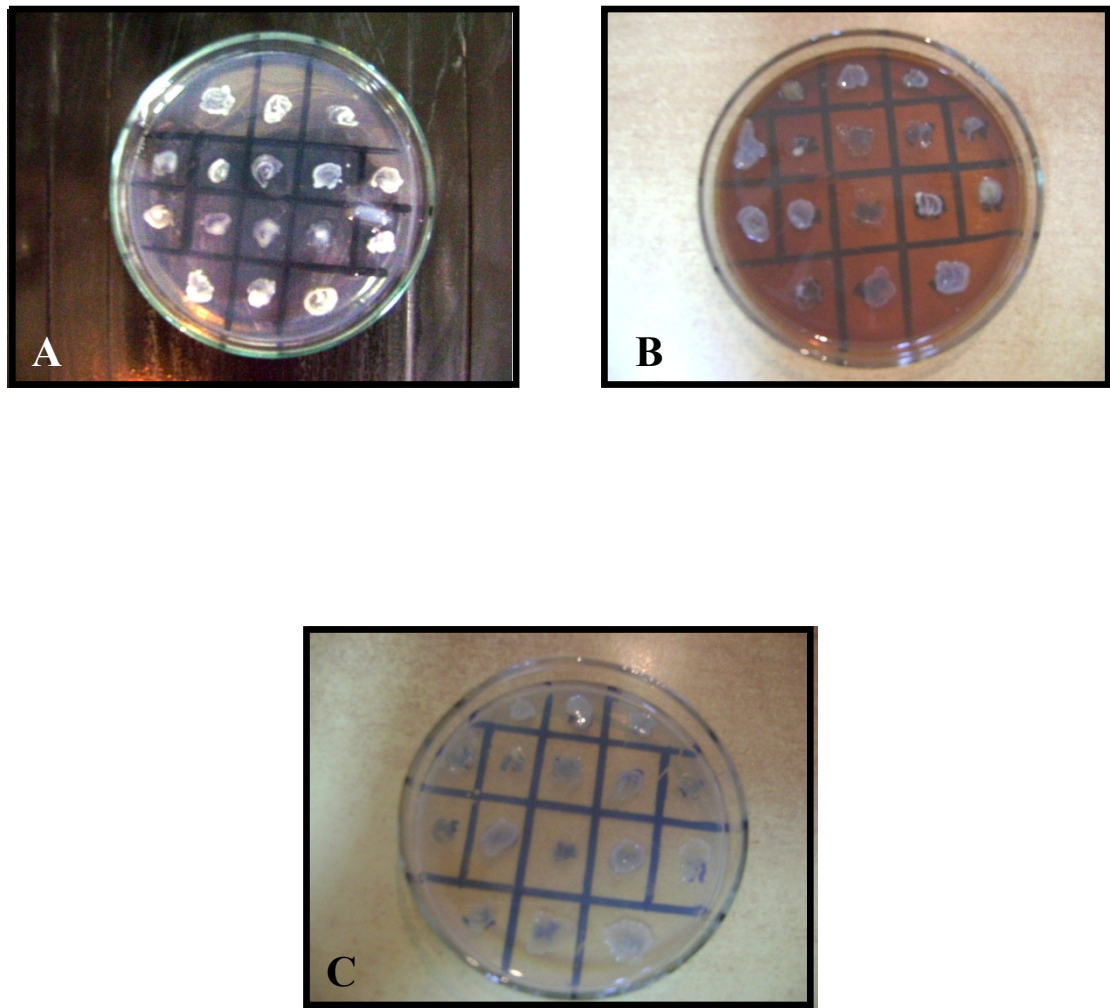


Figure n°33: Effet du pH sur la croissance des isolés testés.

A : Croissance des isolats testés à **pH 7** (Témoin).

B : Croissance des souches testées à **pH 12**.

C : Croissance des souches testées à **pH 4**.

6.4 Résistance aux antibiotiques :

Les marges de résistance des souches aux différents antibiotiques testés sont représentées dans (**Tableau n°5**). Les résultats indiquent que les souches montrent des réponses variables aux différents antibiotiques.

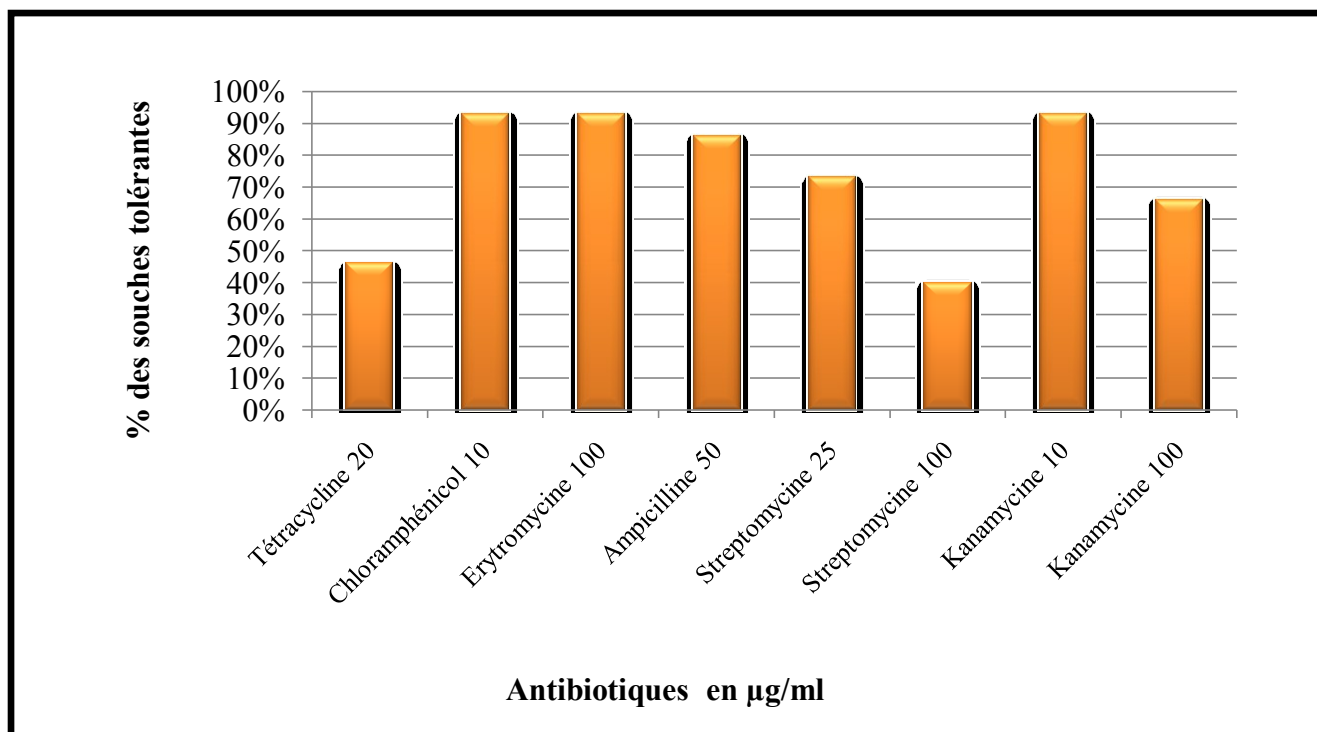


Figure n°34 : Effet de différents antibiotiques sur la croissance des isolats testés à 28°C pendant une semaine d'incubation.

Résultats et discussion

Tableau n°5 : Résistance intrinsèque des isolats testés à différents antibiotiques.

ATB (µg/ml) Souches	Tetr (20)	Ery (100)	Amp (50)	Chl (10)	Strep		Kana	
					(25)	(100)	(10)	(100)
Rch 4	-	+	-	+	+	+	+	+
Rch 10	+	+	+	+	-	-	+	-
Rch 18	+	+	+	+	+	-	+	+
Rch 21	+	+	+	+	-	-	+	+
Rch 28	+	+	+	+	+	+	+	+
Rch 31	-	+	-	+	+	+	+	-
Rch 34	-	+	+	+	+	+	+	+
Rch 25	+	+	+	+	+	-	+	+
Rch 39	+	+	+	+	+	+	+	+
Rch 45	-	+	+	+	-	-	+	-
Rch 48	-	+	+	+	+	-	+	+
Rch 49	-	+	+	+	+	-	+	+
Rch 55	+	+	+	+	+	+	+	+
Rch 72	-	-	+	-	+	-	-	-
Rch 96	-	+	+	+	-	-	+	-

Tetr : tétracycline, **Strep** : streptomycine, **Kana** : kanamycine, **Amp** : ampicilline, **Ery** : erythromycine, **Chl** : chloramphénicol.

Résultats et discussion

L'évaluation de la résistance intrinsèque des *Rhizobia* nodulant le pois chiche montre que 90% des isolats testés présentent une résistance élevée à la Chloramphénicol (10µg/ml), à l'Ampicilline (50µg/ml), à l'Erythromycine (100µg/ml), et à la Kanamycine à 10µg/ml (**Figure 34**).

Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines et de membrane plasmique tels que la kanamycine, la tétracycline et la streptomycine se sont révélés les plus néfastes sur la croissance des souches (**Annexe10**).

En effet, en présence de la Tétracycline, la Streptomycine (100µg/ml) et la Kanamycine (100µg/ml), les souches se sont montrées moins sensibles. Des pourcentages de résistance de 45%, 40% et 65% ont été respectivement notés pour les trois antibiotiques.

Graham *et al.* (1991) ont rapporté que l'effet inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature et de sa concentration dans le milieu et que le degré d'inhibition est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre.

La sélection de souches présentant une résistance multiple aux différents antibiotiques est très intéressante du fait que cette résistance peut être utilisée comme un important marqueur pour l'identification des souches et l'étude de leur diversité (Josey *et al.*, 1979 ; Shishido et Pepper, 1990 ; Sawada *et al.*, 1990).

Jordan (1984) a montré que les souches à croissance rapide sont plus sensibles à la tétracycline et à la streptomycine alors que les *Bradyrhizobia* sont plus résistants aux antibiotiques. Le même résultat a été rapporté par Elkan (1992) et Mpeperekhi *et al.* (1997).

Cependant, des souches de *Rhizobium* hautement tolérantes aux antibiotiques ont été isolées de différents sols de Malaisie (Roughley *et al.*, 1992). Parallèlement, Odee *et al.* (1997) ont montré que les *Bradyrhizobia* sont plus sensibles que les souches à croissance rapide vis-à-vis des différents antibiotiques testés.

Résultats et discussion

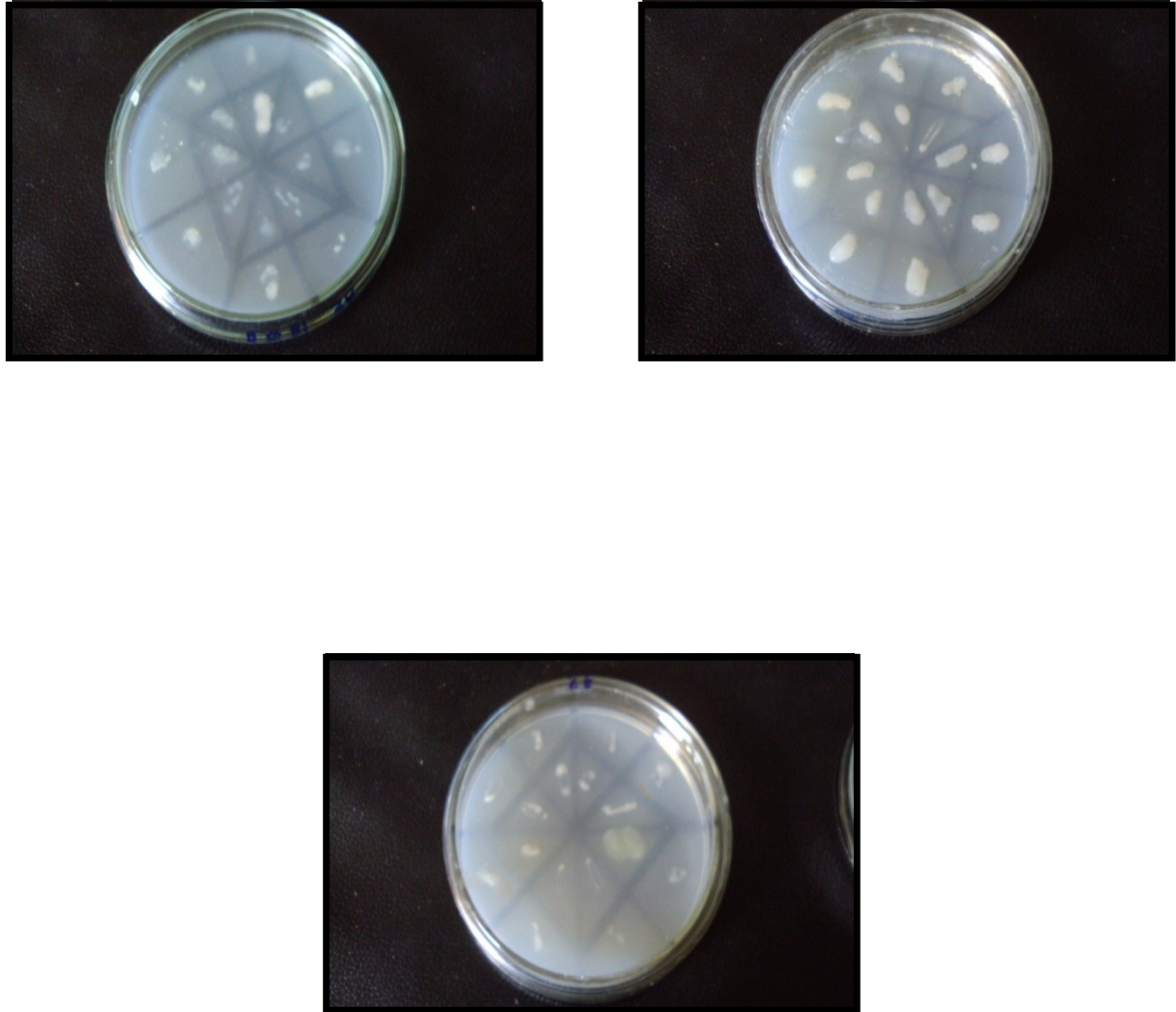


Figure n°35 : Effet des antibiotiques sur la croissance des isolats testés à 28°C pendant une semaine d'incubation.

A: croissance des isolats en présence de l'Ampicilline (50µg/ml).

B: croissance des isolats en présence de la Chloramphénicol (10µg/ml).

C: croissance des isolats en présence de la Tétracycline (20µg/ml).

Résultats et discussion

6.5 Résistance aux métaux lourds :

L'effet de six différents métaux lourds sur le développement des 15 souches a été évalué. Une forte résistance a été enregistrée pour les six métaux lourds testés à l'exception remarquable de la souche **Rch 72** qui a été inhibée par le **cuivre**.

Les métaux lourds présents dans le sol peuvent entraîner un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire des *Rhizobia* (Gusmao-lima *et al.*, 2005). Le nombre et la survie de ces bactéries dans les sols contaminés peut être sévèrement affecté (Reddy *et al.*, 1983 ; Obbard *et al.*, 1994).

Il a été rapporté que l'aluminium agit au niveau de l'ADN des souches de *Rhizobium* (Johnson et Wood, 1990). L'exposition de ces bactéries aux fortes concentrations en aluminium affecte également leur mobilité dans le sol et leur capacité infective (Olive *et al.*, 1994).

L'exposition à un excès de manganèse affecte la composition de la membrane externe chez les *Rhizobia*. En fait, en 1988, Appana a montré que les fortes concentrations en manganèse peuvent altérer la composition ainsi que le rôle des exopolysaccharides chez des souches de *Sinorhizobium meliloti*.

Wilson et Reissensauer (1970) ont rapporté que le zinc affecte négativement la croissance des *Rhizobia*. Un excès de zinc exerce un effet inhibiteur non seulement sur la croissance des *Rhizobia* mais aussi sur leur efficacité à travers la perte des plasmides symbiotiques (Casella *et al.*, 1988 ; Giller *et al.*, 1998).

Actuellement, le cadmium est reconnu comme étant néfaste aussi bien pour les microorganismes symbiotiques que pour l'établissement de la symbiose (Tiller *et al.*, 1994 ; Purchase *et al.*, 1997 ; Gusmao-lima *et al.*, 2005).

les concentrations efficaces disponibles à ces isolats seront inférieures à celles ajoutées puisque les ions du métal forment un complexe avec l'agar et les composants du milieu (Chaudri *et al.*, 1992). De ce fait, les *Rhizobiums* testés peuvent être sensibles à des concentrations beaucoup plus basses dans le sol.

Angle *et al.* (1993) ainsi que Tong et Sadowsky (1994) ont rapporté que les souches de *Bradyrhizobium* sont plus résistantes aux métaux lourds puisqu'ils ont la capacité d'alcaliniser le milieu et rendre ainsi les métaux moins disponibles dans leur environnement. Cependant, une grande variabilité de résistance à différents métaux lourds a été observée entre les souches appartenant à la même espèce *Bradyrhizobium japonicum* (Kinkle *et al.*, 1987).

On a montré que la nature du sol et son pH peuvent influencer la précipitation ou la solubilité des minéraux. Sous forme ionique, un métal devient plus mobile et donc plus

Résultats et discussion

toxique. L'effet combiné du pH et des métaux lourds sur une population de *Rhizobium leguminosarum* et sur son potentiel fixateur d'azote s'est révélé plus néfaste sous les conditions d'acidité (Ibekwe *et al.*, 1997).

Certaines associations rhizobium – légumineuse sont capables de se maintenir sur des sols à haut contenu en métaux lourds. En effet, l'inoculation des graines de trèfle cultivées sous stress métallique par des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* efficaces et résistantes aux métaux lourds a pu augmenter le taux de la fixation d'azote (Giller *et al.*, 1989).

La sélection de souches résistantes aux métaux lourds présente un grand intérêt pratique. Plusieurs recherches se penchent actuellement sur l'utilisation de la symbiose entre des *Rhizobia* et des légumineuses résistantes comme un moyen efficace de "bio-remédiation" contre la contamination des sols par les métaux lourds. En outre, l'utilisation du *Rhizobium* comme un agent de prévention dans les sols contaminés a été récemment rapportée par Abbes et Kamel (2004).

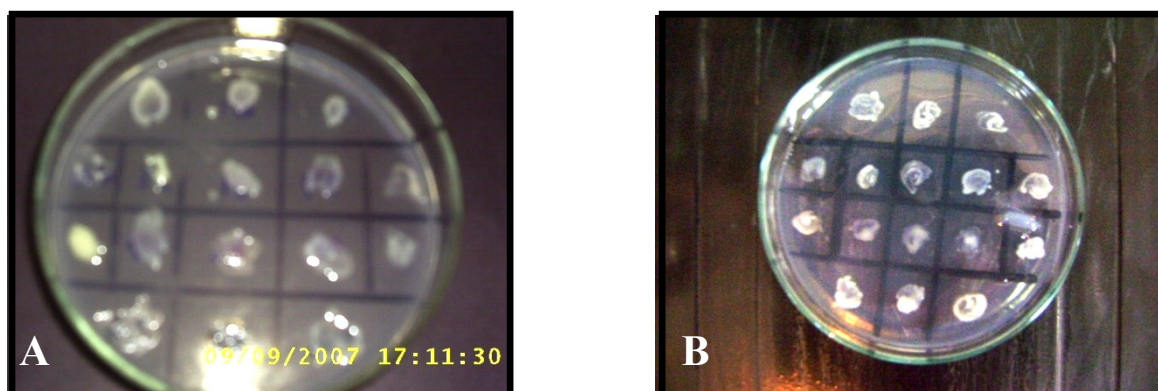


Figure n°36 : Effet des métaux lourds sur la croissance des isolats testés.

A : la croissance des souches testées en présence du AlCl_3 .

B : la croissance des souches testées en présence du HgCl_2 .

Résultats et discussion

6.6 Dégradation des substrats carbonés :

La plupart des souches de *Rhizobia* de pois chiche sont capables de métaboliser une grande variété de substrats carbonés.

Tous les isolats testés se sont développés sur le glycérol, le sorbitol, le mannitol, le maltose, le cellobiose, le saccharose, l'inositol, le raffinose, le galactose, le lactose, le malt, le glucose, l'acétate de sodium et le citrate de sodium, à l'exception de trois souches :

Rch 21, ***Rch28***, qui n'ont pas pu assimiler le galactose et l'acétate de sodium et ***Rch39***, qui n'a pas pu assimiler le galactose et le maltose.

Il a été rapporté, que les *Rhizobia* à croissance rapide sont capables de se développer sur une grande variété de substrats carbonés, contrairement aux *Rhizobia* à croissance lente dont l'habilité à assimiler diverses sources de carbone est limitée.

Dans notre étude, les résultats montrent que la majorité des *Rhizobia* de pois chiche testés peuvent métaboliser une large gamme des hydrates de carbone. De tels résultats sont en accord avec ceux de Stowers *et al.* (1985) ; Van Rossum *et al.* (1995).

L'incapacité de différentes souches de *Rhizobia* à assimiler les polysaccharides complexes de type hexanes (Amidon) est rapportée par Nour *et al.* (1994) pour des souches de *Mesorhizobium* nodulant *Cicer arietinum*. Alors que Maâtallah (2002) a pu caractériser quelques souches nodulant *Cicer arietinum* pouvant toutefois assimiler l'amidon.



Figure n°37 : Assimilation des substrats carbonés par les isolats testés.

Résultats et discussion

6.7 Test du bleu de bromothymol (BTB) :

Les résultats de ce test sont indiqués dans le (**Tableau n°7**). En fait, le bleu de bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6. Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du bleu vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleue.

Parmi les différences qui caractérisent les *Rhizobium* des *Bradyrhizobium*, on admet que la vitesse de croissance *in vitro* des premiers est beaucoup plus rapide (temps de génération de 3-4 heures) que celle des seconds (temps de génération de 6 à 8 heures). Mais il existe d'autres caractéristiques qui permettent de les distinguer comme l'acidification ou l'alcalinisation du milieu de culture, qui sont décrites en détail par Jordan en 1984 et Prin *et al.* en 1993.

Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan, 1984). Dans notre étude, les isolats ***Rch10 Rch21, Rch28, Rch31, Rch39, Rch45, Rch72,*** ont produit des réactions acides sur le YEM solide + BTB alors que les isolats : ***Rch4, Rch55, Rch18, Rch31, Rch34 Rch25, Rch48, Rch96*** ont produit une forte alcalinisation.

Xu *et al.* (1995) ont rapporté que 80% des souches testées de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* ont pu donner des réactions positives avec le YEM + BTB, alors que les souches de *Bradyrhizobium* ont toutes donné des réactions négatives.

Toutefois, des souches de *Bradyrhizobium* à réaction acide ont été rapportées par Moreira *et al.* (1993). De même, des souches à croissance rapide alcalinisant le milieu ont été mises en évidence (Hernandez et Focht, 1984).

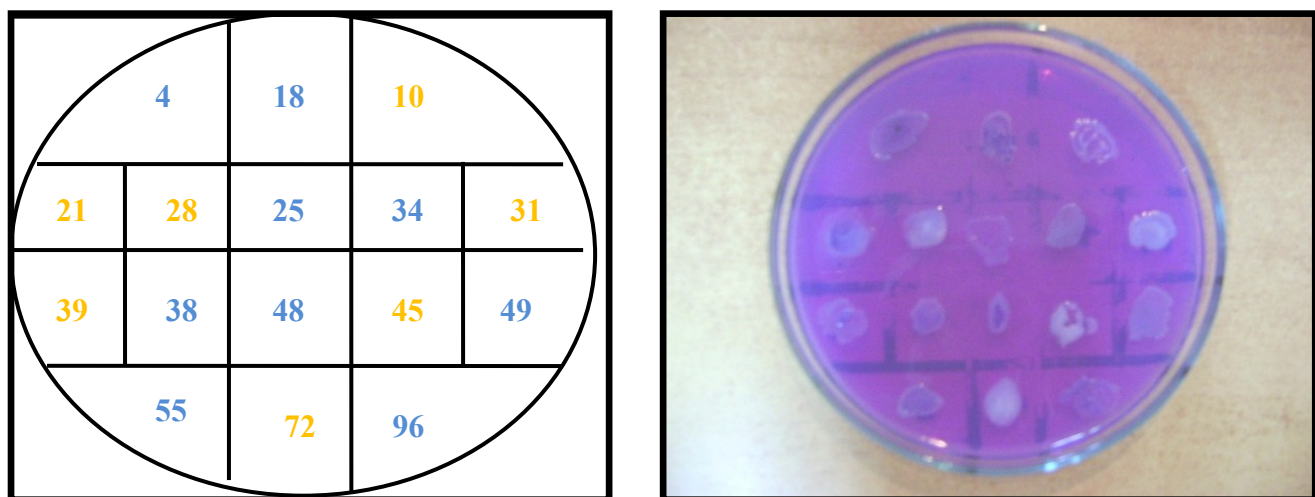


Figure n°38 : Réaction des isolats testés sur le milieu YEM+BTB

6.8 Hydrolyse de l'urée et réduction du nitrate :

La mise en évidence de la capacité des *Rhizobia* à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par (Jarvis *et al.* 1977) en utilisant le rouge de phénol comme un indicateur de pH. L'augmentation du pH du milieu par les souches suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par un changement de la coloration du milieu vers le rouge foncé ou le rouge indigo. En général, 100% des souches ont pu hydrolyser l'urée.

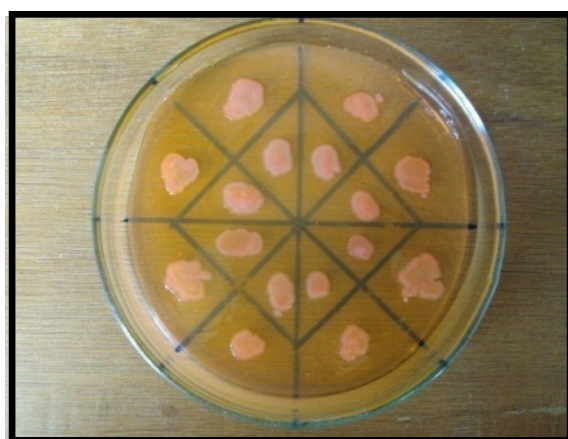


Figure n°39 : Dégradation de l'urée par les isolats testés.

Résultats et discussion

Dans le sol, l'azote est présent principalement sous forme d'ions ammonium (NH_4^+) et sous forme d'oxydes d'azote, les ions nitrates (NO_3^-) ou nitrites (NO_2^-).

Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leur plantes hôte.

L'aptitude à hydrolyser l'urée et à réduire le nitrate est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte pour la sélection d'une souche particulière. En fait, un excès de nitrate dans le sol peut exercer un effet inhibiteur sur l'adsorption des *Rhizobia* sur la surface des racines (Sherwood *et al.*, 1984) ainsi que sur leur capacité infective et effective (Davidson et Robson, 1986 ; Arreseigor *et al.*, 1997).

6.9 Détection de la catalase :

On a remarqué la formation de bulles de gaz immédiatement après l'ajout de l'eau oxygénée, ce qui suggère que tous les isolats testés possèdent l'enzyme « Catalase ».

Durant toute la durée de la symbiose, de son établissement à sa fin avec la dégradation des nodules, *S. meliloti* (modèle des études réalisées sur le stress oxydatif) subi un stress oxydatif important, néanmoins indispensable à l'établissement optimal d'une symbiose (Jamet *et al.*, 2003).

Ce stress oxydatif semble avoir un rôle signalétique pour l'expression des gènes de la plante impliqués dans la symbiose. En effet, Ramu *et al.* (2002) ont rapportés que l'expression d'une peroxydase indispensable à l'organogénèse du nodule était régulée par les ROS et par les facteurs Nod produits par la bactérie. Le H_2O_2 et cette peroxydase pourraient être impliqués dans la régulation de l'infection, par exemple en facilitant la dissolution de la matrice glycoprotéique durant la progression du cordon d'infection, comme suggéré par Jamet *et al.* (2007).

L'enzyme qui permet la fixation de l'azote est la nitrogenase. Cette enzyme peut être inactivée de façon rapide et irréversible par l'oxygène ou ses espèces réactives, c'est pourquoi il existe une barrière de diffusion de l'oxygène dans le cortex du nodule ; de plus, la plante synthétise la leghémoglobine, une molécule capable de séquestrer l'oxygène pour empêcher sa diffusion sous forme libre et délivrer l'oxygène nécessaire aux bactéroïdes (Jones *et al.*, 2007).

Cependant, l'activité nitrogenase nécessite une grande quantité d'énergie , impliquant une respiration aérobie intensive, ce qui produit une grande quantité de ROS, comme les radicaux

Résultats et discussion

superoxydes (O_2°) et le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée (H_2O_2). La leghemoglobine est également capable de s'auto-oxyder, produisant ainsi de grandes quantités de ROS.

Ces ROS ont été détectés dans les nodules ; l'accumulation de H_2O_2 tout autour des bactéries a été observée dans certains cordons d'infection mais jamais à l'intérieur des bactéries ou des bactéroïdes, ce qui indique qu'elles possèdent un système de détoxification de l' H_2O_2 efficace (Santos *et al.*, 2001).

La bactérie *Sinorhizobium meliloti*, possède 3 gènes codant pour 3 catalases : *Kat A*, *Kat B* et *Kat C*. Différentes expressions des gènes *Kat* ont été observées lors du développement nodulaire. En effet, une forte expression du gène *Kat A* a été détectée dans les bactéroïdes suggérant que le processus de la fixation de l'azote induit un stress oxydatif important. Par contre, au moment de l'infection, dans la bactérie ; seules les gènes *Kat B* et *Kat C* sont exprimés. Ces données montrent que ces deux gènes sont indispensables lors de la symbiose (Alexandre *et al.*, 2003).

Résultats et discussion

Tableau n°6 : Les résultats du test de nodulation, tests biochimiques et l'effet de différents facteurs sur les isolats testés.

Isolats	Origine : Sol naturel (+ souches autochtones de <i>Rhizobium</i>)	Nodulation	Nombre	Réaction sur YEM+BTB	Catalase	Dégradation de l'urée	pH	Salinité	T°C
<i>Rch 4</i>	Tessala	<i>Nod +</i>	1	Alcaline	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 40
<i>Rch 10</i>	Tessala	<i>Nod +</i>	1	Acide	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 40
<i>Rch 18</i>	<i>Ain Témouchent</i>	<i>Nod -</i>	-	Alcaline	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 40
<i>Rch 21</i>	<i>Ain Témouchent</i>	<i>Nod -</i>	-	Acide	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 40
<i>Rch 28</i>	Zahana	<i>Nod -</i>	-	Acide	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 40
<i>Rch 31</i>	Zahana	<i>Nod -</i>	-	Alcaline	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 40
<i>Rch 34</i>	Zahana	<i>Nod +</i>	6	Alcaline	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 40
<i>Rch 25</i>	Zahana	<i>Nod +</i>	1	Alcaline	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 40
<i>Rch 39</i>	<i>ITGC</i>	<i>Nod +</i>	5	Acide	+	+	4 - 12	1 - 2%	10-40
<i>Rch 45</i>	<i>ITGC</i>	<i>Nod +</i>	1	Acide	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 40
<i>Rch 48</i>	<i>ITGC</i>	<i>Nod +</i>	3	Alcaline	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 40
<i>Rch 49</i>	Tessala	<i>Nod -</i>	-	Acide	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 40
<i>Rch 55</i>	Tessala	<i>Nod -</i>	-	Alcaline	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 45
<i>Rch 72</i>	<i>Ain Témouchent</i>	<i>Nod +</i>	1	Acide	+	+	4 - 12	1 - 9%	6 - 45
<i>Rch 96</i>	<i>ITGC</i>	<i>Nod +</i>	1	Alcaline	+	+	4 - 12	1 - 7%	6 - 45

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La nodulation du pois chiche s'avère être, en absence de fertilisation azotée, un facteur limitant de la croissance végétale. Une adéquation entre les populations natives et les cultivars étudiés est montrée par une corrélation positive obtenue sur l'ensemble des résultats obtenus.

D'après les résultats obtenus, il paraît qu'une corrélation remarquable existe entre la variété **93.93C** et le sol naturel de Ain Témouchent. De par son potentiel important de croissance, la variété **93.93C** est une variété de choix pour évaluer les effets de l'inoculation avec le *Rhizobium* sur la croissance de la plante-hôte et voir si les caractéristiques édaphiques peuvent significativement affecter cette croissance.

Il semble que les nodosités formées par les souches locales des sols de **Ain Témouchent**, **ITGC**, **Tessala** et même dans le sol de **Zahana** où le poids des nodosités était le plus faible, ont une masse non négligeable et un bon potentiel de fixation d'azote.

L'analyse des caractéristiques biochimique, la tolérance à la salinité, aux températures élevées, aux pH acides et alcalins, aux antibiotiques, aux métaux lourds, ainsi que les propriétés symbiotiques de 15 isolats, ont permis de mettre en évidence une certaine diversité physiologique au sein de ces populations Rhizobiennes.

Certains isolats, tels que **Rch 72**, ont présenté des caractéristiques intéressantes, elles sont efficaces et capables d'assimiler une multitude de substrats carbonés, de tolérer des pHs allant de 4 à 12, des concentrations en **NaCl** de **1 à 9 %**, des températures maximales comprises entre **30 à 42 °C** et elles se sont même révélées très résistantes aux métaux lourds et aux antibiotiques.

Pour les sols ayant donné une nodulation, l'amélioration de la fixation azotée pourrait être basée sur ces mêmes populations natives. Des études devraient être conduites pour améliorer la nodulation de ces bactéries et une meilleure expression de leur potentiel de fixation azotée.

Enfin, lorsqu'il est matériellement impossible de modifier le milieu (sécheresse, température élevée du sol, carence en phosphore, excès temporaire de N,.....), on peut envisager la sélection de *Rhizobium* et de légumineuses adaptés à ces conditions défavorables, ou identifier de nouvelles espèces capables de se développer et de fixer l'azote atmosphérique dans de telles conditions.

La diversité phénotypique obtenue suggère qu'il pourrait exister plusieurs espèces génomiques dans les sols de l'ouest algérien. Pour vérifier cette suggestion, nous devons

Conclusion et perspectives

achever cette étude en utilisant des techniques moléculaires telles que REP/PCR ou RFLP/PCR, ou le séquençage des gènes ADNr 16S et l'Hybridation de ADN/ADN.

La fixation de l'azote chez le pois chiche peut donc être améliorée par un travail concerté entre microbiologistes, agronomes et sélectionneurs des légumineuses par la mise en œuvre d'un projet pilote de réhabilitation des légumineuses alimentaires, au niveau d'une zone déterminée de l'ouest Algérien, en intégrant des études sur la trilogie sol-*Rhizobium*-légumineuses et, en se basant sur l'idée d'obtenir des souches adaptées aux conditions agro-climatiques et pédologiques qui caractérisent ces régions.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abbas S. M., and Kamel E.A.** (2004). *Rhizobium* as a Biological Agent for Preventing Heavy Metal Stress. *Asian J. Plant Sc.* **3**, 416-424.
- **Abdelguerfi-Laouar M., Hamdi N., Bouzid H., Zidouni F., Laib M., Bouzid L., Zine F.** (2001) A. Les légumineuses alimentaires en Algérie : situation, état des ressources phytogénétiques et cas du pois chiche à Béjaia. 3èmes Journées Scientifiques de l'INRAA à Béjaia, 11-13 Avril 2001 (sous presse).
- **Abdelmoumen H., Filali-Maltouf A., Neyra M., Belabed A., and Missbah El Idrissi M.** (1999). Effect of high salt concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 886-898.
- **Affianha T. et Alexander D.** (1992). Difference among cowpea, Rhizobia intolerance to high temperature and dissication in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43** : 435-439 pp.
- **Alazard D.** (1985) Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 732-734.
- **Alexandre J., Sigaud S., Van de Sype G., Puppo A., Hérouart D.** (2003). Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. *Mol Plant Microbe Interact.* 16: 217-225.
- **Allen E. K., and Allen O.N.** (1981). The leguminosae: A source book of characteristics, uses and nodulation. Madison : University of Wisconsin Press, 812 pp.
- **Almeida J.P.F., Hartwig U.A., Fehner M., Nösberger J. and Lüscher A** (2000). Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* 51: 1289-1297.
- **Amarger N., Macheret V., et Laguerre G.** (1997). *Rhizobium gallicum* sp.nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int.Syst.Bacteriol.* 47:996-1006.
- **Angel J. S., Mc Grath S. P., Chaudri A. M., Chaney R. L., and Giller K. E.** (1993). Inoculation effect on legumes grown in soil previously contaminated with sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.* **25**, 575-580.
- **Anne P.** (1945) .Le dosage rapide du carbone organique dans les sols. *Ann. Agron.* Avril, Mai, Juin, 1945, 5 ème année, no 2, 161-172 pp.
- **Aouni ME., Mhamdi R., Jebara M., Amarger N.** (2001a) Characterization of rhizobia nodulating chickpea in Tunisia. *Agronomie* 21:577–581.
- **Appana V. D.** (1988). Alteration of polysaccharides composition in *Rhizobium meliloti*. JJ-1 exposed to manganese. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 79-82.

Références bibliographiques

- **Arreseigor C., Minchin F. R., Gordon A. J., and Nath A. K.** (1997). Possible cause of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in response to nitrate. *J. Exp. Bot.* **48**, 905-913.
- **Ashraf M., Waheed A.** (1993). Responses of some genetically diverse lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to salt. *Plant Soil* **154**:257-266.
- **Aubert G.** (1978). Méthode d'analyse des sols, 191p.
- **Bà S., Willems A., de Lajudie P., Roche P., Jeder, H., Quatrini, P., Neyra, M., Ferro, M., Promé, J.C., Gillis, M., Boivon-Masson, C., and Lorquin, J.** (2002). Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa. *Systematic and Applied Microbiology* **25**: 130–145.
- **Baldwin I. L., and Fred E. B.** (1929). Nomenclature of the root nodule bacteria of the leguminosae. *J. Bacteriol.* **17**, 141-150.
- **Barea J. M., Azcon-Aguilar C and Azcon R** (1988). The role of mycorrhiza in improving the establishment and function of Rhizobium - Legume system under field conditions. In Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. Eds. D. P. Beck and L. A. Materon. pp : 153-162.
- **Barker D.G., Bianchi S., Blondon F., Dattée Y., Duc G., Essad P., Flament P., Galuxy P., Génier G., Muel X., Toureur J., Dénarié J et Huguet T.** (1990). Medicago truncatula, a model plant for studying the molecular genetics of Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol Biol Rep.* **8**:40-49.
- **Barnett Y., Catt P. C., Jenjareontham R., and Mann K.** (1993). Fast-growing root nodule bacteria from Australian *Acacia* spp., in New Horizons in Nitrogen Fixation, Palacios, R. et al., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 594p.
- **Beddar N.** (1990). Analyse de l'effet inoculation par différentes souches de *Rhizobium* sur l'élaboration du rendement chez les pois chiche (*Cicer arietinum* L) var ILC3279. Mémoire d'ingénieur agronome, INSB, Sétif, 81p.
- **Bejiga G., and Vander maesen L.J.G.** (2006). *Cicer arietinum* L. In; Brink.M., & Belay.G. Ressources végétales de l'Afrique tropicale (PROTA) 1 : Cereales and pulses/Céréales et légumes secs. PROTA, Wageningen, pays bas. ISBN: 9057821729.1:46-51.
- **Bekki A.** (1983). Contribution à l'étude de quelques espèces de Luzerne et leurs symbiotes dans un environnement salé. DES biologie végétale. Oran Université d'Oran, 48 p.

Références bibliographiques

- **Bekki A.** (1986). Fixation d'azote en conditions de stress salin chez *Medicago* : sensibilité respective des partenaires symbiotiques. Thèse de doctorat. Université des Sciences et techniques de Nice. France.
- **Bekki A., Trinchant J.C., Rigaud J.** (1987). Nitrogen fixation (C_2H_4 reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium Chloride stress. *Physiol. Plant.* 71, 61-7.
- **Bekki A.** (1994). Effet de la salinité sur la fixation d'azote chez l'association *Rhizobium medicago*: sensibilité du partenaire bactérien à l'état libre et sous forme de microsymbiote. Tentative d'essais au champ. Ed. INRA. Paris. 77: 139-147.
- **Bekki A.** (1997). Effect of salinity on the nitrogen fixation by the *Rhizobium meliloti-Medicago* association. In biological nitrogen fixation for the 21st Century. Eds. C. Emlrich *et al.* Kluwer Academic publishers. Netherlands.
- **Bekki A., Baba Ahmed H., Gaouar A.** (1999). Effect of soil salinity on survival and symbiotic performance between *Rhizobium meliloti* and *Medicago* in north west of Algeria. Accepté pour la publication in the third symposium on biological nitrogen fixation in mediterranean bassin (FABAMED) : Toward biofertiliser application for an sustainable agriculture. El Arich (Egypt) 21-26 novembre 1999.
- **Bekki A., Rezki M. A., et Gaouar G.** (2000). Adaptation naturelle de rhizobia à la salinité des sols et role des plantes halophiles fixation de l'azote et développement durable dans le bassin méditerranéen carthage, 1998 et Montpellier 2000 ED. INRA, Paris
- **Béna G., Lyet A., Huguet T., et Olivieri I.** (2005). *Medicago-Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*. *J. Evol. Biol.*, 18 : 1547-1558.
- **Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A. et Squartini A.** (2004). Gamma proteobacteria can nodulate legumes of genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 462-468 pp.
- **Bergey's** (1984). Manuel of systematic bacteriology. Vol. 1 (Ed) Noel, R., Krieg. Paris. 122 p.
- **Beyerinck M. W.** (1888). Die Bacterien der Papilionaceen-Knöllchen. *Bot. Zeitung* 46, 725-804.
- **Boivin C., et Giraud E.** (1999). Molecular symbiotic characterization of rhizobia: Towad a polyphasic approach using nod factors and nod genes. In : Highlights of Nitrogen Fixation Research. (Martinez-Romero, E. et Hernandez, G. eds.) Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, p: 295-299.

Références bibliographiques

- **Bolland M.D.A., Siddique K.H.M., Loss S.P., Baker M.J** (1999). Comparing responses of grain legumes, wheat and canola to applications of superphosphate. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 53 (2): 157-175.
- **Bouillard. B., et Moreau R.C.** (1962). Sol, Microflore et Végétation équilibre biochimique et concurrence biologique, Paris.
- **Braune P.H ., Planquaert P.H ., et WERY J .**(1988). Pois –chiche culture utilisation (Brochure) .Ed .ITCF 11p.
- **Broughton W. J. and Dilworth M. J.** (1971) .Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical Journal* **125**, 1075-1080 pp.
- **Callo G., Dupuis M.** (1980) Le calcaire actif des sols et sa signification. *Dull. Afes.* 17-26 pp.
- **Calvet G et Villemin P.** (1986). Interprétation des analyses de terre. Ed, SCPA., 24 P.
- **Casella S., Shapleigh J. P., Lupi F., and Payne W. J.** (1988). Nitrite reduction in bacteroids of *Rhizobium "hedysari"* strain HCNT1. *Arch. Microbiol.* **149**, 384-388.
- **Casida L. E., et Jr.** (1982) *Ensifer adhaerens*, gen. nov., sp. nov. a bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32 (3): 339–345.
- **Cadahia E., Leyvar A., Ruiz-Argueso T.** (1986). Indigenous plasmids and cultural characteristic of rhizobia nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.), *Arch. Microbiol.* 146:239–244.
- **Chanderasekaran.R.** (2007).Option for reducing Ascochyta blight severity in chickpea (*Cicer arietinum* L.).Thesis of Master of Science.University of Saskatchewan Saskatoon.
- **Chaudri A.M., Mc Grath S.P., Giller K.E.** (1992). Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* from soil contaminated by past applications of sewage sludge, *Soil Biol. Biochem.* 24 : 83–88.
- **Chen W. X., Yan G. H., et Li J. L.** (1988). Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38: 392-397.
- **Chen W. X., Ly G.S., Qi Y.L., Wang E. T., Yuan H. L., et Li J. L.** (1991) *Rhizobium huakuii* sp. nov. Isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J.Syst. Bacteriol.*, 41: 275-280.

Références bibliographiques

- **Chen W. X., Wang E.T., Wang S. Y., Ly Y.B., Chen X.Q., et Li Y. (1995)** Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an acid saline environment in Xingjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45:153-159.
- **Chen W. X., Tan Z. Y., Gao J. L. et Wang E. T. (1997)** *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. . *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 870-873.
- **Chen W. M., Levens S., Lee T.-M., Coenye T., De Vos P., Mergeay M., et Vandamme P. (2001).** *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of cystic fibrosis patients. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.*, 51:1729-1735.
- **Chen W.-M., James E. K., Coenye T., Chou J. H., Barrios E., de Faria S. M., Elliot G. N., Sheu S.Y., Sprent J. I., et Vandamme P. (2006).** *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa spp ; from Taiwan and South America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 1847-1851.
- **Christodoulou V, Bampidis VA, Hucko B, Ploumi K, Iliadis C, Robinson PH, Mudrik Z (2005).** Nutritional value of chickpeas in rations of lactating ewes and growing lambs. *Anim. Feed Sci Technol.* 118:229-241.
- **Cordovilla M.P., Ligeró F., Lluch C., The effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*, J. Exp. Bot. 45 (1994) 1483–1488.**
- **Cordovilla M.P., Ligeró F., Lluch C. (1995)** Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress. *Plant Soil.* 0, 1-9 (in press).
- **Coronado C, Zuanazzi J, Sallaud C, Quirion JC, Esnault R, Husson HP, Kondorosi A et Ratet P (1995)** Alfalfa Root Flavonoid Production Is Nitrogen Regulated. *Plant Physiol.* 108: 533-542.
- **Crow V.L., Jarvis B.D.W., Greenwood R.M. (1981).** Deoxyribonucleic acid homologies among acid producing strains of *Rhizobium*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31 152–172.
- **Davidson I. A., and Robson M. J. (1986).** Effect of contrasting patterns of nitrate uptake, N₂- fixation, nodulation and growth of white clover. *Ann. Bot.* 57, 331-338.
- **de Faria S.M., Lewis G.P., Sprent J.I et Sutherland J.M. (1989).** Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.* 111: 607-619.
- **de Lajudie P., Willems A., Pot B., and 7 other authors. (1994).** Polyphasic taxonomy of Rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium*

Références bibliographiques

- meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., *Sinorhizobium terangae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 715-733.
- **de Lajudie P., Fulele-Laurent E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M. D., Kersters K., Dryfus B.L., et Gillis M.** (1998a). Description of *Allorhizobium undicola* gen. nov. sp. nov. For nitrogen-fixing bacteria efficiently nodulating *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 1277-1290.
 - **de Lajudie P., Willems A., Nick G., Moreira F., Molouba F., Hoste B., Torck U., Neyra M., Collins M. T., Lindström K., Dreyfus B., et Gillis M.** (1998b). Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 369-382.
 - **Dellal A., Bouchnafa.** (2005). La salure des sols et la limitation de la production agricole au Maghreb. *Revue de l'écologie –environnement*, Janvier, N° 00université Ibn Khaldoun.
 - **Delgado M.J, Garrido J.M., Ligerio F., Lluch C.** (1993) . Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress, *Physiol. Plant.* **89** : 824–829.
 - **Delgado M.J., Ligerio F., Lluch C.** (1994) .Effect of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba bean, common bean and soybean plants, *Soil Biol. Biochem.* **26** :371–376.
 - **Dénarié J., Debellé F., Promé J.C.** (1996). *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* ; 65 : 503-35.
 - **Dixon R .M, Hosking B.J.** (1992). Nutritional value of grain legumes for ruminants. *Nutr. Res. Rev.* 5: 19-43.
 - **Domergues Y., et Mangenot B.** (1970). *Ecologie microbienne du sol* : (Ed). Masson et Cie Paris, 796 p.
 - **Domergues Y., Duhoux E., et Diem H.G.** (1999). *Les arbres fixateurs d'azote.* Espace34 (ed) Montpellier.
 - **Domergue odile** ; (21 septembre 2006) : mémoire pour l'obtention du diplôme de l'école pratique des hautes études ; diversité des *Rhizobia* associés à *Ononis Repens* : une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens ; Généralités sur les *Rhizobiums* ; P19.
 - **Dreyfus B., Garcia J. L., et Gillis M.** (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 89-98.

Références bibliographiques

- **Drouineau G.** (1942). Dosage rapide du calcaire actif des sols. Nouvelles données sur la répartition et la nature des fractions calcaires. *Annales Agron.* (Nouvelle série) **12**: 44 1-450 pp.
- **Duhoux E., et Nicole M.** (2004) .Biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes. Atlas, Dunod, Paris, 166p.
- **Duke J.A.** (1981). Handbook legumes of world economic importance Ed .Plenum press, New-York and London, 25p.
- **Dupuy N., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Vandenbruaene I., Maestrojuan G., Dreyfus B., Kersters K., Collins M. D., and Gillis M.** (1994). Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 461-473.
- **Elkan G. H.** (1992) .Taxonomy of rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology*, **38**: 446-450 pp.
- **Farouk A., Salih and Abdallah El Mubarak Ali** (1986). Effect of phosphorus application and time of harvest on the seed yield and quality of faba bean. *FABIS Newsletter* 15: 32-35.
- **Frank B.** (1879). Über die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen. *Bot. Zeitung.* **24**, 377-388.
- **Frank B.** (1889). Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **7**: 332–346 pp.
- **Fred E. B., Baldwin I. L., and McCoy E.** (1932). Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison, Wis. (in: Elkan, 1992).
- **Foucher F et Kondorosi E.** (2000).Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*.*Plant Mol Biol.* **43**: 773-786.
- **Fujikake H., Yamazaki O., Ohtake T., Sueyoshi K., Matsuhashi S., Ito T., Mizuniwa C., Kume T., Hashimoto S., Ishioka N. S., Watanabe S., Osa A., Sekine T., Uchida H., Tsuji A., Ohyama T.** (2003). Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 386 : 1379-1388.
- **Gage D.J.** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.***68**: 280-300.
- **Gage DJ et Margolin W** (2000) Hanging by a thread: invasion of legume plants by *Rhizobia*. *Curr Opin Microbiol.* **3**: 613-617.

Références bibliographiques

- **Gagnard J., Huguet C. et Ryser J.P.** (1988). l'analyse du sol et du végétal dans la conduite de la fertilisation, le contrôle de la qualité des fruits. Secrétariat générale OILB/SROP, Edition - Diffusion ACTA., 87 P.
- **Gao J.L., Turner S. L., Kan F. L., Wang E. T., Tan Z. Y., Qiu Y. H., Gul J., Terefework Z., Young J. P. W., Lindström K., et Chen W. X.** (2004) *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54 (6): 2003-2012.
- **García-Fraile P., Rivas R., Willems A., Peix A., Martens M., Martínez-Molina¹ E., Mateos P. F., et Velázquez E.** (2007). *Rhizobium cellulosityticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 844-848.
- **Garg N., Geetanjali.** (2007). Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signalling: a review, *Agron. Sustain. Dev.* 27,59–68.
- **Garrity G. M., Bell J. A., and Lilburn T. G.** (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition.
- **Gaur Y.D., Sen A.N.** (1979) .Cross inoculation group specificity in *Cicer Rhizobium* symbiosis, *New Phytol.* **83** :745–754.
- **Ghosh W., et Roy P.** (2006). *Mesorhizobium thiogangeticum* sp; nov., a novel sulphur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *Int. J; Syst. Evol. Microbiol.*, 56(1): 91-97.
- **Giller K. E., McGrath S. P., and Hirsch P. R.** (1989). Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy meatal is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biol. Biochem.* **21**, 841-848.
- **Giller E. K., Witter E., and Mc Grath S. P.** (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soil: a review. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 1389-1414.
- **Girrard C.** (1985). L'installation du pois chiche de printemps. In - Bulletin FNAMS semences : 25-27.
- **Gobat J.M., Aragnot M., Matthey W.** (1998). Le sol vivant. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, collection « Gérer l'environnement » 14 : 521.
- **Gordon A.J., Skot L., James C.L., Minchin F.R.** (2002). Short-term metabolic responses of soybean root nodules to nitrate. *Journal of Experimental Botany*, 53,368 :423-428.

Références bibliographiques

- **Graham P. H., Sadowsky M. J., Kersters H. H., Barnet Y. M., Bradley R. S., Cooper J. E., De Ley D. J., Jarvis B. D. W., Roslycky E. B., Strijdom B. W., and Young J. P. W.** (1991). Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 582-587.
- **Graham P. H.** (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**, 475-484.
- **Graham P. H., Draeger K., Ferrey M. L., Conroy M. J., Hammer B. E., Martinez E., Naarons S. R., and Quinto C.** (1994). Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.* **40**, 198-207.
- **Graham P.H ., et Vance C.P.**(2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* **131**: 872-877.
- **Gusmão-Lima A. I., Figueira E., de Almeida M. P., and Pereira S. I. A.** (2005). Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxifying agent. *Can. J. Microbiol.* **51**, 7-14.
- **Hafeez F.Y., Aslam Z., Malik K.A.** (1988). Effect of salinity and inoculation on growth , nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vicia radiata* L. Wilczek. *Plant Water deficits. Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**, 163-203.
- **Halitim A.** (1973). Etude expérimentale des sols sodiques d'Algérie en vue de leur mise en culture. Thèse de 3° cycle. Université de Rennes, 176p.
- **Hameed S., Yasmin S., Malik K.A., Zafar Y., and Hafeez F.Y.** (2004). *Rhizibium, Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes. *Biology and fertility of soils* **39**(3), 179-185.
- **Hameed S., Mubeen F., Malik K.A and Hafeez F.Y.** (2005). Nodule co-occupancy of *Agrobacterium* and *Bradyrhizobium* with potential benefit to legum host. In : Wang, Y.P., Lin M., Tian Z.X., Elmerich C and Newton W.E (eds) *Biological Nitrogen Fixation*.
- **Hamon M., Pellerin F., Guernet M., Mahusier G.** (2002). *Chimie analytique TOME 3. Méthode spectrale et analyse organique .2°Edition*
- **Handberg K et Stougaard J.** (1992). *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.***2**: 487-496.
- **Hardy R.W.F., Havelka U.D.** (1975). Photosynthate as a major factor limiting N₂ fixation by field grown legumes with emphasis on soybean. 421-439. In : Nutman, P.,

Références bibliographiques

- Symbiotique nitrogen fixation in plants, IBP series, Vol 7, Cambridge University press, Londres.
- **Hartwig U.A.** (1998) .The regulation of symbiotique N₂ fixation : a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 1 :92-120.
 - **Heckman M.O., et Drevon J.J.** (1987). Nitrate metabolism in soybean root nodules. *Plant Physiol.* 69 :721-25.
 - **Hellriegel H., and Wilfarth H.** (1988). Untersuchungen über die stickstoffnahrung der gramineon und leguminosen. Beilageheft zu der ztschr. Ver Rübenzucker – Industrie Deutschen Reichs.
 - **Hernandez B. S., and Focht D. D.** (1984). Invalidity of the concept of slow growth and alkali production in cowpea rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 206-210.
 - **Hernandez-Luca L., Segovia L., Martinez-Romero E., et Pueppke S.G.** (1995). Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. That nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2775-2779.
 - **Hirsch A. M.** (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* **122**, 211-237.
 - **Hirsch A. M., Lum M. R., and Downie J. A.** (2001). What makes the Rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* **127**, 1484-1492.
 - **Howieson J.G., Hara O.G.W., Carr S.J.** (2000). Changing roles for legumes in Mediterranean agriculture: Developments from an Australian perspective. *Field Crop Res* 65:107–122.
 - **Hungria M., Vargas M.A.T.** (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crop Res* 65:151–164.
 - **Ibekwe A. M., Angle J. S., Chaney R. L., and Vonberkum P.** (1997). Enumeration and nitrogen fixation potential of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* grown in soil with varying pH values and heavy metal concentrations. *Agric. Ecosyst. Environ.* **61**, 103-111.
 - **Içgen B., O' zcengiz G., Gu'rdal Alaeddinoglu. N.** (2002) Evaluation of symbiotic effectiveness of various *Rhizobium cicer* strains. *Res Microbiol* 153:369–372.
 - **Iqbal A., Ateeq N., Khalil I.A., Perveen S., Saleemullah S.** (2006). Physicochemical characteristics and amino acid profile of chickpea cultivars grown in Pakistan. *J. Foodservice.* 17: 94-101.

Références bibliographiques

- **Irekli H.** (1989). Influence des nitrates sur la fixation symbiotique de l'azote chez le pois chiche (*Cicer arietinum*.L). Thèse d'Ing. I.N.A. Alger.
- **Jackson T. L., Vacharotayan S., Alban L.A., Peterson R.** (1964). Phosphorus availability in reddish brown lateritic soils. II. Relationships between field, greenhouse and soil analyses. *Agron. J.*, 56, no 6, pp. 558 - 560.
- **Jamet Alexandre., Samuel Sigaud., Ghislaine Van de Sype., Alain Puppo., et Didier Herouart** (2003). Expression of the Bacterial Catalase Genes During *Sinorhizobium meliloti* – *Medicago sativa* Symbiosis and Their Crucial Role During the Infection Process *.MPMI* Vol. 16, No. 3, pp. 217–225.
- **Jamet Alexandre., Karine Mandon., Alain Puppo., et Didier Herouart.** (2007). H₂O₂ is required for an optimal establishment of the *Medicago* / *Sinorhizobium meliloti* symbiosis *JB Accepts* ; (non publie).
- **Jarvis B. D. W., Mc lean T. S., Robertson I. G. C., and Fanning G. R.** (1977). Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand J. Agric. Res.* **20**, 42-52.
- **Jarvis B. D. W., Pankhurst C. E., et Patel J. J.** (1982). *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32: 378-380.
- **Jarvis B.D.W., van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M., Fernandez M.P., Cleyet-Marel J.C., Gillis M.** (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mezorhizobium* gen. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47** : 895–898 .
- **Jebara M, Aouani M, Payre H, Drevon JJ** (2005) Nodule conductance varied among common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes under phosphorus deficiency. *Journal of Plant Physiology* 162, 309-315.
- **Jessop R.S., Hetherington S.J., Houlst E.H.** (1984). The effect of soil nitrate on the growth, nodulation and nitrogen fixation of chickpea (*Cicer arietinum*.L) Plant and soil, 82 :205-214 .
- **John Mendham ., Arthur Israel Vogel ., Denney R.C.** (2005) Analyse chimique quantitative de VOGEL. Traduction et révision scientifique de la 6° Edition anglaise par Jean Toullec et Monique Mottet.
- **Johnson A. C., and Wood M.** (1990). DNA: a possible site of action of aluminium in *Rhizobium* spp. *Appl. & Environ. Microbiol.* **26**, 3629-3633.

Références bibliographiques

- **Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E and Walker G.C** (2007). How rhizobial symbionts invade plants : the Sinorhizobium- Medicago model. *Science* 308 67-71.
- **Jordan D.C.** (1982). Transfer of *rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants, *Int. J. Syst.Bacteriol.* 32, 136-139.
- **Jordan D. C.** (1984). International committee on systematic bacteriology. Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**: 248 p.
- **Josey D. P., Beynon J., Jonston A. W. B., and Beringer J. E.** (1979). Strain identification of *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. Appl. Bacteriol.* **46**, 343-350.
- **Jourand P., Giraud E., Béna G., Sy A., Willems A., Gillis M., Dreyfus B., et de Lajudie P.** (2004). *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic , facultatively methylotrophic legume root-nodule-forming and nitrogen- fixing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 2269-2273.
- **Kape R., Parniske M., et Werner D.** (1991) .Chemotaxis and nod Gene Activity of *Bradyrhizobium japonicum* in Response To Hydroxycinnamic Acids And Isoflavonoids. *Appl Environ Microbiol.* **57**: 316-319.
- **Keating J. D. H., et Cooper P. J .M .** (1983). Physiological and moisture use studies on growth and development of winter sown chickpeas *Ascochyta blight* and winter sowing of chickpea. *Rev. World crops* n° 9 : 141-157.
- **Kingsley M.T., Ben Bohlool B.** (1983) .Characterization of *Rhizobium* sp. *Cicer arietinum* L. by immunofluorescence, immunodiffusion and intrinsic antibiotic resistance, *Can. J. Microbiol.* **29** : 518–526.
- **Kinkle B. K., Angle J. S., and Keyser H. H.** (1987). Long-term effects of metal-rich sewage sludge application on soil populations of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 315-319.
- **Kirchner O.** (1896) .Die Wurzelknollchen der Sojabohne. *Beutr. Biol. Pflanz.*, 7: 213-224.
- **Kondorosi E., et Kondorosi A** (2000).Control of root nodule organogenesis. In *Prokaryotic nitrogen fixation : a model system for the analysis of a biological process.* Triplett, EW (ed) Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- **Kulkarni S., Surange S., et Nautiyal C. S.** (2000). Crossing the limits of *Rhizobium* existence in extreme conditions. *Curr. Microbiol.* **41**: 402-409 pp.

Références bibliographiques

- **Kurdali F** (1996). Nitrogen and phosphorus assimilation, mobilisation and partitioning in rainfed chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research* 47: 81-92.
- **Kuykendall L. M., Saxena B., Devine T. E., et Udell S. E.** (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp.nov. *Can. J. Microbiol.*, 38: 501-503.
- **Kyei-Boahen S., Slinkard A.E., Walley F.L.** (2002). Legumes: evaluation of rhizobial inoculation methods for chickpea. *Agron J* 94:851–859 .
- **Lakshmi- Kumari M., Singh C.S., Subba Rao N.S.** (1974). Root hair infection and nodulation in luzerne (*Medicago sativa* .L) As influenced by salinity and alkalinity. *Plant Soil* 40, 261-268.
- **Lal B., khanna S.** (1993). selection of salt tolerant Rhizobium isolates of *Acacia nilotica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10: 637-639 pp.
- **Lanza M., Bella M., Priolo A., Fasone V.** (2003). Peas (*Pisum sativum* L.) as an alternative protein source in lamb diets: growth performances, and carcass and meat quality. *Small. Rum. Res.* 47: 63-68.
- **Laranjo M., Branco C., Soares R., Alho L., Carvalho M.D., Oliveira S.** (2002) Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *J Appl Microbiol* 92:1043–1050.
- **Latimore M., Gidden J.J., Ashlex D.A** (1977). Effect of ammonium and nitrate nitrogen upon photosynthetic supply and nitrogen fixation by soybean. *Crop Science* 17,399-404.
- **Laumont P et Chevassus A.** (1956A). Note sur l'amélioration du pois chiche en Algérie. *Ann. Ins. Agr. et des services de recherches et d'expérimentation agricoles de l'Algérie.* Tome X, Fasc. 2, Juil. 1956. 24p.
- **Laumont P et Chevassus A.** (1956B). Vues sur les possibilités d'amélioration de la production vivrière en milieu traditionnel et en culture sèche. *Ann. Ins. Agr et des services de recherches et d'expérimentation agricoles de l'Algérie.* Tome X, Fasc. 3, Juil. 1956. 31p.
- **Lebereton J.C ., Le graet S., Rocton L., Siron J., Rigaud P.J., Pierre P** (2004). La fertilisation Phospho - Potassique. *Chambre d'agriculture moyenne.*
- **Lee H.S., Copeland L** (1994). Ultrastructure of chickpea nodules. *Protoplasma* 182 : 32-38.

Références bibliographiques

- **Le Rudulier D., Bernard T., Pocard G.A., Goas G.** (1983). Accroissement de l'osmotolérance chez *Rhizobium meliloti* par la glycine bêtaïne et la proline bêtaïne. C. R. Acad. Sc ., 279, 155-160.
- **Lewis D.C. and Hawthorne W.A** (1996). Critical plant and seed concentrations of phosphorus and zinc for predicting response of faba beans (*Vicia faba*). Australian Journal of Experimental Agriculture. 36: 479-84.
- **Lindström K.** (1989). *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol., 39: 365-367.
- **Lloret L., Ormeno-Orrillo E., Rincon R., Martinez-Romero J., Rogel-Hernandez M., Antonio et Martinez-Romero E.** (2007). *Ensifer mexicanum* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico' instead of '*Sinorhizobium mexicanum* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico Syst. Appl. Microbiol.
- **Lohnis F., and Hansen R.** (1921). Nodule bacteria of leguminous plants. *J. Agr. Res.* 20,543-546.
- **Long S. R., and Staskawicz B. J.** (1993). Cell 73, 921-935.
- **Lortet G., Mear N., Lorquin J., Dreyfus B., de Lajudie P., Rosenberg C., et Boivin C.** (1996) .Nod factor thin-layer chromatography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains: application to *Sinorhizobium saheli*, *S. teranga* and *Rhizobium* sp. strains isolated from *Acacia* and *Sesbania*. Mol. Plant-Microb Interact.,9: 736-747.
- **Maatallah J., Berraho E.B., Munoz S., Sanjuan J., Lluch C.** (2002). Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. J Appl Microbiol 93:531–540.
- **Mantelin S., Fischer-Le Saux M., Zakhia F., Béna G., Jeder H., de Lajudie P., Cleyet-Marel J. C.** (2006). Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated to plant roots *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov. *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov. *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. And *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56: 827-839.
- **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(3): 417–426 pp.

Références bibliographiques

- **Mateos P.F., Baker D.L., Petersen M., Velázquez E., Jiménez- Zurdo J.I., Martínez-Molina E., Squartini A., Orgambide G., Hubbell D.H et Dazzo F.B.** (2001). Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the Rhizobium-legume symbiosis. *Can J Microbiol.* **47**: 475-487.
- **Merabet C.** (2002). Caractérisation des *Rhizobiums* isolées d'une région salée dans l'Ouest d'Algérie: Sebkha de Misserghim. Thèse de Magistère. Univ d'Oran. Es Senia.
- **Messiaen C.M ., Blancard D., Rouxel F., Lafon R** (1993). Les maladies des plantes maraichères. INRA.
- **Mhadhbi, H. et al.** (2004). *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 717–722.
- **Moreira F. M. S., Gillis M., Pot B., Kersters K., and Franco A. A.** (1993). Characterisation of rhizobia isolated from different groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 135-146.
- **Moreira M. S., Cruz L., Miana de Faria S., Marsh T., Martinez-Romero E., de Oliveira Pedrosa F., Maria Pitard R., et Young P. W.** (2006). *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Syst. Appl. Microbiol.*, 29(3):197-206.
- **Moulin L., Munive A., Dreyfus B., et Boivin-Masson C.** (2001). Nodulation of legumes by members of the b subclass of Proteobacteria. *Nat.*, 411: 948-950.
- **Mpepereki S., Makonese F., Wollum A.G.** (1997). Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils, *Symbiosis* **22** :275–292.
- **Mrabet M., Mhamdi R., Laguerre G., Tiwari R., Aouani M.E.** (2004). Colonisation of *Phaseolus vulgaris* nodules by Agrobacterium-like strains. *Can J Microbiol.* **51** (2), 105-111.
- **Naghavi M. R., Jahansou M. R.** (2005). Variation in the agronomic and morphological traits of Iranian chickpea accessions. *J. Integr. Plant. Biol.* **47**(3): 375-379.
- **Maheri-Sis1 N ., Mohammad Chamani1, Ali-Asghar Sadeghi1, Ali Mirza- Aghazadeh and Abolfazl Aghajanzadeh-Golshani** .(2008). Department of Animal science, Islamic Azad University- Science and Research Branch, Tehran, Iran.
- **Munns D. N. and Mosse B** (1980). Mineral nutrition of legume crops. in *Advances in Legume Science* (Summerfield, R.J. and Bunting, A. H., eds). HMSO, London, UK. pp: 115-125.

Références bibliographiques

- **Ndoye I., Gueye M., Danso S. K. A., Dreyfus B.** (1995). Nitrogen fixation in *Faidherbia albida*, *Acacia raddiana*, *Acacia senegal*, *Acacia seyal* estimated using the N15 isotope dilution technique. *Plant. Soil*, **172**: 175-180 pp.
- **Neo H. H., Layzell D. B.** (1997). Phloem glutamine and the regulation of O₂ diffusion in legume nodules. *Plant Physiology*, **113** :259-267.
- **Ngom A., Nakagawa Y., Sawada H., Tsukahara J., Wakabayashi S., Uchiumi T., Nuntagij A., Kotepong S., Suzuki A., Higashi S., et Abe M.** (2004). A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the Ochrobactrom clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **50** (1): 17-27.
- **Nick G., de Lajudie P., Eardly B. D., Suomalainen S., Paulin L., Zhang X., Gillis M., et Lindström K.** (1999). *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**:1359-1368.
- **Nocker A., Hausherr T., Balsiger S., Krstulovic N.P., Hennecke H., Narberhaus F.** (2001). A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes. *Nucl Acids Res* **29**:4800–4807.
- **Norris D. P.** (1965). *Rhizobium* relationships in legumes. *Proc. 9th Int. Grassl. Congr. Sao Paulo*. **2**, 1087-1092.
- **Nour S.M., Cleyet-Marel J.C., Beck D., Effosse A., Fernandez M.P.** (1994). Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can J Microbiol* **40**:345–354.
- **Nour S.M., Cleyet-Marel J.C., Beck D., Effosse A., Fernandez M.P.** (1994a). Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Can. J. Microbiol.* **40** : 345–354.
- **Nour S.M., Fernandez M.P., Normand P., Cleyet-Marel J.C.** (1994b). *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.), *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:511–522.
- **Nour S.M., Cleyet-Marel J.C., Normand P., Fernandez M.P.** (1995). Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**:640–648.
- **Obaton M.** (1983). Généralité sur la symbiose fixatrice d'azote: *Rhizobium-légumineuses*. Rome: FAO. 4p.

Références bibliographiques

- **Obbard J. P., Sauerbeck D. R., and Jones K. C.** (1994). The effect of heavy metalcontaminated sewage sludge on the rhizobial soil population of an agricultural field trial, p. 127-161. In M. H. Donker, H. Eijsackers, and F. Heimback (ed.), *Ecotoxicology of soil organisms*. Lewis Publishers, London, United Kingdom.
- **Octive J. C., Johnson A., and Wood M.** (1994). Effects of previous aluminium exposure on motility and nodulation by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Soil Biol. & Biochem.* **26**, 1477-1482.
- **Odee D. W., Sutherland J. M., Makatiani E. T., Mc Inroy S. G., and Sprent J. I.** (1997). Phenotypic characteristics and composition of the rhizobia associate with woody legumes growing in diverse Kanyen conditions. *Plant & Soil.* **188** : 65-75.
- **Ogasawa M., Suzuki T., Mutoh I., Annapurna K., Arora N. K., Nishimura Y., et Maheshwari D. K.** (2003). *Sinorhizobium indiaense* sp. nov. and *Sinorhizobium abri* sp. nov. isolated from tropical legumes, *Sesbania rostrata* and *Abrus precatorius*, respectively. *Symbiosis*, 34 (1) : 53-68.
- **O'hara G., Boonkerd N., Dil-Worth M.J.** (1988). Mineral constraints to nitrogen fixation. *Plant and Soil*, 108,93-110.
- **Orphanos P. I** (1995). Future direction of phosphate fertilization in the Mediterranean Area. In: Accomplishments and future challenges in dryland soil fertility research in the Mediterranean Area. Ed. John Ryan, ICARDA. pp: 147-153.
- **Ounane S.M., Djebara M., Ghalmi N., Benmohamed A., Bekki A., Nouar S.** (2006). Effet du nitrate exogène sur la nodulation et la fixation de l'azote chez le ppois chiche (*Cicer arietinum*.L).
- **Parson R., Stanforth A., Raven J.A., Sprent J.I** .(1993) . Nodule growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. *Plant, Cell and Environement*, 16 :125-136.
- **Pate J.S., Minchin F.R.** (1980). Comparative studies of carbon and nitrogen nutrition of selected grain legumes.105-114.in *Advences in legume Science*.
- **Patriarca E.J., Tatè R., Ferraioli S., et Iaccarino M.** (2004). Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol.* **234**: 201-262.
- **Pelmont J.** (1993) Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques, 899 p.
- **Peoples M. B., Craswell E. T.** (1992). Biological nitrogen fixation : Investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil*, 141,13-39.

Références bibliographiques

- **Perret X., Staehelin C., et Broughton W.J.** (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**: 180-201.
- **Plancquaert P.H ., et Wery J.** (1991). Le pois chiche- Culture et utilisation. Brochure Ed. ITCF Paris France 1991, 11p.
- **Priefer U.B., Aurag J., Boesten B., Bouhmouch I., Defez R., Filali- Maltouf A., Miklis M., Moawad H., Mouhsine B., Prell J., Schlüter A., Senatore B.** (2001). Characterisation of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. *J Biotechnol* **91**:223–236.
- **Prin Y., Galiana A., Ducouso M., Dupuy N., de Lajudie P., Neyra M.** (1993). Les rhizobiums d'acacia : Biodiversité et taxonomie. *Bois et Forêts des Tropiques*, **238**, 5-20.
- **Purchase D., Miles R. J., and Young T. W. K.** (1997). Cadmium uptake and nitrogen fixing ability in heavy-metal resistant laboratory and field strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**, 85-93.
- **Quan Z. X., Bac H. S., Back J. H., Chen W. F., Im W. T., et Lee S. T.** (2005). *Rhizobium daejeonense* sp. nov., isolated from a cyanide treatment bioreactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**: 2543-2549.
- **Radeva G., Jurgens G., Niemi M., Nick G., Suominen L., et Lindström K.** (2001). Description of two biovars in the *Rhizobium galegae* species: biovar *orientalis* and biovar *officinalis*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **24**: 192-205.
- **Rai R.** (1983). The salt tolerance of *Rhizobium* strains and lentil genotypes and the effect of salinity on aspects of symbiotic N-fixation. *J.Agric. S.C., Cambridge*, **100**, 81-86.
- **Rai R., Nasar S.K.T., Singh S.G., Prasad V.** (1985). Interactions between *Rhizobium* strains and lentil (*Lens culinaris*) genotype under salt stress, *J. Agric. Sci., Cambridge*, **104**, 199-205.
- **Rainbird R. M., Atkins C. A., Pate J. S.** (1983). Effect of temperature on nitrogenase functioning in cowpea nodules. *Plant Physiol* **73**:392–394.
- **Ramu Senthil K., Hui-Mei Peng., et Douglas R. Cook.** (2002). Nod Factor Induction of Reactive Oxygen Species Production Is Correlated with Expression of the Early Nodulin Gene *rip1* in *Medicago truncatula* *MPMI* Vol. **15**, No. **6**, pp. 522–528.
- **Rao D. L. N., Giller K. E., Yeo A. R., Flowers T. J.** (2002). The effects of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*) *Ann. Bot.* **89**:563-570.

Références bibliographiques

- **Rawsthorne S., Hardy F., Summerfield R. J., Roberts E. H.** (1985). Effet of supplemental nitrate and of chickpea (*Cicer arietinum*).II. symbiotique développement and nitrogen assimilation. plant and soil. 83 :279-293.
- **Redden R. J., and Berger J. D.** (2007). History and origin of chickpea. In ;Yadav.S.S., Redden.R.J.,Chen.W.,Sharma.B., editors. Chickpea breeding and management. CAB international, Walling ford, .U.K., 1:1-13.
- **Reddy G. B., Cheng C. N., and Dunn S. J.** (1983). Survival of *Rhizobium japonicum* in sludge environment. *Soil Biol. Biochem.* **15**, 343-345.
- **Riguad J., Puppo A.** (1977). Effect of nitrite upon leghemoglobin and interaction with nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 497 :702-706.
- **Rinaudo G., Orenga S., Fernandez M., Meugnier H., et Bardin R.** (1991). DNA homologies among members of the genus Azorhizobium and other stem and root nodulating bacteria isolated from the tropical legume Sesbania rostrata. *Int. J. Syst.Bacteriol.*, 41 : 114-120.
- **Rivas R., Willems A., Subba-Rao N., Mateos P. F., Dazzo F. B., Martinez-Molina E., Gillis M., et Velázquez E.** (2003). Description of *Devosia neptunia* sp. nov., that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst. Appl. Microbiol.*, 26: 47-53.
- **Rivas R., Willems A., Palomo J. L., Garcia-Benavides P., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Gillis M., et Velázquez E.** (2004). *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int. J. syst. Evol.Microbiol.*, 54 (4): 1271-1275.
- **Rome S., Fernandez M. P., Brunel B., Normand P., et Cleyet-Marel J.C.** (1996) *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago spp.* *Int. J. Syst.Bacteriol.*, 46:972-980.
- **Roughley R. J., Wahab F. A., and Sundram J.** (1992). Intrinsic resistance to streptomycin and spectinomycin among root-nodule bacteria from Malaysian soils. *Soil Biol. Biochem.* **24**,715-716.
- **Rouiller J., Souchier B., Bruckert S., Feller C., Toutain F. et Védry J. C.** (1994). Méthodes d'analyses des sols. 619–652 pp. In : M. Bonneau et B. Souchier, eds. *Pédologie. 2. Constituants et propriétés du sol*. Masson, Paris, France.

Références bibliographiques

- **Sadiki M., et Halila H.** (1997). Les ressources génétiques des légumineuses à graines et leur utilisation dans les pays du pour tour méditerranéen. Colloque de l'INRA France n°8. P : 33-64.
- **Santos Renata., Didier Herouart., Samuel Sigaud., Daniele Touati., et Alain Puppo.** (2001). Oxidative Burst in Alfalfa- *Sinorhizobium meliloti* Symbiotic Interaction *MPMI* Vol. 14, No. 1, pp. 86–89.
- **Sawada Y., Miyashita K., and Yokoyama T.** (1990). Diversity within serogroups of Japanese isolates of *Bradyrhizobium* as indicated by intrinsic antibiotic resistance. *Soil Sci. Plant Nutr.* **30**, 501-504.
- **Saxena M.C.** (1987): Agronomy of chickpea. Pages 207-232 in SAXENA, M.C. and SINGH, K.B. (1987): Prospects for chickpea Oxon, U.K. Cece in Italia (Crino, P., ed.). Atti della Giornata tenutasi presso il The Chickpea.
- **Schachtman D. P., Reid J. R. and S. M. Ayling** (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* **116**: 447-453.
- **Scholla M. H., and G. H. Elkan.** (1984). *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast growing species that effectively nodulates soybean. *Int. J. System. Bact.* **34**, 484-486.
- **Schut P.** (2001). *Rhizobia*. 2p. www.microbiologyonline.org.uk.
- **Segovia L., Young J. P. W. and Mart'inez-Romero E.** (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **43**(2): 374–377 pp.
- **Serraj R., Drevon J.J., Obaton M, Vidal A.** (1992). Variation in nitrate tolerance of nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) *Bradyrhizobium* symbiosis. *J. Plant Physiol.*, **140**, 366-71.
- **Serraj R.** (2002) .Response of symbiotic nitrogen fixation to drought and salinity stresses. *Physiol. Mol. Biol.* **8**:77-86.
- **Sherwood J. E., Truchet G. L., and Dazzo F. B.** (1984). Effect of nitrate supply on the in vivo synthesis and distribution of trifoliin A, a *Rhizobium trifolii*-binding lectin, in *Trifolium repens* seedlings. *Planta.* **126**, 540-547.
- **Shishido M., and Pepper. I. L.** (1990). Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Biol. Biochem.* **22**, 11-16.

Références bibliographiques

- **Siddique K. H. M., Loss S. P., Regan K. L., Jettner R. L.** (1999). Adaptation and seed yield of cool season grain legumes in Mediterranean environments of south-western Australia. *Aust J Agric Res* 50:375–387.
- **Singh G., and Bhushan L. S.** (1979). Water use, water – use efficiency and yield of dryland chickpea as influenced by P fertilization, stored soil water and crop season rainfall. *Agric. Water Manag.* 2: 299 – 305.
- **Singleton P.W., Bohlool B.B.** (1984). Effect of salinity on nodule formation by soybean. *Plant Physiol.* 74, 72-76.
- **Singleton P.W., Tavares J.W.** (1986). Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* populations. *Appl Environ Microbiol* 51:1013–1018.
- **Skrypetz S.** (2006). Analyse des légumineuses et culture spéciales: le bulletin bimensuel. *Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC)*. Volume 19 numéro 13.
- **Soltner D.** (2005). Les bases de la production végétale. Tome I (le sol et son amélioration). Collection sciences et techniques agricoles. 24ème ed. p.
- **Somasegaran P., and Hoben H. J.** (1985). Methods in legume-*Rhizobium* technology, pp. 128-138. University of Hawaii, Honolulu.
- **Somasegaran P., Hoben H. J.** (1994). Handbook for rhizobia. New York: Springer-Verlag
- **Soussi M., Lluch C., Ocana A.** (1999). Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. *J. Exp. Bot.* 50:1701-1708.
- **Squartini A., Struffi P., Doring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P.F., Martinez-Molina E., Dazzo F.B., Casella S., et Nuti M. P.** (2002). *Rhizobium sullae* sp. nov. (Formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52 (PT 4) : 1267-1276.
- **Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J., et May G. D.** (2006). Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol.* 9: 110-121.
- **Stowers M.D.** (1985). Carbon metabolism in *Rhizobium* species, *Annu. Rev. Microbiol.* 39 89–108.

Références bibliographiques

- **Sttit M ., Krapp A.**(1999) . The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition : the physiological and molecular background. *Plant cell and environnement*, 22, 583-621.
- **Subba Rao N.S., Lakshami M., Magu S.P.** (1972). Nodulation of luzerne (*Medicago sativa* L.). *Indian J. Agric. Sci .*, 42, 384-386.
- **Summerfield R. J., Minchin F. R., Roberts E. H., et Hadley P.** (1979). The effects of photoperiod and air temperature on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L). *Proceedings international workshop on chickpea improvement*. Ed. ICRISAT (international center for agricultural research in the dry areas):121-144.
- **Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., de Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C., et Dreyfus B.** (2001). Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J.Bacteriol.*, 183:214 -220.
- **Tan Z. Y., Kan F. L., Peng G. X., Wang E. T., Reinholdt-Hurek B., et Chen W. X.** (2001). *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 909-914.
- **Tang C ., Hinsinger P., Drevon J. J., Jaillard B.** (2001a). Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton release in roots of *Medicago truncatula* L. *Annals of Botany* 88 (1): 131-138.
- **Tang C., Hinsinger P.h., Jaillard B., Rengel Z and Drevon J.J.** (2001b). Effect of phosphorus deficiency on growth, symbiotic N₂ fixation and proton release by two bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Agronomie* 21: 683-689.
- **Thies J. R., Bohlool B. B., Singleton P. W.** (1991). Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on fieldgrown legumes. *Appl Environ Microbiol* 57:19–28.
- **Tillard P., et Drevon J. J.** (1988). Nodulation and nitrogénase activity of chickpea cultivar INRA 199 inoculated with different strains of *Rhizobium ciceri*. *Agronomie*. 8: 387-392.
- **Tiller K., Merry R., and Mc Laughlin M.** (1994). Cadmium: a modern day problem. *Rural Research*. **162**, 32-35.
- **Toledo I., Lloret L., Martinez-Romero E.** (2003). *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. Appl.Microbiol.* 26, 54-64.

Références bibliographiques

- **Tong Z., and Sadowsky M. J.** (1994). A selective medium for the isolation and quantification of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* strains from soils and inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 581-586.
- **Toro N, Olivares J.** (1986). Analysis of *Rhizobium meliloti* Sym mutants obtained by heat-treatment. *Appl Environ Microbiol* 51:1148–1150 .
- **Trujillo M. E., Willems A., Abril A., Planchuelo A. M., Rivas R., Ludeña D., Mateos P. F., Martinez-Molina E., et Velázquez E.** (2005). Nodulation of *Lupinus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:1318-1327.
- **Trüper H. G., et de Clari L.** (1997). Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) in “apposition”. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 908-909.
- **Tu J.C.** (1981). Effect of salinity on *Rhizobium* –root hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Can .J.Plant Sci.*61, 231-9.
- **Turner S. L., Zhang X., Li F., et Young P. W.** (2002). What does bacterial genome sequence represent? Misassignment of MAFF 303099 to the genospecies *Mesorhizobium loti*. *Microbiology*, 148: 3330-3331.
- **Udvardi M. K ., Tabata S., Parniske M., et Stougaard J .**(2005). *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *TrendsPlant Sci.* **10**: 222-228.
- **USDA.** (2004). National nutrient database for standard reference, release 17. United States Departement of Agriculture, Agricultural research service, nutrient database laboratory, Beltsville Md, United states.
- **USDA.** (2008). Plant profile of *Cicer arietinum* (Chickpea). United States Departement of Agriculture (USDA), Naturel Resources Concervation Service (NRCS), Plant database.
- **Vail S.L** (2005). Population studies of *Ascochyta rabiei* on chickpea in Saskatchewan. Thesis of Master of Science. University of Saskatchewan Saskatoon.
- **Valverde A., Velázquez E., Gutierrez C., Cervantes E., Ventoza A., Igual J. M.** (2003). *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*.*Int.J.Syst.Evol.Microbiol*, 53(pt 6): 1979-83.
- **Valverde A., Velázquez E., Fernandez-Santos F., Vizeaino N., Rivas R., Gillis M., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Igual J. M., et Willams A.** (2005). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. Nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J.Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 1985-1989.

Références bibliographiques

- **Valverde A., Igual J. M., Peix A., Cervantes E., et Velázquez E.** (2006). *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. Int J Syst Evol Microbiol 56 (2006), 2631-2637.
- **Van Berkum P., Beyene D., Bao G. P., Campbell T. A., et Eardly B. D.** (1998). *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. International Journal of Systematic Bacteriology, 48:13-22.
- **Van Berkum P., et Eardly B. D.** (2002). The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. Appl. Environ. Microbiol., 68: 1132-1136.
- **Vandamme P., Goris J., Chen W. M., De Vos P., et Willems A.** (2003). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. Syst. Appl. Microbiol., 25: 507-512.
- **Vaneechoutte M., Kämpfer P., De Baere T., Falsen E., et Verschraegen G.** (2004). *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *syzygii* (Roberts et al., 1990) comb. nov. Int. J. System. Evol. Microbiol., 54: 317-327.
- **Van Rossum D., Schuurmans F.P., Gillis M., Muyotcha A., van Verseveld H.W., Stotthamer A.H., Boogerd F.C.** (1995). Genetic and phenotypic analysis of *Bradyrhizobium* strains nodulating Peanut (*Arachis hypogae* L.) roots, Appl. Environ. Microbiol. 61 :1599–1609.
- **Velázquez E., Igual J. M., Willems A., Fernández M. P., Muñoz E., Mateos P. F., Abril A., Toro N., Normand P., Cervantes E., Gillis M., et Martinez-Molina E.**(2001). Description of *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 1011-1021.
- **Verret F.** (1982). Etude de quelques légumineuses à gousses graines adaptées au semis de printemps dans la zone méditerranéenne. Mémoire D .A. A. ENSA Montpellier, 72p.
- **Villegas M. D. C., Rome S., Maure L. et al.** (2006). Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (bv. *laciniata*) of *S. meliloti*. Syst. Appl. Microbiol. In press.

Références bibliographiques

- **Vincent J. M.** (1970). A manual for the practical study of root-nodule bacteria, 73-97pp. In: International Biological Programme Handbook n°. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford.
- **Vincent J. M.** (1974). In Rezki. M. A. 1990.
- **Vincent J. M.** (1977). Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. In the biology of nitrogen fixation quispel. A. eds. North-holland. Amsterdam, 256-341 pp.
- **Vinuesa P., Silva C.** (2004). Species delineation and biogeography of symbiotic bacteria associated with cultivated and wild legumes. In: *Biological Resources and Migration* (ed. Werner D), pp. 143–155. Springer Verlag, Berlin.
- **Vinuesa P., Leon-Barrios M., Silva C., Willems A., Jarabo-Lorenzo A., Pérez-Galdona R., et Martinez-Romero E.** (2005c). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae : Genisteae) growing in the canary Islands, along with *B. japonicum* bv. *Genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies a and *Bradyrhizobium* genospecies b. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 569-575.
- **Viveros A., Brenes A., Elices R., Arija I., Canales R.** (2001). Nutritional value of raw and autoclaved *kabuli* and *desi* chickpeas (*Cicer arietinum* L.) for growing chickens. *Brit. Poult. Sci.* 42: 242- 251.
- **Wang E. T., Van Berkum P., Beyne D., Sui X. H., Dorado O., Chen W. X. et Martinez-Romero E.** (1998). *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galega*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 687-699.
- **Wang E. T., Rogel M. A., Garcia-de los Santos A., Martinez-Romero J., Cevallos M. A., et Martinez-Romero E.** (1999a). *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 1479-1491.
- **Wang E.T., Van Berkum P., Sui X. H., Beyne D., Chen W. X., et Martinez- Romero E.** (1999b). Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from chines soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 51-65.
- **Wang E. T., Tan Z. Y., Willems A., Fernandez-Lopez M., Reinhold-Hurek B., et Martinez-Romero E.** (2002). *Sinorhizobium morelense* sp. nov., isolated from *Leucaena leucocephala* that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int. J. Syst. Microbiol.*, 52:1687-1693.

Références bibliographiques

- **Wei G. H., Wang E. T., Tan Z. Y., Zhu M. E., et Chen W. X.** (2002). *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 2231-2239
- **Wei G. H., Tan Z. Y., Zhu M. E., Wang E. T., Hans S. Z., et Chen W. X.** (2003). Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 1575-1583.
- **Wery J.** (1986). Un pois pas si chiche que cela. *Bull. Fnam.s Sem.*, 97,32-35.
- **Wilson D. O., and H. M. Reisenauer.** (1970). Effect of Manganese and Zinc Ions on the Growth of *Rhizobium*. *J Bacteriol.* **102**, 729–732.
- **Wilson J. K.** (1944). Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. *Soil Sci.* **58**, 61-69.
- **Wilson J.R., Norris D.O.** (1970). Some effect of salinity on *Glycine max* and its *Rhizobium* symbiosis. *Proc. Inter. Grassland Congress*, 11, 455-458.
- **Wood S. M., et Newcomb W.** (1989). Nodule morphogenesis: the early infection of Alfalfa (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. *Can J Bot.* **67**: 3108- 3122.
- **Xu L. M., Ge C., Cui Z., Li J., and Fan H.** (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 706-711.
- **Yao Z. Y., Kan F. L., Wang E. T., Wei G. H., et Chen W. X.** (2002). Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, 52:2219-2230.
- **Youcef A.N., Sprent J. I.** (1983). Effets of Na Cl on growth, nitrogen incorporation and chemical composition of inoculated and NH_4NO_3 fertilized *Vicia faba* .L. *Plants.J.Exp.Bot.* 143, 941-950.
- **Young J. P. W., Downer H. L., et Eardly B. D.** (1991). Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* BTAIL by polymerase chain reaction based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.*, 173: 2271-2277.
- **Young J. M.** (2003). The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen *et al.* 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang *et al.* 2002 is a later synonym of *Ensifer* Casida 1982. Is the combination *Sinorhizobium adhaerens* (Casida

Références bibliographiques

- 1982) Willems *et al.*, 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 2107-2110.
- **Zahran H.H., Sprint J.I.** (1986). Effects of Sodium chloride and polyethylene glycol on root- hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 167, 303-309.
 - **Zahran H. H., Karsitol A. M., and Lindstroom K.** (1994). Alternation of lipopolysaccharides and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *Word J. Microbiol. Biotech.* **10**: 100-105 pp.
 - **Zahran H. H.** (1999). *Rhizobia-Legume* symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol and Molecular Biol. Rev.* **63** (4): 968-989 pp.
 - **Zakhia F., Jeder H., Dommergue O.** (2004b). Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-aride zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**: 380-395 pp.
 - **Zurkowski W.** (1982). Molecular mechanism for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. *J Bacteriol* 150:999–1007.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Analyses physicochimiques du sol

a. Analyse granulométrique :

La granulométrie a été déterminée par la méthode internationale à la pipette de Robinson.

- Dans un bécher de 600 ml, mettre 15g de terre fine séchée et tamisée.
- Ajouter 50 ml de l'eau oxygénée (H_2O_2) à 20 volumes.
- Recouvrir le bécher afin d'éviter les projections pendant la période de l'effervescence.
- Mettre le bécher sur un bain de sable dont la température ne dépasse pas 85°C

Si une ébullition trop forte se manifestait, l'eau oxygénée se décompose très rapidement. Si la terre est humifère l'effervescence peut produire une mousse abondante risquant de déborder, ce phénomène peut être évité en ajoutant quelques gouttes d'alcool éthylique.

A la fin d'effervescence, faucher pendant 2 h pour éliminer l' H_2O_2 en excès et terminer par 10 min d'ébullition (on peut accélérer l'élimination de l'excès d'eau oxygénée en ajoutant quelques gouttes d'ammoniaque).

- S'assurer que toute l'eau oxygénée a disparu en versant quelques gouttes du liquide chaud 60°C dans une solution de permanganate de potassium, en présence d'eau oxygénée le permanganate de potassium se décolore.
- Laisser refroidir puis transvaser à l'aide d'un jet de pissette dans un flacon de sédimentation à large ouverture et jaugé de 750 ml.
- Ajouter 15 ml d'hexaméthaphosphate de sodium 50 g/l. Cette solution alcaline a pour rôle de disperser les particules qui ont tendance à s'agglomérer.
- Compléter avec de l'eau déminéralisée jusqu'au trait de jauge 750 ml.
- Agiter le flacon durant une heure sur un agitateur magnétique.
- Porter le flacon à proximité de la pipette de Robinson qui doit être placée dans une pièce à température constante.

Pour le mélange des argiles, des limons fins et des limons grossiers :

- Maintenir la température à 20°C, agiter immédiatement par retournement répété de manière à mettre en suspension toute la terre.
- Laisser décompter pendant 20 secondes.
- Prélever au bout de 46 secondes, à 10 cm de profondeur 10 ml de liquide.
- Porter la capsule dans une étuve à dessiccation à température 105°C.
- Après évaporation totale, peser la capsule et son contenu sec.
- Par différence avec le poids de la capsule vide, déterminer le poids P1 de sédiment.

Annexes

(Argile + limons fins + limons grossiers + hexaméthaphosphate de sodium) contenu dans 10 ml de suspension.

Pour le mélange des argiles et des limons fins :

- Après agitation et retournement du liquide, laisser déposer durant 4 min.
- Effectuer le prélèvement de 10 ml à une profondeur de 10 cm après la sédimentation.
- Transvaser le prélèvement dans une capsule en verre pyrex.
- Faire évaporer puis peser la capsule.
- Par différence avec le poids de la capsule vide, déterminer le poids P2 du sédiment (Argile + limon fin + hexaméthaphosphate de sodium) contenu dans 10 ml de suspension.

Pour l'argile :

- Agiter et laisser sédimenter 8 h.
- Effectuer le prélèvement de 10 ml.
- Peser comme précédemment P3 (Argile + hexaméthaphosphate de sodium) dans 10 ml de suspension.
- Verser 15 ml d' hexaméthaphosphate de sodium dans un flacon gradué de 750 ml.
- Agiter puis faire un prélèvement à la pipette Robinson comme précédemment.
- Transvaser le prélèvement dans une capsule en verre pyrex.
- Faire évaporer puis peser la capsule et son contenu sec.
- Déterminer comme précédemment le poids correspondant à la surcharge en hexaméthaphosphate de sodium contenu dans 10 ml de suspension.
- D'après les pesées P1, P2, P3, calculer les taux des Argiles, limons fins et limons grossiers.
- Tamiser et peser les sables fins et sables grossiers, pour les sables grossiers utiliser un tamis de 200 μm et pour les sables fins un tamis de 50 μm .

b. Dosage du calcaire total :

- Déposer 1 g de sol séché à l'air, dans un flacon puis remplir l'appendice latérale du flacon avec 5 ml de HCl 0.5N, après avoir lié le flacon au calcimètre de Bernard amener au zéro les niveaux de l'eau dans la colonne et dans l'ampoule, verser l'acide sur l'échantillon, ensuite à l'aide de l'ampoule, rétablir le niveau et lire le volume de CO_2 dégagé (en cm^3), une fois le dégagement du CO_2 terminé, baisser l'ampoule du calcimètre jusqu'à ce que le niveau de cette dernière soit dans un même plan horizontal que celui dans

Annexes

la colonne, enfin déposer 1 g de CaCO_3 pur pour l'étalonnage de l'appareil tel qu'il provoque un dégagement gazeux.

c. Dosage du calcaire actif :

- Peser 10 g de sol séché à l'air, les introduire dans un flacon de 500 ml et y ajouter 250 ml de la solution d'oxalate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ à 0.2N, agiter durant 2 h, ensuite filtrer la solution en rejetant les premier ml du filtrat.
- Prélever 10 ml du filtrat qui sera versé dans un bécher de 100 ml, ajouter à ce dernier 10 ml de H_2SO_4 au 1/10, ensuite porter le contenu du bécher à une température de 60°C , puis placer le bécher sur un agitateur magnétique surmonter d'une burette graduée contenant le permanganate de potassium KMnO_4 en solution décimale, le titrage par le permanganate se fait jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistante, soit **n** le nombre de ml de KMnO_4 versé.
- Titrer de la même façon 10 ml de la solution d'oxalate d'ammonium utilisée, soit **N** le nombre de KMnO_4 versé pour le témoin.

d. Dosage du carbone total et de la matière organique :

- Utiliser un sol finement broyé et passé au tamis (0.2 mm).
- Peser 0.25 g de sol, introduire la prise dans un ballon pyrex avec réfrigérant ascendant,
- ajouter 10 ml de solution de bichromate à 8% et 15 ml d'acide sulfurique H_2SO_4 pure.
- Porter 5 min à l'ébullition douce.
- Laisser refroidir puis transvaser dans une fiole jaugée de 200 ml, laver trois fois à l'eau distillée, verser dans un bécher de 250 ml.
- Diluer à 200 ml.
- Ajouter 1.5g de fluorure de sodium (FNa) en poudre par ml d'acide sulfurique H_2SO_4 plus 3 à 4 gouttes de diphénylamine puis titrer l'excès de bichromate avec une solution de Mohr à 0.2N (la couleur passe du bleu foncé au bleu-vert).

Les calculs :

1g de bichromate 0.2N oxyde 0.615 mg de carbone (C)

Effectuer un témoin avec du sable stérile calciné, soit :

n : la quantité de sel de Mohr versée.

n' : la quantité de sel de Mohr correspondant à l'échantillon.

$$\text{C}\% = (\text{n} - \text{n}') \times 0.615 \times 100 / 1000$$

Pour obtenir le taux de la matière organique, multiplier C% par 1.72.

Annexes

e. Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldhal :

	Echantillon examiné		
	Teneur en Azote	Ordre de la grandeur de prise d'essai	Solution titrante
	Macrométhode.....	5 à 20 mg	500 mg
Semimicrométhode.....	0,5 à 4 mg	100mg	0.02 N
Microméthode.....	50à 50µg	< 10 mg	0.01 N

- Peser avec précision une partie du sol suffisante pour contenir environ 0.04 g d'azote et l'introduire dans une fiole de digestion de Kjeldhal à long col.

- Ajouter 0.7 g d'oxyde de mercure, 15 g de sulfate de potassium et 40 ml d'acide sulfurique concentré. Chauffer doucement la fiole en position légèrement inclinée. Il est probable que le contenu du récipient se mette à mousser, ce que l'on pourra empêcher en ajoutant un agent anti mousse. Quand la mousse a disparu, faire bouillir le mélange pendant 2 h. Après refroidissement, ajouter 200 ml d'eau et 25 ml d'une solution de thiosulfate de sodium à 0.5 mol/L.

- Bien mélanger, ajouter quelques granulés de pierre ponce (ou équivalent) et introduire doucement, au fond de la fiole, une quantité suffisante d'hydroxyde de sodium à 11 mol/L pour rendre le mélange fortement alcalin. (Environ 115 ml).

- Avant de mélanger les réactifs, relier la fiole à un appareil de distillation dont le tube de sortie plonge dans un volume connu d'acide chlorhydrique à 0.1 mol/L, juste au dessous de la surface. S'assurer que le contenu de la fiole s'est bien mélangé et porter à ébullition jusqu'à ce qu'au moins 150 ml du liquide aient été distillée. Ajouter l'indicateur rouge de méthyle à la solution d'acide chlorhydrique et titrer avec de l'hydroxyde de sodium à 0.1 mol/L (Volume d'agent titrant : *a* ml) .Effectuer un titrage à blanc sur un même volume d'acide chlorhydrique à 0.1 mol/l (Volume d'agent titrant : *b* ml)

- En prenant les quantités et les concentrations indiquées ci-dessus, on obtient le pourcentage d'azote dans l'échantillon par la formule suivante :

$$\frac{(b-a) \times 0.1 \times 14 \times 100}{\text{Masse de l'échantillon (g)}}$$

Annexes

On obtient un net changement de couleur en utilisant le mélange rouge de méthyle-vert de bromocrésol (préparé en mélangeant le rouge de méthyle à 0.2% dans l'éthanol et le vert de bromocrésol à 0.1% dans l'éthanol dans le rapport 1:3 en volume.

f. Dosage du phosphore assimilable :

Réactifs :

Réactif d'extraction

Bicarbonate de sodium 0,5 N }
Fluorure d'ammonium 0,5 N } pH 8,5

Bicarbonate de sodium HCO_3Na : PM 84,02 - Pas d'eau de cristallisation – Perd CO_2 à 270°C : 0,5 N = 42,01 g/l.

- Sécher une nuit à l'étuve (à basse température, sinon il y a risque de décomposition),
- Peser 42,01 g. de sel sec pour un litre de solution.
- Les introduire dans un bécher jaugé et dissoudre dans 900-950 ml d'eau distillée,

Fluorure d'ammonium FNH_4 : PM 37,04. Sel plus ou moins déliquescent, mais ne pouvant être séché à l'étuve, car il se sublime. 0,5 N = $37,04/2 = 18,52$ g /l.

- Peser 18,52 g. Les ajouter à la solution contenant déjà HCO_3Na .
- Porter le mélange sous pH mètre réglé à 8,5 au moyen d'un tampon de valeur la plus voisine possible.
- Ajuster le pH du mélange à pH 8,5 par addition de NaOH (2 N) ou par insufflation de gaz carbonique (environ 62 ml de soude pour un litre).
- Ajuster le volume à un litre.

Note : Solution à utiliser de préférence immédiatement après préparation. Ne pas stocker plus d'un mois, et alors toujours en flacon plastique, avec nouveau contrôle du pH au moment de l'emploi.

Extraction et purification de l'extrait :

1) Extraction

- Opérer sur 1 g. de sol broyé à 0,5 mm environ dans un mortier de porcelaine

Note : Etant donnée la "petitesse" de la prise, il y aura lieu, lors de la pesée :

- 1 - de bien homogénéiser le contenu de la boîte d'échantillon,
- 2 - de partir de 10 g. environ et de prélever en effectuant de nombreuses petites prises dans l'ensemble de l'échantillon ; broyer ces 10 g. avant la pesée de 1 g,

Annexes

- Introduire la prise dans un tube de centrifugeuse en nylon de 100 ml.
- Ajouter (jaugeur HERON ou pipette 1 trait) 50 ml de réactif d'extraction (mélange bicarbonate+ fluorure d'ammonium HCO_3Na et FNH_4 à pH 8, 5 à (0, 5 N) pour chaque sol).
- Boucher (bouchon caoutchouc).
- Agiter une heure sur agitateur va et vient.
- Déboucher (ne pas rincer le bouchon)
- Centrifuger énergiquement - 5 minutes à 4 500 tours/minute.
- Poser les tubes de centrifugeuse, sans les perturber, sur des petits valets ou dans des béchers.
- Prélever, avec une pipette de précision préalablement rincée avec du liquide centrifugé, 20 ml de l'extrait.
- Introduire la prise dans un tube de centrifugeuse en nylon de 50 ml (bien sec à l'origine).

2) Purification de l'extrait - Ajustage de l'acidité

- Ajouter 23 gouttes d'acide sulfurique (SO_4H_2) pur à l'aliquote (pH final#2).
- Opérer goutte à goutte en agitant à la main; laisser bien dégager le CO_2 .
- Poser le tube sur un support, et laisser flocculer la matière organique pendant une nuit au moins.
- Après une nuit de repos, filtrer sur un petit filtre plat (diamètre = 90 mm) sans cendres, lent (Paquet bleu), posé sec dans l'entonnoir.
- Recueillir le filtrat dans une petite fiole en polyéthylène bien sèche.
- Ne pas laver le filtre.
- Boucher et stocker en attendant d'avoir une série suffisante pour passer en colorimétrie manuelle.

3) Préparation de la gamme

Réactif de "fond" : identique au réactif d'extraction.

Solution étalon de P_2O_5 , à 50 gamma P_2O_5 /ml

Sel étalon - $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$

P.M. = 136,09 - tF'' : 252,6'' C sans décomposition

(Phosphate monopotassique) P = 30. 98

Annexes

$$P_2O_5 = 141,96, \quad P_2O_5/2 = 141,96/2 = 70,98$$

- Sécher PO_4H_2K une nuit à l'étuve $105^\circ C$.
- Refroidir en dessiccateur.

Solution mère à 5 000 gamma P_2O_5/ml (ou 5 mg/ml ou 5 g. /Litre)

$$(136,09 \times 5) / 70,98 = 9,586 \text{ g de } PO_4H_2K/L$$

- Peser les 9, 5865 g. de phosphate monopotassique (PO_4H_2K) sec et les introduire dans une fiole jaugée de un litre.
- Dissoudre avec 800 ml d'eau distillée (retournements - brassage).
- Ajuster à un litre, Bien mélanger (au moins 10 retournements).

Solution étalon proprement dite (50 gamma P_2O_5).

- Avec une pipette de précision de 10 ml préalablement rincée avec la solution mère, prélever 10 ml de cette solution mère.
- Les introduire dans une fiole jaugée bien propre de un litre (rincée avec de l'acide nitrique (HNO_3) concentré, puis plusieurs fois à l'eau distillée).
- Ajuster à un litre avec de l'eau distillée.
- Bien mélanger (au moins 20 retournements).

Distribution de la solution étalon : (Préparation et stockage de la gamme)

- Au moyen d'une burette de précision (50 ml); distribuer dans des béchers de 100 ml bien propres et numérotés de 1 à X, les quantités de solution étalon indiquées au tableau, (Remplir et réajuster au zéro chaque fois).
- Amener les béchers à sec sur plaque chauffante, sans aller au-delà de 1 à sec.
- Laisser refroidir.
- Redissoudre le contenu de chaque bécher au moyen de réactif de "fond" (4 ou 5 portions) en décantant dans une fiole jaugée de 200 ml, de numéro identique à celui du bécher (utiliser un agitateur pour guider la décantation) - Veiller à ce que la première portion de réactif de fond dissolve entièrement les sels amenés à sec dans le bécher, les autres portions ne constituent que des rinçages).
- Amener au trait de jauge.
- Agiter et retourner énergiquement plusieurs fois de suite.

Annexes

- Transvaser en fiole polyéthylène propre et sèche immédiatement (l'acide fluorhydrique FH libre en solution risquerait d'attaquer le verre). (Donc opérer fiole par fiole en allant le plus vite possible).

- Une fois versés dans les fioles en polyéthylène, les 200 ml de solution étalon sont acidifiés dans les mêmes conditions que les échantillons, en rajoutant 230 gouttes exactement d'acide sulfurique (H_2SO_4) pour (le pH final étant voisin de 2).

- La solution est vigoureusement agitée pour dégager tout le gaz carbonique (CO_2) dissous. (On peut acidifier par fractions de 20 ml, en même temps que les extraits de sol).

GAMME P_2O_5 OLSEN modifiée N° 3.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
P_2O_5 en ppm du sol (ou gamma/1g. sol ou dans les 50 ml d'extrait	0	20	50	90	140	200	270	340	420	500
P_2O_5 = gamma/ml de solution de gamme	0	0,40	1,00	1,80	2,80	4,00	5,40	6,80	8,40	10,00
P_2O_5 gamma pour 200 ml d'étalon	0	80	200	360	560	800	1.080	1.360	1.680	2.000
ml de PO_4H_2K à 50 gamma de P_2O_5 (pour 200 ml)	0	1,60	4,00	7,20	11,00	16,00	21,60	27,20	33,60	40,00

- Acidifier chaque flacon de 200 ml par 230 gouttes de H_2SO_4 pur (ou par fractions de 20 ml). pH final #2. Laisser reposer 3 ou 4 jours.

Méthode de dosage calorimétrique manuelle

Réactifs :

Mélange sulfomolybdique :

25 g. de molybdate d'ammonium

280 ml d'acide sulfurique pur, pour 2 litres d'eau.

- Dissoudre : 25 g. de molybdate dans 100 ml d'eau.
- 280 ml d'acide sulfurique dans 300 ml d'eau.
- Refroidir.

Annexes

- Verser le molybdate dans l'acide.
- Compléter à 2 litres.

Acide borique 0,8 M :

50 g. d'acide borique dissout dans l'eau en chauffant, amené à 1 litre.

Acide ascorbique

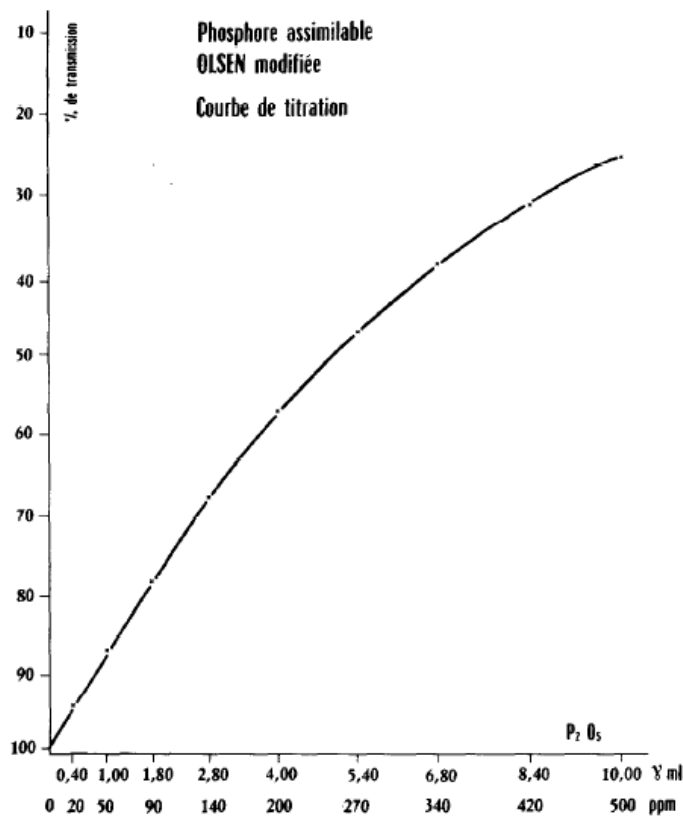
10 g. par litre. Opérer dans des tubes à essai de 20 ml en pyrex suivant la richesse du sol en P_2O_5 .

- Prélever 2 à 4 ml de solution.
- Ajouter : 5 ml d'acide borique.

1 ml de mélange sulfomolybrique

- Compléter à 13 ml avec l'acide ascorbique.
- Chauffer pendant 10 mn au bain marie à 80°C.
- Boucher les tubes, laisser refroidir.

Opérer dans les mêmes conditions avec la gamme Etalon. 4 ml de chacune des solutions Etalon permettent de doser 0, 16 à 40 gamma de P_2O_5 dans la prise (calculer ensuite pour 50 ml correspondant à 1 g. de sol) - Colorimétrie à 660 nm



Annexes

Annexe 2: Les normes d'interprétation de l'azote total, le phosphore assimilable, le rapport C/N et La conductivité électrique.

Eléments	Normes					Références
N total (%) Kjeldhal	< 0.5 Très pauvre	0.5 - 1 Pauvre	1-1.5 Moyen	1.5-2.5 Riche	> 2.5 Très riche	Calvet et Vellemin, 1986
P assimilable (ppm)	/	< 50 Sol pauvre	50 - 80 Teneur satisfaisante	> 80 Sol riche	/	Lebreton J.C, 2004
Rapport C/N	/	< 8 Faible	8-12 Normale	> 12 Fort	/	Gagnard <i>et al.</i> , 1988

Normes de salinité du sol (ISS, http://www.iges-stb.org/pdf/dico_donesol2.pdf)

Salinité (ECe : mS/cm)	Salinité du sol	Réponse des plantes
0 à 2	Non salé	Pas d'impact sur la croissance des plantes
2 à 4	Légèrement salé	La croissance des plantes sensibles peut être réduite
4 à 8	Moyennement salé	La croissance de plusieurs plantes est réduite
8 à 16	Salé	Bonne croissance des plantes tolérantes au sel.
> 16	Très salé	Bonne croissance des plantes très tolérantes au sel.

Annexes

Annexe 3 : Eau gélosée (0.8%)

Agar-agar.....0.8 g
Eau distillée.....100 ml
Autoclavage pendant 20 min à 120°C.

Annexe 4 : Composition du milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) g/L :

Extrait de levure	1g		
Agar-Agar	15g		
Mannitol	10g		
Solution minérale de Bergersen 10 M.....	100ml :	{	
Bergersen (1961)			
	KCl		1g
	FeCl ₃		0.02g
	CaCl ₂ , 2H ₂ O		0.53g
	Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	4.5g	
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	1g	
	H ₂ O distillée	1000ml	

H₂O distillée.....qsp 1000ml

pH (6.9 –7)

Annexe 5 : Coloration de Gram

- 1- Déposer une goutte d'eau sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie à l'aide d'un pique en bois et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- 3- Couvrir le frottis par du violet de gentiane pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir avec de Lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone ou avec de l'éthanol en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuschine (ou safranine) pendant 60 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes et mettre la lame inclinée sur du papier absorbant
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

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

Annexes

Annexe 6: Solution nutritive pour la nodulation « *in vitro* » du pois chiche

(Broughton et Dilworth, 1971)

Solutions stock	Formule chimique	Concentration g/l	Volume de la solution stock/volume finale ml/l
1	CaCl ₂ 2H ₂ O	294	0.5 ml
2	KH ₂ PO ₄	196	0.5 ml
3	MgSO ₄ 7H ₂ O K ₂ SO ₄ MnSO ₄ H ₂ O	126 87 0.338	0.5 ml
4	H ₃ BO ₃ ZnSO ₄ 7H ₂ O CuSO ₄ 5H ₂ O CoSO ₄ 7H ₂ O Na Mo O ₂ 2H ₂ O	0.247 0.288 0.100 0.056 0.048	0.5 ml
5	Na Fe EDTA	0.734	0.5 ml

Annexe7: Le tube de MC Farland n° 0.5 (1x10⁸) (UFC/ml)

BaCl₂ (1.175%)..... 0.5 ml

H₂SO₄..... 99.5 ml

Composition des standards de turbidité de Mc Farland

Standard de turbidité numéro	Dihydrate de chlorure de baryum (1,175 %), en ml	Acide sulfurique (1 %), en ml	Densité approximative correspondante des bactéries/ml
0.5	0.5	99.5	1x 10 ⁸
1	0.1	9.9	3 x 10 ⁸
2	0.2	9.8	6 x 10 ⁸
3	0.3	9.7	9 x 10 ⁸
4	0.4	9.6	12 x 10 ⁸
5	0.5	9.5	15 x 10 ⁸
6	0.6	9.4	18 x 10 ⁸
7	0.7	9.3	21 x 10 ⁸
8	0.8	9.2	24 x 10 ⁸
9	0.9	9.1	27 x 10 ⁸
10	1.0	9.0	30 x 10 ⁸

Annexes

Annexe 8 : préparation des solutions d'antibiotiques et leur mode d'action

1° Tétracycline à 20µg/ml :

- Solution mère : faire dissoudre 1 gélule (500 mg) dans 2 ml d'éthanol (70%).
- Prélever 32 µl et l'ajouter à 200 ml de milieu YEM préalablement autoclavé.

2° Streptomycine :

- Solution mère : faire dissoudre une ampoule de 1g dans 2 ml d'H₂O₂ distillée stérile

Pour une concentration de 25 µg/ml : prélever 10 µl et l'ajouter à 200 ml de milieu YEM préalablement autoclavé.

Pour une concentration de 100 µg/ml : prélever 40 µl et l'ajouter à 200 ml de milieu YEM préalablement autoclavé.

3° Chloramphénicol à 10 µg/ml:

- Solution mère : faire dissoudre une ampoule de 1g dans 5 ml de méthanol.
- Prélever 13,3 µl et l'ajouter à 200 ml de milieu YEM préalablement autoclavé.

4° Kanamycine :

- Solution mère : faire dissoudre une ampoule de 1g dans 2ml d'H₂O₂ distillée stérile.

Pour une concentration de 10µg/ml : prélever 4µl et l'ajouter à 200ml de milieu YEM préalablement autoclavé.

Pour une concentration de 100µg/ml : prélever 40µl et l'ajouter à 200ml de milieu YEM préalablement autoclavé.

5° Erythromycine à 100µg/ml :

- Solution mère : faire dissoudre 1 comprimé (500mg) dans 5ml d'éthanol.
- Prélever 200µl et l'ajouter à 200ml de milieu YEM préalablement autoclavé.

6° Ampicilline à 50µg/ml :

- Solution mère : faire dissoudre 1 ampoule de 1g dans 5ml d'H₂O₂ distillée stérile.
- Prélever 40µl et l'ajouter à 200ml de milieu YEM préalablement autoclavé.

Annexe 9: Préparation de la solution du Bleu de Bromothymol

- Mélanger 0.5 g de BTB dans 100 ml d'éthanol, puis stériliser le mélange par filtration.
- Conserver cette solution à 4°C.
- Ajouter 5ml de la solution dans 1litre de YEM préalablement stérilisé.
- La concentration finale du BTB dans le milieu est de 25 ppm.

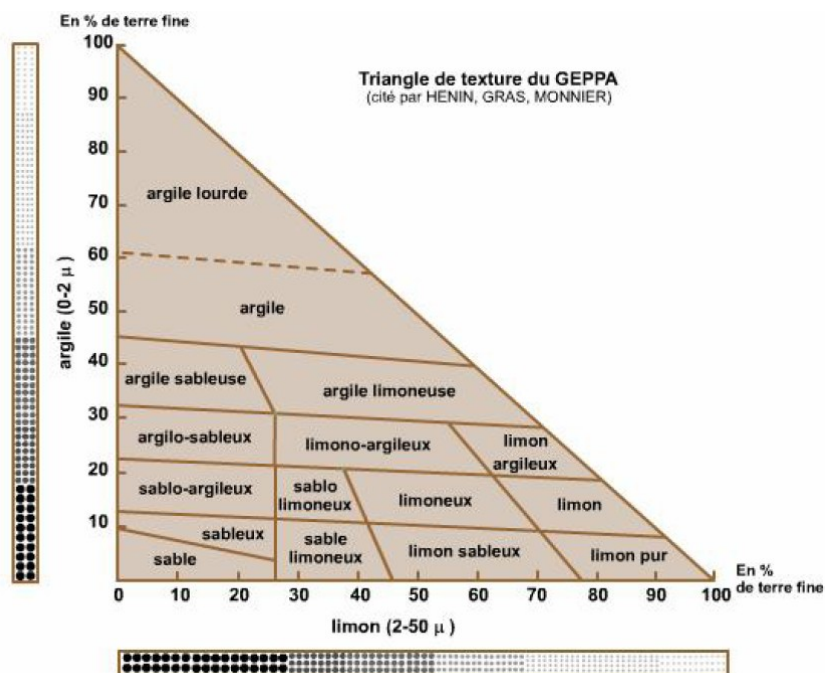
Annexes

Annexe 10 : Composition du milieu Mannitol mobilité en g/L

Hydrolysate tryptique de la caséine 10g
Mannitol..... 7,5g
Nitrate de potassium..... 1g
Agar..... 3.5g
Rouge de phénol (solution mère 1%) 4ml
pH = 7.6

Le milieu est réparti en tubes à vises à base de 10 ml chacun, puis autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 11 : Triangle de la texture du GEPPA



Annexes

Annexe 12 : Classement de l'effet de la variété

Nom des variétés	Poids Total (Mg)	Poids de la M.V (Mg)	Poids des racines (Mg)	Poids sec total (Mg)	Poids Sec de la M.V	Poids Sec des racines	Longueur Totale De la plante	Hauteur De la tige (cm)	longueur des racines (cm)	Volume des racines (ml)
93.93C	12.44	6.76	4.28	3.10	2.43	0.81	51.55	31.41	23.41	3.92
662.25	9.07	5.84	3.45	2.55	1.95	0.76	50.26	28.50	23.25	3.54
81611	6.38	4.48	2.24	2.26	1.56	0.63	49.30	26.24	18.46	2.19
81620	4.17	3.23	1.16	1.58	1.28	0.37	39.85	24.17	16.92	1.11

Annexe 13 : Classement de l'effet du traitement

Traitements	Poids Total (Mg)	Poids de la M.V (Mg)	Poids des racines (Mg)	Poids sec total (Mg)	Poids Sec de la M.V	Poids Sec des racines	Longueur Totale De la plante	Hauteur De la tige (cm)	longueur des racines (cm)	Volume des racines (ml)
Naturel	10.30	4.91	4.50	2.18	1.58	0.76	53.11	28.39	25.98	4.07
Stérile	7.63	5.39	2.43	2.80	2.15	0.68	48.19	28.03	19.62	2.68
Stérile fertilisé	6.12	4.93	1.42	2.14	1.69	0.50	41.93	26.32	18.93	1.33

Annexe 14 : Classement de l'effet du sol

Sites	Poids Total (Mg)	Poids de la M.V (Mg)	Poids des racines (Mg)	Poids sec total (Mg)	Poids Sec de la M.V	Poids Sec des racines	Longueur Totale De la plante	Hauteur De la tige (cm)	longueur des racines (cm)	Volume des racines (ml)
AIT	11.7	6.74	3.56	3.43	2.66	0.88	51.37	31.25	/	3.36
ITGC	8.76	5.85	2.80	2.42	1.87	0.74	48.18	27.14	/	2.77
TES	6.70	4.83	2.78	2.28	1.76	0.55	47.27	26.81	/	2.43
ZAH	4.90	2.90	1.99	1.36	0.93	0.41	44.16	25.13	/	2.21

Annexes

Annexe 15 : Analyse de variance du poids total

	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	ET	CV
VAR TOT S-BLOC	47	59.14				
VAR.VAR	3	457.84	104.32	0.0000		
VAR.SOL	3	306.77	69.90	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL	9	36.47	8.31	0.0000		
VAR.BLOCS	2	13.04	2.97	0.0651		
VAR.RESIDUELLE 1	30	4.39			2.09	26.1%
VAR.TOTALE	143	35.67				
VAR.TRAITEMENT	2	215.63	39.13	0.0000		
VAR.INTER VAR.TRAIT	6	81.00	14.70	0.0000		
VAR .INTER SOL.TRAIT	6	33.02	5.99	0.0001		
VAR.INTER VAR.SOL.TRAIT	18	47.04	8.60	0.0000		
VAR.TOT.S-BLOC	47	59.14	10.73	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 2	64	5.51			2.35	29.3%

Annexe 16 : Classement de l'effet de l'interaction « Variété –Sol »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V1-AIT	19.36	A
V1-ITG	14.10	B
V2-ANT	13.64	B
V2-ITG	9.33	C
V1-TESS	8.75	C D
V2-TESS	7.90	C D E
V3-AIT	7.82	C D E
V1-ZAH	7.56	C D E F
V3-ITG	7.27	C D E F G
V4-AIT	6.01	D E F G
V3-TESS	5.60	E F G
V2-ZAH	5.41	E F G
V3-ZAH	4.85	E F G
V4-TESS	4.56	F G
V4-ITG	4.32	G
V4-ZAH	1.78	H

Annexes

Annexe 17 : Classement de l'effet de l'interaction « Sol-Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPE HOMOGÈNE
ITG-NAT	13.29	A
AIT-NAT	12.83	A B
AIT-STF	11.54	A B
AIT-ST	10.74	B
TES-NAT	7.85	C
TES-ST	7.73	C
ZAH-NAT	7.25	C D
ITG-ST	6.96	C D E
ITG-STF	6.02	C D E
ZAH-ST	5.09	D E
TES-STF	4.53	E
ZAH-STF	2.37	F

Annexe 18: Classement de l'effet de l'interaction « Variété -Traitement »

V1-NAT	19.04	A
V1-ST	10.03	B
V2-ST	9.99	B
V2-NAT	9.56	B
V1-STF	8.26	B
V3-NAT	8.03	B
V2-STF	7.65	B C
V3-STF	5.62	C D
V3-ST	5.49	C D
V4-ST	5.00	D E
V4-NAT	4.57	D E
V4-STF	2.93	E

Annexes

Annexe 19 : Analyse de variance du poids végétal des plantes

	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	ET	CV
VAR TOT S-BLOC	47	14.73				
VAR.VAR	3	86.43	85.58	0.0000		
VAR.SOL	3	97.86	96.89	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL	9	11.88	11.76	0.0000		
VAR.BLOCS	2	1.21	1.20	0.3154		
VAR.RESIDUELLE 1	30	1.01			1.00	19.8%
VAR.TOTALE	143	11.05				
VAR.TRAITEMENT	2	3.58	4.43	0.0156		
VAR.INTER VAR.TRAIT	6	10.77	13.35	0.0000		
VAR .INTER SOL.TRAIT	6	39.84	49.34	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL.TRAIT	18	29.14	36.09	0.0000		
VAR.TOT.S-BLOC	47	14.73	18.25	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 2	64	0.81			0.90	17.7%

Annexe 20 : Classement de l'effet de l'interaction « Variété –Sol »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES	
V1-ITG	9.26	A	
V2-AIT	8.71	A	
V1-AIT	8.53	A	
V2-TES	5.88	B	
V2-ITG	5.81	B	
V1-TES	5.53	B	
V3-AIT	5.51	B	
V3-ITG	5.14	B	C
V4-AIT	4.19	C	D
V4-TES	4.10	C	D
V3-TES	3.81	D	
V1-ZAH	3.74	D	
V3-ZAH	3.48	D	
V4-ITG	3.19	D	
V2-ZAH	2.95	D	
V4-ZAH	1.42	E	

Annexes

Annexe 21 : Classement de l'effet de l'interaction « Variété –Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V1-NAT	8.03	A
V2-ST	7.10	B
V1-ST	6.26	C
V1-STF	6.00	C
V2-STF	5.75	C
V2-NAT	4.66	D
V3-STF	4.64	D
V3-ST	4.58	D
V3-NAT	4.23	D E
V4-ST	3.62	D E F
V4-STF	3.35	E F
V4-NAT	2.70	F

Annexe 22 : Classement de l'effet de l'interaction « Sol –Traitement»

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
AIT-STF	8.83	A
ITG-NAT	7.95	B
AIT-ST	6.96	C
TES-ST	6.01	D
ITG-ST	5.18	E
TES-STF	4.59	E F
AIT-NAT	4.43	E F G
ITG-STF	4.41	E F G
TES-NAT	3.89	F G
ZAH-ST	3.42	G
ZAH-NAT	3.36	G
ZAH-STF	1.91	H

Annexes

Annexe 23 : Analyse de variance du poids des racines

	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	ET	CV
VAR TOT S-BLOC	47	8.23				
VAR.VAR	3	67.28	57.69	0.0000		
VAR.SOL	3	14.84	12.72	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL	9	11.31	9.70	0.0000		
VAR.BLOCS	2	1.84	1.58	0.2211		
VAR.RESIDUELLE 1	30	1.17			1.08	38.8%
VAR.TOTALE	143	6.87				
VAR.TRAITEMENT	2	118.23	89.27	0.0000		
VAR.INTER VAR.TRAIT	6	10.69	8.08	0.0000		
VAR .INTER SOL.TRAIT	6	14.97	11.30	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL.TRAIT	18	6.65	5.02	0.0000		
VAR.TOT.S-BLOC	47	8.23	6.21	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 2	64	1.32			1.15	41.3%

Annexe 24 : Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Sol »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V2-AIT	6.03	A
V1-AIT	5.05	A B
V1-ITG	5.00	A B
V1-ZAH	3.82	B C
V2-ITG	3.49	C D
V3-TES	3.41	C D
V1-TES	3.26	C D
V2-TES	2.75	C D E
V3-ZAH	2.2	D E F
V3-ITG	1.72	E F G
V4-TES	1.71	E F G
V3-AIT	1.64	E F G
V4-AIT	1.53	E F G
V2-ZAH	1.52	E F G
V4-ITG	0.99	F G
V4-ZAH	0.42	G

Annexes

Annexe 25 : Classement de l'effet de l'interaction « Sol –Traitement»

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
TES-NAT	5.69	A
ITG-NAT	5.22	A
AIT-ST	3.79	B
AIT-NAT	3.60	B
ZAH-NAT	3.49	B
AIT-STF	3.30	B
ZAH-ST	2.02	C
ITG-ST	1.99	C
TES-ST	1.93	C
ITG-STF	1.19	C D
TES-STF	0.73	C D
ZAH-STF	0.47	D

Annexe 26 : Classement de l'effet de l'interaction « Variété –Traitement»

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V1-NAT	6.60	A
V3-NAT	5.13	B
V2-NA	4.33	B C
V1-ST	3.98	C
V2-ST	3.36	C D
V2-STF	2.66	D E
V1-STF	2.26	D E F
V4-NAT	1.94	E F
V4-ST	1.23	F G
V3-ST	1.15	F G
V3-STF	0.45	G
V4-STF	0.32	G

Annexes

Annexe 27 : Analyse de variance du poids sec total des plantes

	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	ET	CV
VAR TOT S-BLOC	47	3.12				
VAR.VAR	3	14.40	107.77	0.0000		
VAR.SOL	3	25.93	194.03	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL	9	2.25	16.81	0.0000		
VAR.BLOCS	2	0.73	5.49	0.0093		
VAR.RESIDUELLE 1	30	0.13			0.37	15.4%
VAR.TOTALE	143	1.75				
VAR.TRAITEMENT	2	6.52	43.07	0.0000		
VAR.INTER VAR.TRAIT	6	3.65	24.15	0.0000		
VAR .INTER SOL.TRAIT	6	1.27	8.38	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL.TRAIT	18	2.81	18.60	0.0000		
VAR.TOT.S-BLOC	47	3.12	20.63	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 2	64	0.15			0.39	16.4%

Annexe 28: Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Sol »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V1-AIT	4.88	A
V2-AIT	3.49	B
V3-ANT	3.47	B
V1-ITG	3.37	B
V2-TES	2.68	C
V2-ITG	2.66	C
V1-TES	2.54	C
V3-TES	2.02	D
V3-ITG	1.93	D
V4-TES	1.89	D E
V4-AIT	1.88	D E
V4-ITG	1.71	D E
V3-ZAH	1.63	D E
V1-ZAH	1.61	D E
V2-ZAH	1.36	E
V4-ZAH	0.83	F

Annexes

Annexe 29 : Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V1-NAT	3.69	A
V1-ST	3.36	B
V3-ST	3.09	B C
V2-STF	2.88	C
V2-ST	2.81	C
V1-STF	2.25	D
V3-STF	1.97	D E
V2-NAT	1.96	D E
V4-ST	1.92	D E
V3-NAT	1.72	E F
V4-STF	1.47	F G
V4-NAT	1.35	G

Annexe 30 : Classement de l'effet de l'interaction « Sol - Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
AIT-ST	4.08	A
AIT-STF	3.14	B
AIT-NAT	3.07	B C
TES-ST	2.76	C D
ITG-NAT	2.61	D
ITG-ST	2.59	D
TES-STF	2.39	D
ITG-STF	2.06	E
ZAH-ST	1.76	E
TES-NAT	1.70	E
ZAH-NAT	1.34	F
ZAH-STF	0.98	G

Annexes

Annexe 31 : Analyse de variance du poids sec végétal des plantes

	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	ET	CV
VAR TOT S-BLOC	47	2.11				
VAR.VAR	3	8.93	84.83	0.0000		
VAR.SOL	3	17.93	170.38	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL	9	1.60	15.22	0.0000		
VAR.BLOCS	2	0.57	5.44	0.0097		
VAR.RESIDUELLE 1	30	0.11			0.32	18%
VAR.TOTALE	143	1.13				
VAR.TRAITEMENT	2	4.42	21.07	0.0000		
VAR.INTER VAR.TRAIT	6	1.62	7.73	0.0000		
VAR.INTER SOL.TRAIT	6	1.48	7.06	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL.TRAIT	18	1.22	5.80	0.0000		
VAR.TOT.S-BLOC	47	2.11	10.08	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 2	64	0.21			0.46	25.4%

Annexe 32: Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Sol »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPE HOMOGENES
V1-AIT	3.71	A
V2-AIT	3.07	B
V1-ITG	2.63	C
V3-AIT	2.38	C D
V1-TES	2.29	C D
V2-TES	2.10	D
V4-ITG	1.71	E
V2-ITG	1.67	E
V3-ITG	1.48	E F
V4-AIT	1.47	E F
V4-TES	1.41	E F
V3-TES	1.23	F G
V3-ZAH	1.16	F G
V1-ZAH	1.09	F G
V2-ZAH	0.95	G

Annexes

Annexe 33: Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V1-ST	3.03	A
V1-NAT	2.55	B
V2-STF	2.10	C
V2-ST	2.06	C
V3-ST	1.98	C D
V1-STF	1.71	C D E
V2-NAT	1.68	C D E
V4-ST	1.54	D E F
V3-STF	1.53	D E F
V4-STF	1.40	E F
V3-NAT	1.17	F G
V4-NAT	0.90	G

Annexe 34: Classement de l'effet de l'interaction « Sol - Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
AIT-ST	2.94	A
AIT-STF	2.64	A B
AIT-NAT	2.39	B C
TES-ST	2.38	B C
ITG-ST	2.05	C D
ITG-NAT	2.04	C D
TES-STF	1.90	D
ITG-STF	1.53	E
ZAH-ST	1.23	E F
TES-NAT	0.99	F G
ZAH-NAT	0.89	F G
ZAH-STF	0.68	G

Annexes

Annexe 35 : Analyse de variance du poids sec racinaire des plantes

	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	ET	CV
VAR TOT S-BLOC	47	0.30				
VAR.VAR	3	1.43	30.58	0.0000		
VAR.SOL	3	1.53	32.89	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL	9	0.41	8.80	0.0000		
VAR.BLOCS	2	0.07	1.41	0.2588		
VAR.RESIDUELLE 1	30	0.05			0.22	33.6%
VAR.TOTALE	143	0.23				
VAR.TRAITEMENT	2	0.87	16.79	0.0000		
VAR.INTER VAR.TRAIT	6	0.50	9.71	0.0000		
VAR .INTER SOL.TRAIT	6	0.40	7.65	0.0001		
VAR.INTER VAR.SOL.TRAIT	18	0.44	8.47	0.0000		
VAR.TOT.S-BLOC	47	0.30	5.59	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 2	64	0.05			0.23	35.4%

Annexe 36: Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Sol »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V2-ITG	1.17	A
V3-AIT	1.15	A
V1-AIT	1.08	A
V1-ITG	0.99	A B
V2-AIT	0.80	B C
V1-TES	0.70	C D
V2-TES	0.65	C D
V3-ITG	0.49	D E
V1-ZAH	0.48	D E
V4-AIT	0.48	D E
V4-TES	0.46	D E
V3-ZAH	0.46	D E
V2-ZAH	0.44	D E
V3-TESS	0.41	D E
V4-ITG	0.29	E
V4-ZAH	0.25	E

Annexes

Annexe 37: Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V1-NAT	1.14	A
V3-ST	0.92	B
V2-STF	0.85	B
V2-NAT	0.79	B C
V1-ST	0.76	B C
V2-ST	0.66	B C
V3-NAT	0.59	C D
V1-STF	0.54	C D
V4-NAT	0.53	C D
V3-STF	0.38	D E
V4-ST	0.37	D E
V4-STF	0.22	E

Annexe 38: Classement de l'effet de l'interaction « Sol – Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
AIT-ST	1.21	A
AIT-NAT	0.90	B
ITG-NAT	0.83	B
TES-NAT	0.73	B C
ITG-STF	0.73	B C
ITG-ST	0.64	B C D
ZAH-NAT	0.57	C D E
AIT-STF	0.53	C D E F
TES-ST	0.51	C D E F
TES-STF	0.42	D E F
ZAH-ST	0.35	E F
ZAH-STF	0.30	F

Annexes

Annexe 39: Analyse de variance de la longueur totale des plantes

	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	ET	CV
VAR TOT S-BLOC	47	124.57				
VAR.VAR	3	1026.39	68.12	0.0000		
VAR.SOL	3	317.03	21.04	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL	9	145.73	9.67	0.0000		
VAR.BLOCS	2	30.47	2.02	0.1481		
VAR.RESIDUELLE 1	30	15.07			3.88	8.1%
VAR.TOTALE	143	83.00				
VAR.TRAITEMENT	2	1507.22	143.73	0.0000		
	6	53.87	5.14	0.0003		
VAR.INTER VAR.TRAIT						
VAR .INTER SOL.TRAIT	6	55.28	5.27	0.0002		
VAR.INTER VAR.SOL.TRAIT	18	92.99	8.87	0.0000		
VAR.TOT.S-BLOC	47	124.57	11.88	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 2	64	10.49			3.24	6.8%

Annexe 40: Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V3-NAT	57.01	A
V2-NAT	55.10	A B
V1-NAT	54.77	A B
V1-ST	51.86	B C
V2-ST	50.83	C
V3-ST	49.49	C
V2-STF	48.73	C
V4-NAT	45.56	D
V3-STF	44.27	D
V1-STF	41.28	E
V4-ST	40.57	E
V4-STF	33.43	F

Annexes

Annexe 41: Classement de l'effet de l'interaction « Sol – Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
AIT-NAT	55.57	A
TES-NAT	55.36	A
ZAH-NAT	53.90	A
AIT-ST	50.72	B
ZAH-ST	48.39	B
AIT-STF	47.82	B
ITG-NAT	47.61	B
TES-ST	47.05	B
ITG-ST	46.59	B
ZAH-STF	42.24	C
TES-STF	39.39	D
ITG-STF	38.27	D

Annexe 42: Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Sol »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V3-ZAH	57.95	A
V1-AIT	56.38	A
V2-AIT	56.09	A
V2-TES	51.85	B
V2-ZAH	50.93	B
V3-AIT	49.38	B C
V1-TES	49.19	B C
V3-ITG	48.56	B C D
V2-ITG	47.34	B C D
V1-ZAH	46.84	B C D
V3-TES	45.14	C D
V1-ITG	44.80	C D
V4-Ait	43.62	C D
V4-TES	42.89	D
V4-ZAH	36.98	E
V4-ITG	35.93	E

Annexes

Annexe 43: Analyse de variance de la longueur végétale des plantes

	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	ET	CV
VAR TOT S-BLOC	47	47.06				
VAR.VAR	3	347.35	93.83	0.0000		
VAR.SOL	3	243.19	65.69	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL	9	36.20	9.78	0.0000		
VAR.BLOCS	2	1.67	0.45	0.6467		
VAR.RESIDUELLE 1	30	3.70			1.92	7%
VAR.TOTALE	143	20.95				
VAR.TRAITEMENT	2	58.54	28.10	0.0000		
VAR.INTER VAR.TRAIT	6	13.05	6.26	0.0000		
VAR .INTER SOL.TRAIT	6	13.60	6.53	0.0001		
VAR.INTER VAR.SOL.TRAIT	18	20.74	9.96	0.0000		
VAR.TOT.S-BLOC	47	47.06	22.59	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 2	64	2.08			1.44	5.2%

Annexe 44: Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Sol »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V3-ZAH	34.21	A
V3-AIT	33.76	A
V2-ANT	32.46	A
V1-AIT	31.84	A
V3-TES	29.44	B
V2-ZAH	28.28	B C
V3-ITG	28.24	B C
V2-TES	27.93	B C
V4-AIT	26.95	B C D
V1-TES	26	C D E
V2-ITG	25.34	D E
V4-TES	25.18	D E
V1-ZAH	23.58	E F
V1-ITG	23.55	E F
V4-ITG	23.38	E F
V4-ZAH	21.18	F

Annexes

Annexe 45: Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V3-NAT	32.67	A
V3-ST	32.05	A
V3-STF	29.52	B
V2-STF	28.92	B C
V2-ST	28.66	B C
V2-NAT	27.93	B C D
V1-NAT	27.56	C D
V1-ST	26.55	D E
V4-NAT	25.40	E F
V4-ST	24.86	F
V1-STF	24.61	F
V4-STF	22.25	G

Annexe 46: Classement de l'effet de l'interaction « Sol – Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
AIT-NAT	32.69	A
AIT-STF	30.63	B
AIT-ST	30.43	B
TES-ST	28.69	C
TES-NAT	27.67	C D
ZAH-ST	27.35	C D E
ZAH-NAT	26.68	D E F
ITG-NAT	26.52	D E F
ZAH-STF	26.40	D E F
ITG-ST	25.66	E F
TES-STF	25.05	F
ITG-STF	23.21	G

Annexes

Annexe 47: Analyse de variance de la longueur racinaire des plantes

	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	ET	CV
VAR TOT S-BLOC	47	36.14				
VAR.VAR	3	395.78	105.86	0.0000		
VAR.SOL	3	5.27	1.41	0.2583		
VAR.INTER VAR.SOL	9	42.43	11.35	0.0000		
VAR.BLOCS	2	0.75	0.20	0.8218		
VAR.RESIDUELLE 1	30	3.74			1.93	9.4%
VAR.TOTALE	143	39.37				
VAR.TRAITEMENT	2	1241.33	567.39	0.0000		
VAR.INTER VAR.TRAIT	6	35.21	16.10	0.0000		
VAR .INTER SOL.TRAIT	6	39.46	18.04	0.0001		
VAR.INTER VAR.SOL.TRAIT	18	47.81	21.85	0.0000		
VAR.TOT.S-BLOC	47	36.14	16.52	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 2	64	2.19			1.48	7.2%

Annexe 48: Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Sol »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V1-AIT	26.31	A
V2-ZAH	24.03	B
V1-TES	23.20	B C
V2-ITG	23.17	B C
V1-ZAH	23.07	B C
V2-AIT	22.98	B C
V2-TES	22.81	B C
V1-ITG	21.05	C D
V3-ZAH	20.57	C D
V4-ITG	19.74	D E
V3-ITG	19.00	D E F
V3-AIT	17.86	E F
V4-TES	17.85	E F
V4-AIT	16.46	F
V3-TES	16.41	F
V4-ZAH	13.63	G

Annexes

Annexe 49: Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V1-NAT	29.28	A
V2-NAT	27.16	B
V3-NAT	24.40	C
V1-ST	24.33	C
V4-NAT	23.07	C D
V2-ST	22.46	D
V2-STF	20.11	E
V1-STF	16.62	F
V3-ST	15.97	F
V4-ST	15.72	F
V3-STF	15.01	F
V4-STF	11.97	G

Annexe 50: Classement de l'effet de l'interaction « Sol – Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
TES-NAT	28.04	A
AIT-NAT	25.93	B
ITG-NAT	25.68	B
ZAH-NAT	24.26	C
ITG-ST	20.55	D
ZAH-ST	20.29	D
TES-ST	18.84	D E
AIT-ST	18.82	D E
AIT-STF	17.96	E
ZAH-STF	16.42	F
ITG-STF	16.00	F
TES-STF	13.32	G

Annexes

Annexe 51: Analyse de variance du volume racinaire des plantes

	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	ET	CV
VAR TOT S-BLOC	47	5.76				
VAR.VAR	3	59.51	68.58	0.0000		
VAR.SOL	3	9.10	10.49	0.0001		
VAR.INTER VAR.SOL	9	3.56	4.10	0.0017		
VAR.BLOCS	2	3.30	3.81	0.0330		
VAR.RESIDUELLE 1	30	0.87			0.93	34.6%
VAR.TOTALE	143	4.88				
VAR.TRAITEMENT	2	90.31	167.57	0.0000		
VAR.INTER VAR.TRAIT	6	5.87	10.89	0.0000		
VAR .INTER SOL.TRAIT	6	11.22	20.83	0.0000		
VAR.INTER VAR.SOL.TRAIT	18	6.06	11.25	0.0000		
VAR.TOT.S-BLOC	47	5.76	10.68	0.0000		
VAR.RESIDUELLE 2	64	0.54			0.73	27.3 %

Annexe 52 : Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Sol »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V1-ITG	5.05	A
V2-AIT	4.90	A
V1-AIT	4.10	A B
V1-ZAH	3.66	B
V2-ZAH	3.41	B C
V2-ITG	3.14	B C D
V1-TES	2.87	B C D E
V3-AIT	2.81	B C D E
V2-TES	2.71	B C D E
V3-ZAH	2.21	C D E F
V3-TES	1.93	D E F
V3-ITG	1.82	D E F
V4-AIT	1.65	E F
V4-TES	1.33	F G
V4-ITG	1.05	F G
V4-ZAH	0.43	G

Annexes

Annexe 53: Classement de l'effet de l'interaction « Variété – Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
V1-NAT	6.22	A
V2-NAT	4.67	B
V1-ST	3.86	C
V3-NAT	3.70	C
V2-ST	3.58	C
V2-STF	2.37	D
V3-ST	2.09	D
V4-NAT	1.69	D E
V1-STF	1.68	D E
V4-ST	1.17	E F
V3-STF	0.79	F
V4-STF	0.48	F

Annexe 54: Classement de l'effet de l'interaction « Sol – Traitement »

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
ITG-NAT	5.13	A
AIT-ST	4.55	A B
TES-NAT	4.11	B C
ZAH-NAT	3.61	C
AIT-NAT	3.44	C
ZAH-ST	2.63	D
AIT-STF	2.10	D E
ITG-ST	2.04	D E
TES-ST	1.48	E F
ITG-STF	1.13	F
TES-STF	1.04	F
ZAH-STF	1.04	F