

***Caractérisation des rhizobia de quelques acacias d'Algérie en vue de la production d'inoculum pour la bactérisation des acacias en pépinières***

Présenté par :

**LEBBIDA Fahima**

Directeur de thèse: Mme AID F. Professeur(FSB/USTHB)

Soutenu le 24 juin 2009

Jury Président : Mr BOUZNAD Z. Professeur INA Examineurs : Mr AMRANI S. Chargé de Cours (FSB/USTHB) Mr KHELIFI L. Maître conférence INA Mr OUNANE S.M. Maître conférence INA



# Table des matières

|   |    |
|---|----|
| Dédicace . .  | 5  |
| Remerciements . .   | 6  |
| Liste des abréviations . .  | 7  |
| Résumé . .  | 9  |
| Summary . .   | 10 |
| صغلم . .  | 11 |
| Introduction . .  | 12 |
| Synthèse bibliographique . .  | 14 |
| 1 - Le macrosymbiote : les légumineuses ou fabales . .  | 14 |
| 1.1 - Le genre <i>Acacia</i> . .  | 15 |
| 1.2 - Le genre <i>Acacia</i> en Algérie . .   | 17 |
| 1.3 - Utilisation des acacias australiens en Algérie . .  | 19 |
| 2 - Le microsymbiote . .  | 20 |
| 2.1 - Les bactéries nodulant les légumineuses (BNL) . .   | 20 |
| 2.2 - Les BNL associées aux Acacias . .   | 21 |
| 2.3 - Etablissement de la symbiose . .  | 23 |
| 2.4 - Structure du nodule . .   | 26 |
| 2.5 - Les particularités de la nodulation et de la fixation d'azote chez les arbres . .           | 27 |
| 2.6 - La fixation biologique de l'azote atmosphérique . .   | 28 |
| 3- Importance et intérêt de l'inoculation des arbres en pépinières . .                            | 30 |
| Matériel et Méthodes . .  | 32 |
| 1- Matériel végétal . .   | 32 |
| 1.1 - Plants d'acacias . .  | 32 |
| 1.2 - Semences . .  | 33 |
| 1.3 - Milieux de culture . .  | 33 |
| 2 - Méthodes d'étude . .  | 34 |
| 2.1 - Evaluation de la prévalence de la nodulation et de la fixation d'azote chez les acacias . . | 34 |
| 2.2 - Extraction, isolement et purification des souches . .                                       | 34 |
| 2.3 - Détermination des caractéristiques symbiotiques des souches associées aux acacias . .       | 35 |
| 2.4 - Mesure de l'activité nitrogénasique . .   | 36 |
| 2.5 - Caractérisation phénotypique des souches . .  | 39 |
| 2.6 - Caractérisation génotypique . .   | 41 |
| Résultats et Discussions . .  | 44 |
| 1- Prévalence pépinières . .  | 44 |
| 1.1- Prévalence des acacias au niveau des pépinières retenues . .                                 | 44 |
| 2 - Caractérisation symbiotique des Rhizobia associées aux acacias . .                            | 56 |
| 2.1 - Caractérisation symbiotique . .   | 56 |
| 3 - Caractérisation microbiologique . .   | 66 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.1 - Caractérisation phénotypique des souches . .</b> | <b>66</b> |
| <b>3.2 - Caractérisation génotypique . .</b>              | <b>69</b> |
| <b>4 - Essai d'inoculation . .</b>                        | <b>78</b> |
| <b>Conclusion générale . .</b>                            | <b>84</b> |
| <b>Références bibliographiques . .</b>                    | <b>86</b> |
| <b>Annexes . .</b>  | <b>98</b> |
| Annexe 1 . .  | 98        |
| Annexe 2 . .  | 98        |
| Annexe 3 . .  | 98        |
| Annexe 4 . .  | 99        |
| Annexe 5 . .  | 99        |
| Annexe 6 : . .  | 99        |
| Suite annexe 9 . .  | 100       |

## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à : **Mes chers parents** **A ma famille** **A mes amis (ies)** **Et à tous ceux qui comptent pour moi***

## **Remerciements**

Je souhaite tout d'abord adresser mes sincères remerciements à ma directrice de thèse, Mme Aïd Fatiha pour le grand honneur qu'elle m'a fait en acceptant de diriger ce travail, pour les connaissances et le savoir-faire qu'elle m'a apporté qui sont et resteront précieux pour moi. Je tiens à remercier aussi Mr Amrani S. MAA à la Faculté des Sciences Biologiques (FSB) USTHB qui a accepté de juger ce travail pour ses recommandations, ses discussions perspicaces ainsi que pour ses conseils qui ont beaucoup enrichi non seulement ma recherche au sein du laboratoire mais également différents aspects de ma vie.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mr Bouznad Z. Professeur à l'INA (Institut National Agronomique), pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

Je remercie également Mr Khelifi L. Maître de Conférences à l'INA et Mr Ouanan S. Maître de Conférences à l'INA qui me fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à remercier également Mlle Nouredine N.E MAA à la (FSB) USTHB pour ses encouragements, pour son implication et les conseils scientifiques qu'elle m'a accordés.

Je remercie également tous les membres des laboratoires où ce travail a été réalisé :

Le laboratoire de Biologie des Sols de la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB.

Le laboratoire de physiologie végétale de la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB.

Je remercie spécifiquement l'Institut Nationale de recherche foresterie pour son aide.

Et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

**Merci pour tout**

---

## Liste des abréviations

- %: Pourcentage
- ° : Degré
- °C: Degré **celsuse**
- $\mu\text{g mL}^{-1}$  :Microgramme par millilitre
- $\mu\text{L}$ : Micro litre
- $\mu\text{m}$  : Micromètre
- **16S rDNA** :ribosomal Deoxyribonucleic acid
- **AFN** : Arbre fixateur d'azote
- **ANA** : Agence Nationale des Autoroutes
- **ANB** : Agence Nationale des Barrages
- **ARA** : Activité réductrice d'acétylène
- **BNL** : Bactéries nodulant les légumineuses
- **CPG** : chromatographie en phase gazeuse
- **DNA** : Deoxyribonucleic acid
- **dNTP** : Désoxy acide nucléique tri-phosphate
- **EBI** : **European Bioinformatics Institute**
- **EDTA** : Tris Acétate
- **EPS** : exopolysaccharides
- **FID** : Détecteur à ionisation de flamme
- **Fig** : Figure
- $\text{gmL}^{-1}$  : Milligramme par litre
- **h** : Heure
- **ILDIS** : International Legume Database and Information Service.
- **INRF** : Institut national de recherche forestière
- **LCO** : lipo-oligosaccharides
- **M.V.S.P** : (Multi-Variate Statistical Package)
- **mL** : Millilitre
- $\text{mL.L}^{-1}$  : Millilitre par litre
- **mM** : millimolaire
- **Mn**: Minute
- **NBT** : New Biotechnic
- **Ncbi** :National Center for Biotechnology Information
- **OTU** : Unité Taxonomique Opérationnel
- **PCR** : **Polymerase Chain Reaction**
- **PEG** : polyéthylène glycol
- **pH** : potentiel hydrogène

- **PHB** : poly-Beta-hydroxybutyrates
- **RFLP** :restriction fragment length polymorphism
- **R pm** : **Revolutions per minute**
- **S**: Seconde
- **Tab** : Tableau
- **TBE** : Tris Borate
- **tr/mn** : Tour par minute
- **TY** : Yeast tryptone
- **UV** :Ultra violet
- **V**: Volt
- **w/v** :weight per volume
- **YEMA** : Tryptone Yeast Extract Agar
- **YEMA-RC** : Yeast Extract Mannitol Agar – Rouge Congo
- **YEMB** : Tryptone Yeast Extract Broth



---

## Résumé

Une étude portant sur la symbiose à Rhizobia chez six espèces d'acacias indigènes (*A. ehrenbergiana*, *A. nilotica* et *A. tortilis*) et introduites (*A. saligna*, *A. melanoxylon* et *A. longifolia*) au niveau de douze pépinières du nord et du sud du pays indique que celles-ci sont toujours nodulées et fixatrices d'azote.

La caractérisation symbiotique et microbiologique qui a porté sur 46 souches associées aux différentes espèces d'acacias indique que les espèces autochtones sont nodulés exclusivement par des Rhizobia à croissance rapide tandis que les espèces introduites sont nodulées essentiellement par des Rhizobia à croissance lente au niveau des pépinières du nord et des Rhizobia à croissance rapide au niveau des pépinières du sud..

La caractérisation génotypique des souches associées par PCR-RFLP et séquençage du gène de l'ARN 16s nous a permis d'établir que la nodulation des acacias pris en considération est assurée par des rhizobia appartenant aux genres et espèces : *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium gallicum*, *Mesorhizobium loti* et *Bradyrhizobium japonicum*.

Des tests d'inoculation de germinations des différentes espèces d'acacias par quatre souches de rhizobia performantes menées ex-situ en pots indiquent que l'apport de rhizobia se traduit toujours par une augmentation du taux de nodulation et de l'activité fixatrice d'azote des plantules des six espèces d'acacias prises en considération. Ce résultat indique qu'il est possible et intéressant de développer des inoculants destinés à la bactérisation de ces espèces en pépinière afin de profiter pleinement de leur potentiel de fixation d'azote après transfert sur les aires de plantation.

**Mots Cles :** Acacias, Pépinières, Symbiose, Rhizobia Associés, Diversité, Inoculation

## **Summary**

A study of rhizobia symbiosis amongst six species of acacia from which three indigenous (*A. ehrenbergiana*, *A. nilotica* et *A. tortilis*) and three introduced (*A. saligna*, *A. melanoxylon* et *A. longifolia*) performed in twelve nurseries from northern and southern areas of Algeria have shown that these species are always nodulated and nitrogen fixing.

Symbiotic and microbiological characteristics of 46 rhizobia strains associated to these six acacia species indicate that indigenous acacia species were nodulated exclusively by fast growing rhizobia while the three introduced acacia species were nodulated by slow growing rhizobia in northern nurseries and fast growing rhizobia in southern nurseries.

Genotypic characterization of the associated strains by mean of 16s RNA gene PCR-RFLP and sequence analysis indicate that nodulation of the six acacias species is ensured by the genera and species: *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium gallicum*, *Mesorhizobium loti* et *Bradyrhizobium japonicum*.

Inoculation trials of germinations from the six acacia species performed ex-situ in pots with four performant rhizobia strains had lead to a drastic alievation of the nodulation and nitrogen fixation rates of the plantlets from the six acacia species taken in consideration. This result indicate that it would be possible and interesting to develop inoculants for the bacterization of these legume species at nursery level in order to get the full benefit of their nitrogen fixing potential when transferred in planting areas.

**Key Words:** Acacia Species, Nurseries, Symbiosis, Rhizobia, Diversity, Inoculation

## ص خلم

دراسة تمايش الريزوبيا عند ستة انواع acacias المحلية (*A. saligna*, *A. melanoxylon* et *A. longifolia*) على مستوى اشا عشر مشنلة في شمال و جنوب الوطن قبل ان انواع acacias تحتوي على عقد جذرية مثبتة النيتروجين.

خصائص التمايش و الميكروبيولوجية لستة و اربعون سلالة مرتبطة مع مختلف انواع acacias قبل على ان الانواع المحلية تحتوي على عقد جذرية مع الريزوبيا المتميزة بنمو سريع على عكس انواع الخنيلة فقوي على عقد جذرية الريزوبيا المتميزة بنمو بطيء على مستوى شتلات الشمال و الريزوبيا المتميزة بنمو سريع على مستوى شتلات الجنوب.

خصائص التركيبة الوراثية للسلالات المرتبطة ب PCR-RFLP و القراءة الجينية لـ ARN 16s مكنا من القول ان تشكيل عقد جذرية لانواع acacias اكيدة مع الريزوبيا تنتمي للانواع التالية :

*Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium gallicum*, *Mesorhizobium loti* et *Bradyrhizobium japonicum*.

تجارب تلقيح بذور مختلف انواع acacias بارب سلات الريزوبيا المتميزة بقدرة عالية على تثبيت النيتروجين ex-situ في اثناءات قبل ان اضافة الريزوبيا يترجم دائما بصعود قدرة تشكيل عقد جذرية مثبتة النيتروجين لشتلات ستة انواع acacias. النتائج المحصل عليها قبل على امكانية تطوير الملقح لبكتيرية انواع acacias على مستوى الشتلات لتسكينها من الاستغادة من قدرة التثبيت و نقلها الى اماكن الزرع.

كلمات مفتاحية: انواع acacia , مشنلة , تمايش , الريزوبيا , التنوع , تلقيح.

# Introduction

En Algérie, parmi les légumineuses ligneuses qui peuvent être exploitées pour l'amélioration de la fertilité des milieux naturels, utilisées en agroforesterie, les acacias semblent les plus intéressants. Ils sont représentés par :

- Des espèces indigènes présentes dans les milieux naturels, mêmes les plus défavorables, et dont le rôle écologique et socio-économique (bois de chauffe, fourrage) est important. Ces espèces des milieux naturels défavorables (désert) sont cantonnées à des régions traces d'eau. La reproduction naturelle est difficile et la croissance lente.

- Des espèces introduites dont la croissance rapide, la reproduction facile et la forte capacité d'adaptation en milieux défavorables constituent un potentiel indéniable. Ces espèces deviennent au fur et à mesure une composante essentielle de la flore ligneuse d'Algérie. Elles constituent par conséquent de bons candidats comme espèces pionnières pour la restauration du niveau de fertilité des sols appauvris et/ou dégradés par la surexploitation, l'érosion, la désertification ou par la pollution.

Les qualités intrinsèques des Acacias sont accrues car, comme la majorité des légumineuses, ils sont capables de contracter avec les bactéries du groupe des Rhizobia une symbiose fixatrice d'azote (Dommergues et *al.*, 1999 , Sprent et Parson., 2000). Cette propriété, leur permet de jouer un rôle d'espèces pionnière pour la colonisation des sols pauvres ou dégradés et d'espèces pouvant améliorer, maintenir ou restaurer le niveau de fertilité azoté des sols (Dommergues et *al.*, 1999 ; Van der Heijden et *al.*, 2008).

C'est pour ces raisons qu'ils sont utilisés massivement en Algérie pour des plantations d'agrément, la protection des terres sujettes à l'érosion, la stabilisation des dunes, la lutte contre l'ensablement et la désertification, la restauration des zones dégradées... Ces multiples utilisations présentent des avantages induits, non négligeables, comme l'utilisation des feuilles de certaines espèces comme fourrage et du bois comme combustible ou bois d'œuvre (El-Lakany, 1986, Tiedeman and Johnson, 2004).

En Algérie, aucune étude sur la symbiose à Rhizobia chez les *Acacia* n'a été publiée. Il est donc intéressant sur le plan scientifique et important sur le plan pratique d'évaluer la prévalence de la symbiose

chez les espèces les plus utilisées et de préciser la nature des Rhizobia qui lui sont associées. En effet, l'espèce ne se multipliant qu'en pépinière, il est important d'optimiser, à ce niveau, sa symbiose avec les Rhizobia afin de profiter pleinement de son pouvoir fixateur d'azote sur les aires de plantation. Cela peut être assuré en recourant à l'inoculation, en pépinière, des jeunes plants par des souches sélectionnées pour leurs performances symbiotiques.

C'est en raison de l'importance écologique des espèces indigènes et de l'importance en aménagement des espèces introduites que nous nous sommes intéressés à la prévalence de la symbiose chez les acacias.

Notre travail consistera en une:

- Evaluation de la prévalence de la symbiose à rhizobia chez les acacias introduits et indigènes en pépinières.

- Collection de souches et détermination du spectre d'hôte des souches d'acacias au laboratoire.
- caractérisation symbiotique, microbiologique (phénotypique et génotypique) des souches.
- réinoculation en pépinière en vue de sélectionner des souches très efficaces pour production d'inoculants pépinières.

## Synthèse bibliographique


|   |  |
|---|--|
| <p><b>1.1 Les Caesalpinoidées</b> (environ 157 genres et 2500 espèces) sont essentiellement ligneuses. Leurs feuilles sont généralement composées, pennées ou parfois bipennées, et leurs fleurs sont de formes légèrement irrégulières (Zygomorphes) (Marbberley, 1998). Les caesalpinoidées sont des espèces tropicales retrouvées en Afrique, Asie et Amérique du Sud.</p>   |  <p><b>Bauhinia corymbosa</b><br/>Exemple d'une caesalpinoidée<br/><a href="http://www.ap.ala.org/~bauhinia_g_wedflora.jpg">www.ap.ala.org/~bauhinia_g_wedflora.jpg</a></p> |
| <p><b>1.2 Les Mimosoidées</b> (environ 78 genres et 3000 espèces) comprennent essentiellement des arbres et des arbustes qui se caractérisent par leurs feuilles bipennées très composées et leurs fleurs régulières à symétrie radiale (actinomorphes) (Watson et Dallwitz, 2000). Cette sous-famille comprend quelque 3000 espèces dont les acacias et les mimosas. Les mimosoidées sont des espèces essentiellement tropicales.</p>  |  <p><b>Mimosa pudica</b><br/>Exemple d'une mimosoidée<br/><a href="http://www.oporia-efar.net">www.oporia-efar.net</a></p>   |
| <p><b>1.3 Les Papilionoidées ou faboidées</b> (environ 479 genres et 16500 espèces) se composent surtout de plantes herbacées mais aussi d'arbres ou de lianes ligneuses, aux feuilles simples et aux fleurs très irrégulières (zygomorphes) prenant la forme d'un papillon. Cette sous famille fournit à elle seule le plus grand nombre d'espèces cultivées (Soja, haricot, pois chiche, arachide, luzernes, trèfles...).<br/>Contrairement aux deux autres sous familles, les papilionacées sont présentes essentiellement dans les régions tempérées.</p> |  <p><b>Lotus ornithopoides</b><br/>Exemple d'une papilionoidée<br/>Plants from an African de la pépinière de Binaou<br/>Lahfidia F et al, 2009</p>                        |

Figure 1: Caractéristique des trois sous familles de légumineuse

## 1 - Le macrosymbiote : les légumineuses ou fabales

Cette famille, l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs, renferme 750 genres et environ 18000 espèces (Sprent, 2001). Il s'agit de la troisième plus grande famille d'Angiospermes en nombre d'espèces après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* (Lewis et al., 2005). Ce groupe de plantes qui comprend aussi bien des espèces herbacées que

des espèces ligneuses (arbres, arbustes, arbrisseaux et lianes) est présent sur tous les continents excepté l'antartique. Il constitue le groupe botanique qui fournit le plus d'espèces utiles à l'homme.

Les caractères les mieux partagés par les légumineuses résident dans :

- La nature du fruit qui est une gousse ou légume, représenté par une structure à un seul carpelle, déhiscent par 2 sutures et renfermant une ou plusieurs graines.
- La propriété d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec des bactéries dites BNL (Bactéries Nodulant les Légumineuses) ou rhizobia chez la majorité d'entre elles.

Les fabales sont subdivisées classiquement en trois sous-familles : *Papilionoideae* (**Papilionoïdées**), *Caesalpinioideae* (**Caesalpinioïdées**) et *Mimosoideae* (**Mimosoïdées**) (Lewis et al, 2005) (Fig.1).

Les mimosoïdées qui constituent la deuxième sous famille par ordre d'importance du nombre d'espèces renferment la majorité des légumineuses ligneuses (Watson et Dalwitz, 2000). Cette sous famille qui comporte 6 tribus (Acacieae, Mimoseae, Mimozygantheae, Sophoreae, Ingeae et Parkieae) est dominée par la tribu des Acacieae et le genre acacia représente à lui seul 17% de la biodiversité des mimosoïdées. Ce genre comporte 1350 espèces; il est le deuxième plus grand genre de légumineuse après le genre *Astragalus*.

## 1.1 - Le genre *Acacia*

---

Le genre *Acacia* se distingue des autres genres de la tribu des *Acacieae* par une inflorescence en glomérules capituliformes, globuleux ou en épis, en grappes ou en panicules terminaux (Fig.2C). Les fleurs sont solitaires, géminées ou rarement fasciculées à l'aisselle des feuilles. Les acacias peuvent être inermes ou épineux, à feuilles bipennées ou réduites à un phyllode c'est-à-dire un pétiole qui, par suite de l'avortement du limbe foliaire, s'aplatit et forme une lame qui remplace la feuille.





Des études phylogénétiques portant sur l'analyse cladistique des caractères morphologiques et sur les séquences de l'ADN chloroplastique des acacias indiquent que le genre *Acacia* est un taxon qui n'est pas monophylétique et qu'il est appelé à être scindé, tôt ou tard, en plusieurs genres (Chappill et Maslin, 1995; Grimes, 1999; Robinson et Harris, 2000; Miller et Bayer; 2000, 2001 et 2003, Maslin et al., 2003).

En raison du grand nombre de taxons qu'il renferme, le genre *Acacia* est classiquement subdivisé en 04 groupes : *Phyllodineae*, *Botrycephalae*, *Gummiferae* et *Vulgares* (Maire, 1987).

Ces subdivisions ont été établies sur la base des caractères morphologiques (forme de feuilles) et biochimiques (présence de tanins).

## 1.2 - Le genre *Acacia* en Algérie

La flore d'Algérie comporte près de 22 espèces d'acacias (Maire 1987), parmi lesquelles on peut distinguer:

### 1.2.1 - Les espèces d'Acacias indigènes

Les espèces indigènes, sont décrites dans la flore d'Algérie et sont localisées dans les régions désertiques méridionales. Elles sont représentées selon les flores par 5 espèces : *Acacia ehrenbergiana*, *Acacia tortilis*, *Acacia laeta*, *Acacia seyal* et *Acacia nilotica*. (Tab.1).

Ces espèces indigènes d'acacias sont exclusivement représentées par des acacias des sections des *Gummiferae* (gommiers) et *Vulgares* prédominantes en Afrique (Maire, 1987).

Depuis la publication de la flore de Quezel et Santa (1962), il a été mis en évidence la présence à l'état indigène d'une sixième espèce

| Espèces (nom ILLDIS)   | synonymes              | Section    | origine | remarques  | Statut   |
|--|------------------------|------------|---------|--|--|
| <i>Acacia tortilis</i> ssp.<br>Raddiana (Forssk.)<br>Hayne           | <i>Acacia raddiana</i> | Gummiferae | Afrique | L'espèce est surtout connue sous l'appellation d' <i>A. raddiana</i> qui est considérée aujourd'hui comme une sous espèce de <i>A. tortilis</i>                    | plus représenté au sud d'Algérie surtout à Bechar et Tamansasset (prospection Amrani S et al, 2008). |
| <i>Acacia nilotica</i> (L.)<br>Delile                                | <i>Acacia arabica</i>  | Gummiferae | Afrique | /  | faiblement représenté au sud d'Algérie. (ILLDIS, 2009).  |
| <i>Acacia ehrenbergiana</i><br>Hayne                                 | <i>Acacia flava</i>    | Gummiferae | Afrique | Espèce grégaire colonisant   | Présente au sud d'Algérie (Celles J.C et al, 1980).  |
| <i>Acacia laeta</i> Benth*   | <i>Acacia laeta</i>    | Vulgares   | Afrique | Bien que cette espèce ne soit pas reconnue par ILLDIS comme existante en Algérie, sa présence est rapportée par de nombreuses sources INRF, 2004. Présente au Mali | Présente au sud d'Algérie en plus grand nombre au Hoggar (prospection Amrani S et al, 2006).         |
| <i>Acacia seyal</i> Del  | <i>Acacia fistula</i>  | Vulgares   | Afrique | /  | bien représenté au sud d'Algérie (Celles J.C et al, 1980).   |
| <i>Faidherbia albida</i><br>(Delile) A. Chev<br><i>Acacia albida</i> | <i>Acacia albida</i>   | Vulgares   | Afrique | Cet acacia très connu sous le nom d' <i>A. albida</i> a été transféré au genre <i>Faidherbia</i>   | Plus répandu au nord et au sud d'Algérie (Flore Maire, 1987).  |

**Tableau 1: Liste des espèces d'acacias indigènes à l'Algérie**

\* taxons dont la nomenclature et la présence en Algérie comme espèce indigène n'est pas clairement établie.

*Acacia ehrenbergiana*, qui a été longtemps confondue avec *Acacia seyal* (Celles et Manière, 1980). Par ailleurs, *Acacia albida* longtemps considéré comme un *Acacia* a été classé dans le genre *Faidherbia* (nom conservé). Malgré la découverte d'*Acacia ehrenbergiana*, le nombre d'acacia indigène en Algérie est toujours de 5.

L'aire de répartition des acacias est le Sahara Central, en particulier la région du Hoggar. Cependant, l'action anthropique qui s'est accentuée avec l'essor démographique et le développement des moyens de locomotion, fait que ces espèces sont devenues rares et menacées de disparition. En effet, les acacias sahariens sont utilisés abusivement comme source de bois de chauffe, de bois d'œuvre, de bois pour charbon ou encore comme pâture pour le bétail durant les périodes sèches (Chevallier, 1934).

### **1.2.2 - Les acacias introduits**

Les espèces introduites, représentées par au moins 17 espèces provenant essentiellement d'Australie ont été introduites et acclimatées dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle (Tiedeman, 1992; Maire, 1987 ; Ozenda, 1954 ; Quezel et Santa, 1962 ; Ildis, 2008).

En Algérie, près de 17 espèces d'acacias introduites sont rencontrées (tab.2). 13 espèces proviennent d'Australie et les 4 autres sont originaires d'Amérique du sud et d'Amérique centrale.

Certaines espèces sont rencontrées occasionnellement, telles *Acacia visco*, retrouvées au niveau de certains parcs ou pépinières, mais leur distribution est très faible (*Acacia visco* dont on peut observer un exemplaire au niveau du jardin botanique du Hamma).

Sur les 13 espèces originaires d'Australie, 11 soit près de 84.61%, font partie de la section des Phyllodineae, une section qui se caractérise par un organe photosynthétique modifié, le phyllode. Le phyllode présente un avantage certain par rapport aux feuilles normales; il est plus rustique, il a une plus longue durée de vie et un plus grand pouvoir photosynthétique.

Les avantages procurés par les phyllodes sont en grande partie responsables du succès des espèces de la section des phyllodineae dans les régions sèches du pourtour méditerranéen, du Sahel, du Moyen Orient et d'Afrique du Sud où elles sont très répandues (El-Lakany, 1987).

Les espèces d'acacias introduites présentent de nombreux avantages par rapport aux acacias indigènes en particulier leur croissance rapide et leur propagation facile (Tab.3).

| Espèces (nom ILDIS)                                   | synonymes                    | Section       | Origines  | Statut  |
|---|------------------------------|---------------|-----------|---|
| <i>Acacia saligna</i> (Labill.) Wendl                 | <i>Acacia cyanophylla</i>    | Phyllodineae  | Australie | Largement distribuée et très fréquent (Maire, 1987)                   |
| <i>Acacia longifolia</i> (Andrews) Willd              | <i>Acacia longifolia</i>     | Phyllodineae  | Australie |   |
| <i>Acacia melanoxylon</i> R. Br                       | <i>Acacia melanoxylon</i>    | Phyllodineae  | Australie |   |
| <i>Acacia cultriformis</i> G. Don                     | <i>Acacia cultriformis</i>   | Phyllodineae  | Australie |   |
| <i>Acacia podalyriifolia</i> G. Don                   | <i>Acacia podalyriifolia</i> | Phyllodineae  | Australie | Moins fréquent - usage horticole essais d'acclimatation (Maire, 1987) |
| <i>Acacia cyclops</i> G. Don                          | <i>Acacia cyclops</i>        | Phyllodineae  | Australie |   |
| <i>Acacia retinodes</i> Schldl                        | <i>Acacia retinodes</i>      | Phyllodineae  | Australie |   |
| <i>Acacia decurrens</i> Willd                         | <i>Acacia decurrens</i>      | Botrycephalae | Australie |   |
| <i>Acacia paradoxa</i> DC                             | <i>Acacia armata</i>         | Phyllodineae  | Australie |   |
| <i>Acacia baileyana</i> F. Muell                      | <i>Acacia baileyana</i>      | Botrycephalae | Australie |   |
| <i>Acacia ulicifolia</i> (Salisb.) Court              | <i>acacia juniperina</i>     | Phyllodineae  | Australie |   |
| <i>Acacia pycnantha</i> Benth.                        | <i>Acacia pycnantha</i>      | Phyllodineae  | Australie |   |
| <i>Acacia verticillata</i> (L'Hér.) Willd.            | <i>Acacia verticillata</i>   | Phyllodineae  | Australie |   |
| Acacias introduits à partir d'autres régions du Monde |                              |               |           |   |
| <i>Acacia caven</i> (Molina) Molina                   | <i>Acacia caven</i>          | Gumifera      | Amérique  | Rare (Maire, 1987)  |
| <i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd                   | <i>Acacia farnesiana</i>     | Gumifera      | Amérique  |   |
| <i>Acacia horrida</i> (L.) Willd                      | <i>Acacia horrida</i>        | Gumifera      | Amérique  |   |
| <i>Acacia koa</i> A. Gray                             | <i>Acacia karoo</i>          | /             | Maroc     |   |

**Tableau 2:** Liste des espèces d'acacias introduites en Algérie à partir d'Australie

Ces avantages sont si considérables que ces espèces d'acacias introduites deviennent une composante de plus en plus importante de la flore des légumineuses ligneuses en Algérie au détriment des espèces indigènes.

### 1.3 - Utilisation des acacias australiens en Algérie

La rusticité des Acacias introduits, en particulier ceux de la section *Phyllodineae*, ainsi que leur capacité à former des symbioses fixatrices d'azote les prédisposent à coloniser facilement les milieux défavorables (El-Lakany, 1987 ; Tiedeman et Johnson, 1992).

Cette capacité des acacias australiens est mise à profit en Algérie et dans de nombreuses régions du monde pour:

- le reboisement.
- le boisement d'agrément.
- la fixation des dunes, la lutte contre l'ensablement et la désertification.

- l'utilisation des acacias comme haies vives, brise vent, plants d'ombrage, écrans visuels...
- la lutte contre l'érosion au niveau des collines des accotements routiers et autoroutiers.
- la revégétation des aires dégradées (brûlis, décharges, municipales, explorations minières ou carrières).

Cette utilisation massive des acacias australiens induit des avantages indirects non négligeables comme :

- L'utilisation du bois par les populations comme bois d'œuvre, bois de feu ou pour la production de charbon.
- L'utilisation des feuilles comme pâture par les animaux d'élevage en particulier les ovins et les caprins.

Les avantages de l'utilisation des Acacias australiens ne doivent pas occulter les dangers que peuvent présenter les espèces introduites pour la flore, la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes locaux. En effet, les espèces introduites qui présentent des avantages adaptatifs, comme c'est le cas pour les acacias australiens, peuvent se révéler catastrophiques pour le milieu en raison de leur propension à être invasives lorsqu'elles arrivent à se reproduire naturellement dans les zones d'introduction. C'est le cas par exemple d'*Acacia saligna* en Afrique du Sud qui a colonisé en quelques années des hectares, en provoquant la destruction des écosystèmes locaux. Elle est considérée comme la pire catastrophe biologique que le pays ait connue.

## 2 - Le microsymbionte

### 2.1 - Les bactéries nodulant les légumineuses (BNL)

---

On désigne par bactéries nodulant les légumineuses (BNL) ou Rhizobia toute bactérie capable de former une symbiose se traduisant, par la formation sur les racines ou plus rarement sur les tiges ou les feuilles d'une légumineuse, d'un organe particulier (le nodule ou nodosité) capable de fixer ou de réduire l'azote moléculaire.

Longtemps les BNL ont été limités à 1 genre (*Rhizobium*), puis à deux genres (*Rhizobium* et *Bradyrhizobium*) et uniquement à la classe des  $\alpha$ -protéobactéries et à la famille des Rhizobiaceae.

Les BNL sont représentées aujourd'hui par une douzaine de genres et près de 65 espèces. Les BNL font partie de la classe des  $\alpha$ -protéobactéries, famille des Rhizobiaceae, [Phyllobacteriaceae](#) , [Bradyrhizobiaceae](#) , [Brucellaceae](#) , [Methylobacteriaceae](#) et, [Hyphomicrobiaceae](#) mais aussi de celle des  $\alpha$ -protéobactéries faisant partie de la famille des Burkholderiaceae, [Oxalobacteraceae](#) , et dont on a découvert récemment des représentants capables de noduler les légumineuses, en particulier des Mimosoïdées de la tribu des Mimosaceae très proches des Acacias (Willems,2006).

La propriété d'induire la nodulation existerait également chez les  $\alpha$ -protéobactéries par acquisition verticale ou horizontale de gènes (Benhizia et Squatrini, 2004) mais aucune preuve expérimentale n'a encore été rapportée jusqu'ici. La classification des BNL a subi

de nombreuses modifications ces dernières années et les propositions de remaniements futurs sont nombreux (Tab.4).

## **2.2 - Les BNL associées aux Acacias**

---

Les travaux portant sur la prévalence de la symbiose a Rhizobia chez les Acacias dans différentes partie du monde ont permis de montrer que la grande majorité des espèces sont capables de former une symbiose fixatrice d'azote avec les BNL. Sur les 1350 espèces d'acacias qui existent, seule une vingtaine d'espèces seraient réfractaires à la nodulation (Leary et al, 2006).

La nature des Rhizobia capables de noduler les représentants du genre Acacia est très diversifiée et varie en fonction de la plante hôte et de la région géographique considérée (tab.5). Cependant, le genre Acacia est nodulé par les souches d'au moins 4 genres de BNL : les genres Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium et Sinorhizobium (Leary et al, 2006).

En fonction de la nature des Rhizobia avec lesquels ils peuvent s'associer, les acacias sont souvent subdivisés en trois groupes :

**Tableau 4 : Evolution de la classification et du nombre de genres et d'espèces de BNL.**

## Caractérisation des rhizobia de quelques acacias d'Algérie en vue de la production d'inoculum pour la bactérisation des acacias en pépinières

| Historique   | Publication originale   | Genre | Espèce |
|--|---|-------|--------|
| Découverte de <i>Bacillus radicola</i>   | Beijerinck, 1888  | 1     | 1      |
| Utilisation du nom <i>Rhizobium</i>  | Frank, 1889 Fred et al, 1932  | 1     | 1      |
| décrit les BNL sous un nom de genre unique <i>Rhizobium</i> et distingue des populations à croissance rapide et des populations à croissance lente X espèces             | Jordan, 1982  | 1     | 5      |
| scinde le genre <i>Rhizobium</i> en 2 genres : le genre <i>Rhizobium</i> et le genre <i>Bradyrhizobium</i> qui regroupe les Rhizobia à croissance lente                  | Jordan, 1984  | 2     | 6      |
| Le non du genre <i>Rhizobium</i> était le premier nom donné par Frank  | Frank, 1989   |       |        |
| Des représentants du genre <i>Rhizobium</i> sont transférés à deux nouveaux genres : <i>Sinorhizobium</i> et <i>Mesorhizobium</i>  | Chen et al, 1988 Nour et al, 1994   | 4     | 8      |
| Les rhizobia responsables de la formation de nodules caulinaires chez quelques légumineuses tropicales sont classées dans un nouveau genre, le genre <i>Azorhizobium</i> | Dreyfus et al, 1988   | 5     | 19     |
| Les rhizobia nodulant la lég tropicale <i>Neptunia natans</i> sont classés dans un nouveau genre, le genre <i>Allorhizobium</i>  | De lajudie et al, 1998  | 6     | 29     |
| les représentants du genre <i>Agrobacterium</i> dans la famille des Rhizobiacées bien que ces derniers ne soient pas nodulants   | Farrand et al, 2003   | 7     | 34     |
| Découverte de $\beta$ proteobactérie de genre <i>Methylobacterium</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Devosia</i> , <i>Herbaspirillum</i>                  | Sy et al, 2001 Chen et al, 2001 Moulin et al, 2001 Rivas et al, 2002 Valverde et al, 2003 | 12    | 62     |
| Renommée les <i>Sinorhizobium</i>  | Young et al, 2003   |       |        |
| Découverte d'espèces non nodulantes ( <i>Bradyrhizobium. betae</i> , <i>Bradyrhizobium. iriomotense</i> ...)   | Rivas et al, 2004 Islam et al, 2008   | 12    | 64     |
| Total  |   | 12    | 64     |

- Les acacias qui ne nodulent qu'avec les Rhizobia à croissance lente appartenant au genre *Bradyrhizobium*.
- Les acacias qui ne nodulent qu'avec les rhizobia à croissance rapide des genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium*.
- Les acacias qui nodulent indifféremment avec les rhizobia à croissance lente et à croissance rapide.

Les espèces d'acacias d'origine australienne sont beaucoup moins spécifiques dans le choix de leur partenaire symbiotique que les acacias africains. Cette propriété leur confère la capacité de pouvoir contracter une symbiose fixatrice d'azote avec un plus grand panel de Rhizobia que les espèces africaines. Cette promiscuité des espèces australiennes vis-à-vis des rhizobia est en partie responsable de leur capacité de colonisation des milieux les plus défavorables.

## 2.3 - Etablissement de la symbiose

---

L'interaction symbiotique entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les plantes de la famille des Légumineuses se traduit par la formation d'organes spécifiques, appelés nodules ou nodosités, où les bactéries sous leur forme différenciées, fixent et réduisent l'azote moléculaire en ammoniac.

L'établissement de la symbiose et la formation du nodule sont les résultats d'un dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques. Ce dialogue généré dans le sol rhizosphérique implique la reconnaissance spécifique entre le *Rhizobium* et sa légumineuse hôte. Dans la rhizosphère, la plante exsude des substances nutritionnelles qualitativement et quantitativement variées (sucres, acides aminées...), notamment des isoflavonoïdes (Siqueira et al., 1991; Oldryod, 2001). Ces substances constituent le premier message aux bactéries ; elles agissent comme signal déclenchant la cascade des événements menant à la formation du nodule (Phillips et Tsai, 1992). Ces isoflavonoïdes, différents d'une légumineuse à une autre (Barbour et al., 1991 ; Truchet et al. 1993; Dakora, 2000; Phillips, 2000), jouent un rôle important dans l'attraction des Rhizobia (Aguilar et al., 1988; Kape et al., 1991; Caetano-Anollés et al., 1992).

Dans ces conditions, les *Rhizobium* se multiplient activement en catabolisant les substances exsudées et répondent par chimiotactisme en se déplaçant vers le système racinaire de la plante hôte.

## Caractérisation des rhizobia de quelques acacias d'Algérie en vue de la production d'inoculum pour la bactérisation des acacias en pépinières

| Auteurs                       | Acacias concernés        | Régions géographiques | Souches prédominantes                         |
|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|---|
| Norris, 1961                  | Australiens              | Australie             | Rhizobia à croissance lente                   |
| Trinick, 1980                 | <i>A. farnesiana</i>     | Amérique              | Rhizobium à croissance rapide                 |
| Dreyfus et Dommergue, 1981    | <i>A. nilotica</i>       | Afrique               | Rhizobium à croissance rapide                 |
| Dryfus et Dommergue, 1981     | <i>A. senegal</i>        | Afrique               | Rhizobium à croissance rapide                 |
| Dryfus et Dommergue, 1981     | <i>A. seyal</i>          | Afrique               | Bradyrhizobium et rhizobium                   |
| Dryfus et Dommergue, 1981     | <i>A. sebiriana</i>      | Afrique               | Bradyrhizobium                                |
| Dryfus et Dommergue, 1981     | <i>A. tortilis</i>       | Afrique               | Rhizobium à croissance rapide                 |
| Halliday et Somasegaran, 1983 | <i>A. mearnsii</i>       | Australie             | Bradyrhizobium et rhizobium                   |
| Barnet et al, 1985            | <i>A. longifolia</i>     | Australie             | Bradyrhizobium                                |
| Roughley, 1987                | <i>A. dealbata</i>       | <i>A. dealbata</i>    | Bradyrhizobium et rhizobium                   |
| Roughley, 1987                | <i>A. decurrens</i>      | Australie             | Bradyrhizobium et rhizobium                   |
| Roughley, 1987                | <i>A. holosericea</i>    |                       | Bradyrhizobium et rhizobium                   |
| Olivares et al, 1988          | <i>A. saligna</i>        | Australie             | Bradyrhizobium                                |
| Frioni et al, 1988            | <i>A. caven</i>          | Amérique du Sud       | Souches à croissance rapide et lente          |
| Galiana et al, 1990           | <i>A. auriculiformis</i> | Afrique               | Bradyrhizobium                                |
| de Lajudie et al, 1994        | <i>Acacias sp</i>        | /                     | Sinorhizobium saheli                          |
| de Lajudie et al, 1994        | <i>Acacias sp</i>        | /                     | Sinorhizobium teranga                         |
| de Lajudie et al, 1994        | <i>Acacias sp</i>        | /                     | Mesorhizobium plurifarum                      |
| De lajudie, 1994              | <i>A. karroo</i>         | Afrique               | Sinorhizobium                                 |
| De lajudie, 1994              | <i>A. laeta</i>          | Afrique               | Sinorhizobium                                 |
| Galiana et al, 1996           | <i>A. mangium</i>        | Australie             | Bradyrhizobium japonicum et Bradyrhizobium sp |
| de Lajudie et al, 1998b       | <i>Acacias sp</i>        | /                     | Mesorhizobium plurifarum                      |
| de Lajudie et al, 1998b       | <i>A. tumida</i>         | Afrique               | Bradyrhizobium et rhizobium                   |
| Nick et al, 1999              | <i>A. senegal</i>        | Afrique               | Sinorhizobium arboris                         |
| Nick et al, 1999              | <i>A. senegal</i>        | Afrique               | Sinorhizobium kostiense                       |
| Ngom et al, 2004              | <i>Acacia mangium</i>    | Australie             | Ochrobactrum sp                               |

**Tableau 5 :l'histoire de la découverte des souches de rhizobia associées aux acacias**

A ce niveau l'expression d'une série de gènes de nodulation nod, est induite chez les *Rhizobium* compatibles. Ces gènes plasmidiques et/ou chromosomiques, sont responsables de la synthèse de substances spécifiques de nature lipo-oligosaccharidiques (LCO) appelés Facteur Nod (Fisher, 1994).

La nodulation est un phénomène spatiotemporel très complexe qui peut être résumé schématiquement en 4 phases (Fig.3):

### 2.3.1 - La reconnaissance spécifique entre la bactérie et la plante hôte

fait intervenir un échange de signaux moléculaires représentés chez la plante par les isoflavonoïdes et chez les *Rhizobium* par les Facteurs Nod. L'attachement des *Rhizobium* à la racine fait intervenir une glycoprotéine d'origine végétale «la Lectine» qui se trouve sur le poil absorbant ainsi que les exopolysaccharides des *Rhizobium*. Cet attachement sur la plante hôte serait irréversible (Broughton et Perret, 1999; Sprent, 2001).



### **2.3.2 - Infection du système racinaire**

Lors de cette phase, les *Rhizobium* pénètrent via le poil absorbant dans les cellules des racines de l'hôte. La pénétration se fait par les cordons d'infections, dont la paroi est d'origine végétale (Ridge, 1992; Parniske, 2000).

### **2.3.3 - La nodulation proprement dite**

consiste en l'induction par le Facteur Nod chez la plante, de la dédifférenciation de quelques cellules corticales en un méristème nodulaire (Geurts et Franssen, 1996). Ce dernier, en division active donne naissance à un primordium

La compartimentation des bactéroïdes permet leur isolement du cytoplasme hôte pour créer un environnement adéquat au fonctionnement de la nitrogénase, notamment la protection de l'enzyme contre les pressions élevées en oxygène (Hacker et al, 2001). Elle serait aussi liée au contrôle de l'interaction symbiotique par le macrosymbionte (Corzo et al., 1997).

### **2.3.4-La multiplication des cellules du primordium**

permet l'émergence du nodule à la surface de la racine. De manière concomitante, les bactéries se divisent et se différencient en bactéroïdes prenant différentes formes en X, Y, raquette.... A ce stade, les bactéroïdes vont pouvoir synthétiser la «Nitrogénase», enzyme de réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac. Dans les cellules végétales, les bactéroïdes seuls ou regroupés en îlots, sont entourés d'une membrane pér bactéroïdes d'origine végétale formant le symbiosome, l'unité fondamentale de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse (Elmerish, 1997; Parniske, 2000). Les deux symbiotes coopèrent pour produire la leghémoglobine, une hémoprotéine, dont la fraction protéique est

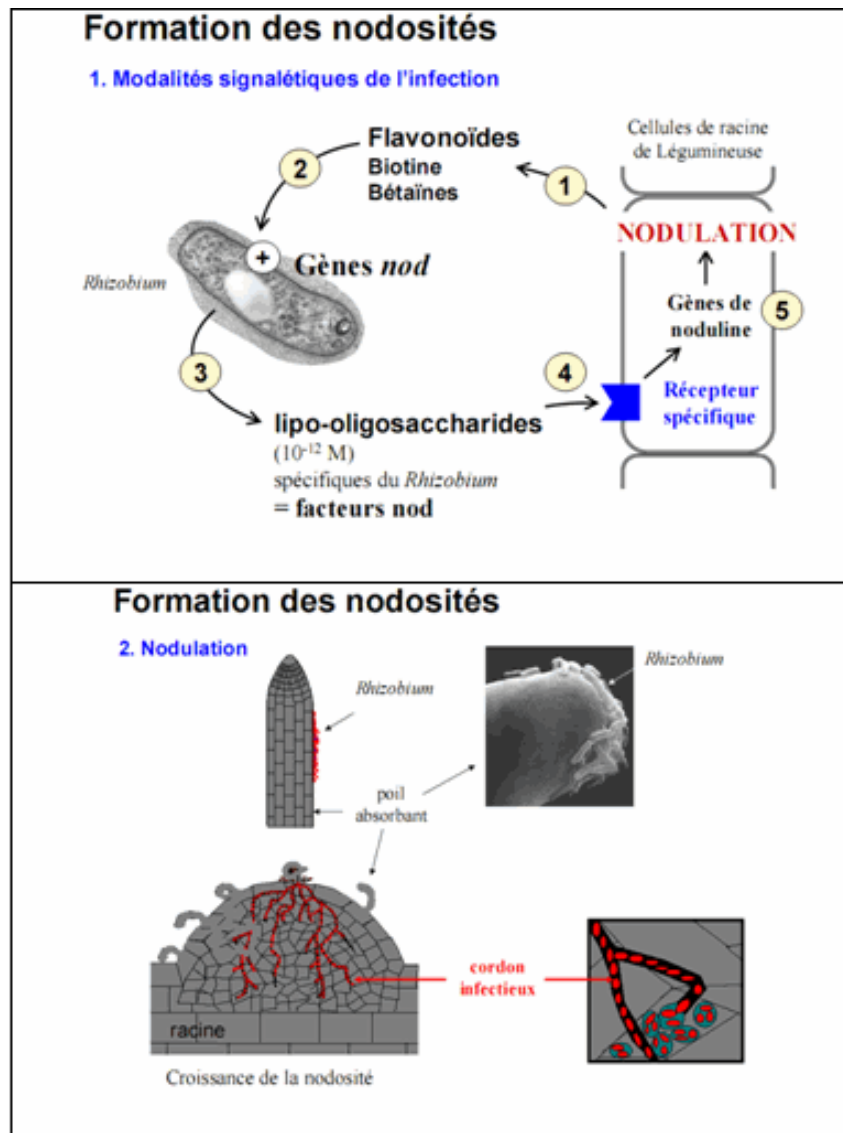


Figure 3 : Etapes de la formation des nodules.

<http://srv2.lycoming.edu/~newman/research/nodula2b.gif> synthétisée par la plante hôte et l'hème -fer- est fourni par le bactéroïde (Drevon et Serraj, 1995). La leghémoglobine joue le rôle de régulateur de la pression partielle en oxygène dans les symbiosomes. Elle permet la respiration des bactéroïdes sans risque de dénaturer la nitrogénase, très sensible à l'oxygène (Gualtieri et Bisseling, 2000).

## 2.4 - Structure du nodule

Les nodules sont des structures qui se développent sur les racines, les tiges et parfois sur les feuilles. L'étude histologique d'une coupe du nodule révèle une organisation tissulaire composée de (Fig.4):

- **Un tissu périphérique** formé par un cortex, un endoderme et des bandes vasculaires. Il délimite une zone centrale.

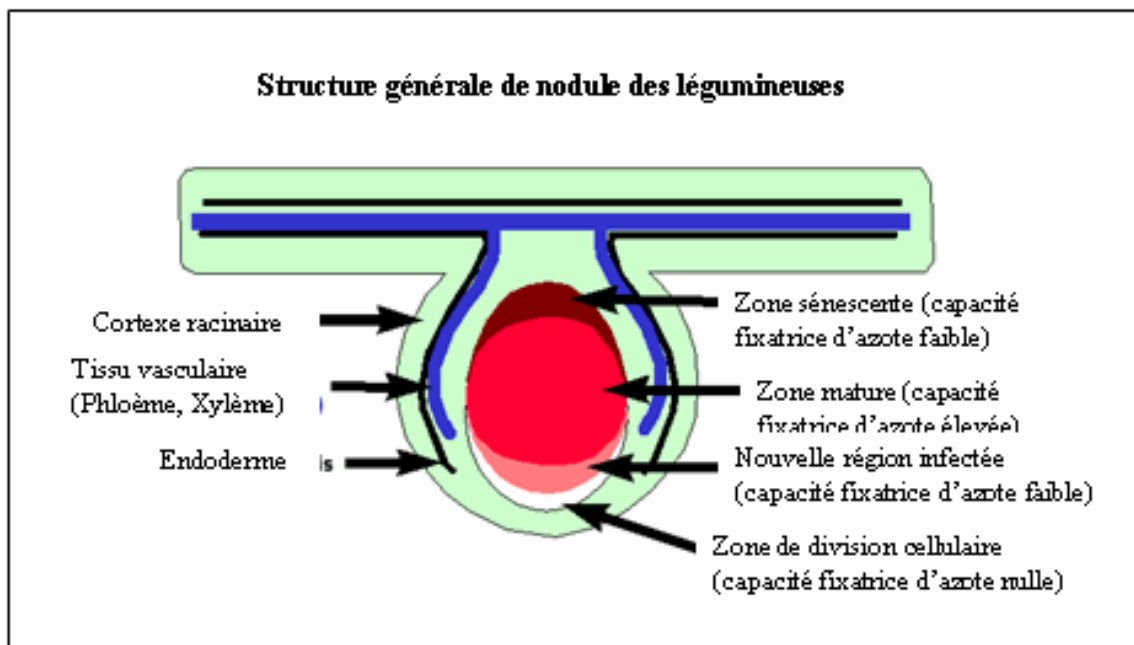
- **Un tissu central** de couleur rose-rouge due à l'accumulation de la leghémoglobine. Il est formé d'un ensemble de cellules végétales envahies par les bactéroïdes.

Sur la base de leur morphologie, leur structure et la durée du fonctionnement du méristème nodulaire, les nodules des légumineuses se subdivisent en deux catégories : les nodules déterminés et les nodules indéterminés.

- **Les nodules indéterminés.** Les tissus des nodules à structure indéterminée sont générés à partir du cortex **interne** de la racine. Ce type de nodule présente un méristème nodulaire dont l'activité mitotique persiste après l'infection par le *Rhizobium*. Il se présente sous une forme allongée et se retrouve généralement chez les légumineuses des zones tempérées (Trèfles, luzernes, lentille, pois...).
- **Les nodules déterminés.** Dans ce cas, les tissus des nodules à structure déterminée sont générés à partir du cortex **externe** de la racine. Ce type nodulaire possède un méristème dont l'activité mitotique s'arrête juste après l'infection par le *Rhizobium* formant ainsi des nodules sphériques rencontrés généralement chez les légumineuses des régions tropicales ou originaires de celles-ci (Soja, Vigna, Haricot...).

## 2.5 - Les particularités de la nodulation et de la fixation d'azote chez les arbres

D'une façon générale, il est difficile d'observer la nodulation des arbres dans la nature. Les nodules sont souvent très petits (quelques millimètres), parfois difficiles à distinguer d'une racine, et il est délicat d'apporter la preuve qu'une racine nodulée trouvée dans le sol à proximité d'un arbre appartient de fait à cet arbre



**Figure 4** : Schéma générale de la structure de nodule des légumineuses (Hirsch, 1992).

Cette difficulté de trouver des nodules d'arbres dans la nature oblige à trouver un biais pour isoler des rhizobiums : la plupart des souches d'arbres sont isolées au laboratoire par piégeage sur une plante hôte en présence d'échantillons de sols prélevés dans la nature, généralement sous l'arbre d'intérêt.

La nodulation des arbres en général et des acacias en particulier présente une caractéristique fondamentale que l'on ne retrouve pas chez les plantes annuelles, à savoir le caractère persistant des nodules.

Les nodules des arbres sont souvent pérennes et lignifiés (nodules de certains *Acacia*, *Albizzia*, *Prosopis*) ce qui leur confère trois avantages :

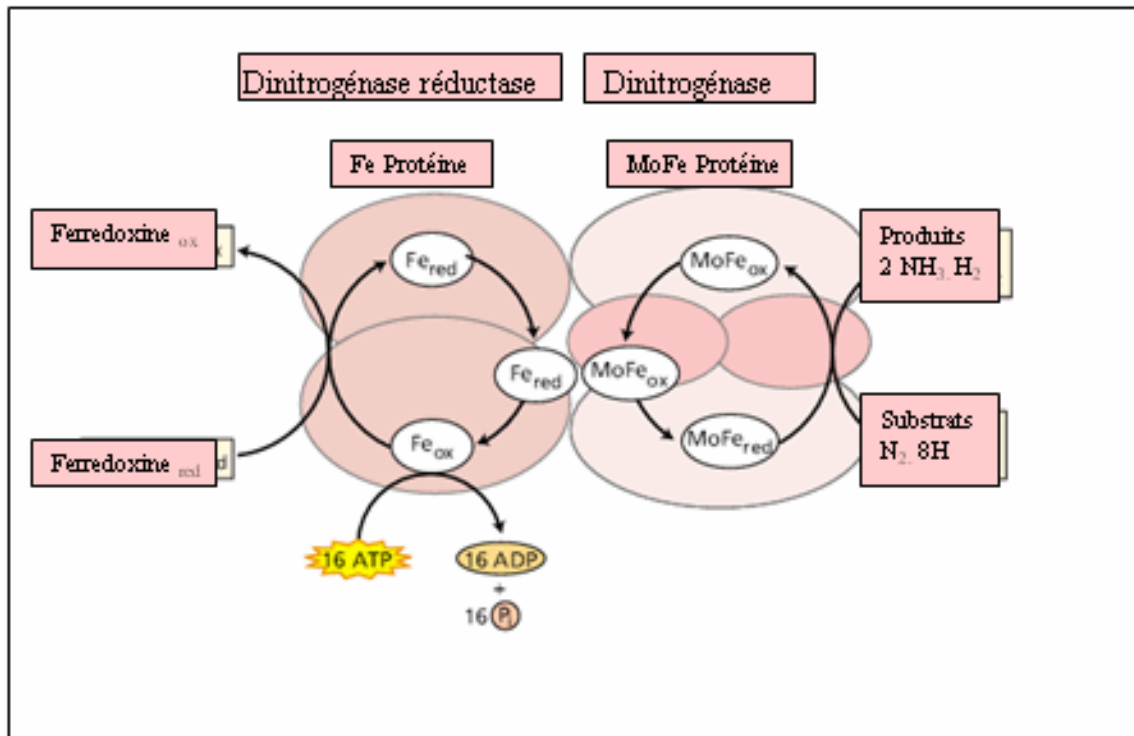
- Ils restent actifs assez longtemps après l'arrêt des pluies, même lorsque le sol qui les entoure est sec.
- Ils survivent à l'état de vie ralentie pendant la saison sèche et dès que l'humidité du sol est à nouveau suffisante, ils peuvent former des nouveaux lobes fonctionnels à partir des tissus préexistants. Cette repousse des lobes demande moins de temps et est moins exigeante en humidité qu'une nouvelle infection (Reddell, 1993).
- Lorsqu'ils résultent d'une inoculation avec une souche sélectionnée, ils assureraient la survie de cette souche et son maintien dans le sol, même en présence d'autres souches.

## **2.6 - La fixation biologique de l'azote atmosphérique**

---

La fixation biologique ou la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac est une propriété d'un groupe de procaryotes dits diazotrophes. Elle résulte de l'activité d'une enzyme conservée chez les fixateurs libres et symbiotiques : **la nitrogénase** (Fig 5).

La nitrogénase est une hétéroprotéine synthétisée par un ensemble de gènes plasmidiques ou chromosomiques : les gènes *nif*, *fix*. C'est un complexe enzymatique classé parmi les oxydoréductases (Kim et al., 1994). Elle est composée de deux protéines auxquels s'ajoutent du fer, du soufre et du molybdène. Ce schéma commun rencontré chez les *Rhizobium*, les *Clostridium* et les *Azotobacter*, présentes quelques différences structurales selon les genres de bactéries. Chez les *Rhizobium*, la nitrogénase est constituée de :

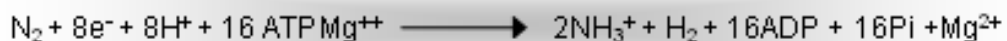


**Figure 5 :** Représentation schématique du fonctionnement du complexe nitrogénase.

<http://www.soils1.cses.vt.edu/djp/4344hp/4344handout/unit3/Nfix4ppt.pdf>

- La dinitrogénase ou monitrogénase, ou composé (I). C'est un tétramère protéique ayant du molybdène, du fer et du soufre comme cofacteurs. Elle contient le site catalytique de la réduction de l'azote atmosphérique. (Eady, 1986; Newton, 1993; Dommergues et al., 1999).
- La dinitrogénase réductase ou composant (II). C'est un dimère protéique contenant du fer et du soufre comme cofacteur. Elle assure le transfert des électrons, à partir d'un donneur (la ferrédoxine red), vers la monitrogénase. (Newton, 1993; Elmerich, 1997)

Lors du fonctionnement de la nitrogénase, une série de réactions d'oxydoréduction se déroule dans la cellule du bactéroïde, entre la ferrédoxine, comme donneur d'électron, et l'azote moléculaire, comme accepteur final d'électron (Kim et al, 1994). En plus des électrons, l'énergie ( $Mg^{++}ATP$ ) et les protons sont des éléments indispensables au fonctionnement de la nitrogénase pour réaliser la réduction de l'azote moléculaire.



Ce processus est relativement coûteux en énergie et les organismes fixateurs d'azote ont développé des relations plus ou moins étroites avec les plantes pour assurer l'approvisionnement en énergie nécessaire à la diazotrophie.

La fixation de l'azote chez les arbres varie tout au long de sa vie. Insignifiante lorsque l'arbre est de toute petite taille, cette activité augmente plus au moins rapidement au fur et à mesure de la croissance du végétal.

On distingue deux types de fixation d'azote :

- la fixation de  $N_2$  potentielle, en d'autres termes l'aptitude d'un système fixateur à fixer  $N_2$  en absence de tout facteur limitant.
- la fixation de  $N_2$  réelle, c'est-à-dire de la fixation effective de  $N_2$  en présence des facteurs limitant qui interviennent presque toujours en milieu naturel.

L'azote fixé par les AFN (arbres fixateurs d'azote) est transféré au sol et aux plantes associées par l'intermédiaire de la litière. Une partie de  $N_2$  fixé est perdue par dénitrification.

### **3- Importance et intérêt de l'inoculation des arbres en pépinières**

Les avantages que procurent les légumineuses grâce à leur pouvoir de fixer l'azote moléculaire ne sont valables que si elles sont nodulées et efficaces. Ceci est particulièrement crucial pour les arbres fixateurs d'azote dont une partie du cortège nodulaire est constitué de nodules pérennes (Dommergues, 1999). Dans ces conditions, la nodulation des arbres fixateurs d'azote au cours des tout premiers stades de développement est cruciale pour la production en pépinière, de plants efficaces qui exprimeront pleinement leur potentiel symbiotique lors de leur transfert au niveau des aires de plantation.

C'est pour cette raison que l'on procède souvent à l'inoculation des AFN par des souches de Rhizobia à fort pouvoir fixateur d'azote au niveau des pépinières (Revellin et al., 1996). Cela permet de produire des plants nodulés et efficaces qui pourront exprimer leur potentiel fixateur d'azote dans les zones de plantation. Ceci est d'autant plus important que dans la plupart des cas, les zones de plantations sont des aires dégradées dont les sols ne renferment pas toujours une microflore rhizobienne assez abondante et diversifiée pour assurer la nodulation efficace des légumineuses.

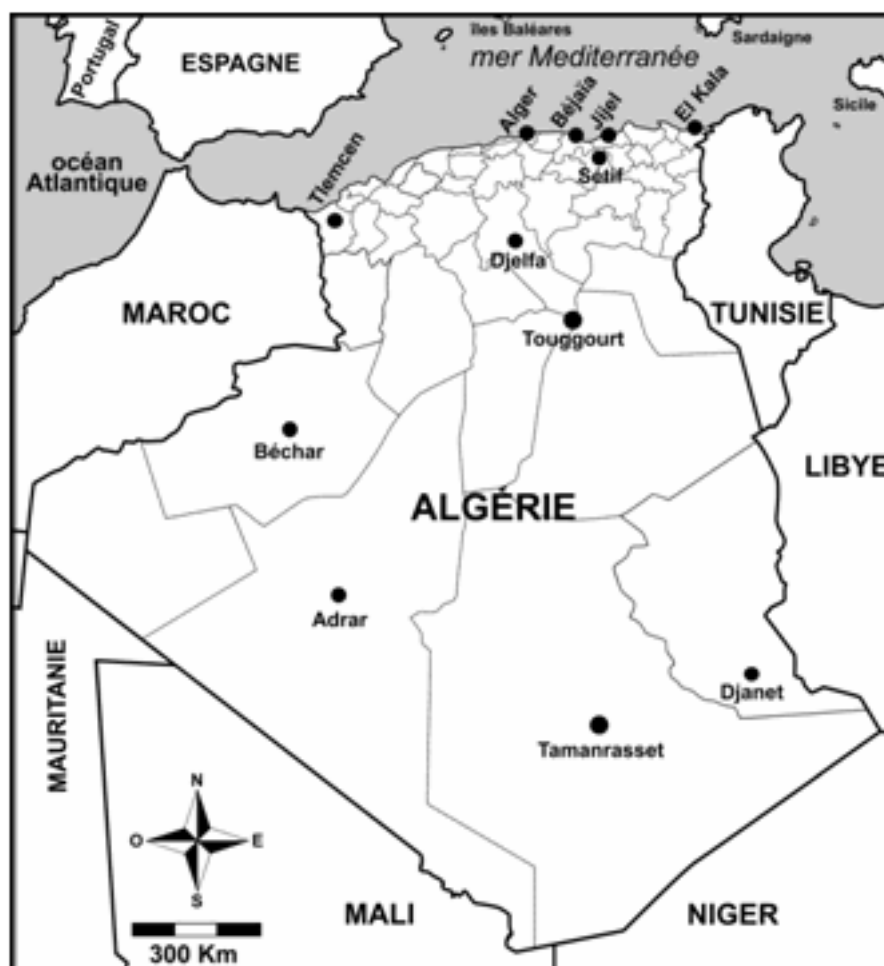
L'inoculation est une technique simple et bon marché qui consiste à mettre en présence d'une légumineuse les cellules d'une ou de plusieurs souches de Rhizobia compétentes sélectionnées pour leur haut potentiel fixateur d'azote avec la plante cible. Cette inoculation est réalisée au cours des tous premiers stades de développement de la plante c'est-à-dire durant la période où elle est susceptible à la nodulation.

L'inoculation est pratiquée le plus souvent chez les espèces herbacées annuelles comme par exemple le soja, le haricot et de nombreuses autres légumineuses herbacées mais aussi chez des espèces ligneuses. Elle permet dans le cas de ces cultures d'assurer une bonne efficacité aux plantes et de se passer dans une grande mesure de l'utilisation des engrais azotés.

L'inoculation est cependant plus importante chez les légumineuses ligneuses, en particulier celles qui ont été introduites. En effet, en raison du caractère permanent de ces espèces ainsi que de leur propagation exclusive par le biais des pépinières comme c'est le cas en Algérie, il est crucial de produire, durant les premiers mois de développement de ces arbres, des plants nodulés et efficaces.

Plus tard, en raison de la lignification rapide des racines et de la probable pauvreté de la flore rhizobienne des aires de plantation, la nodulation a peu de chance d'avoir lieu et l'arbre risque de demeurer durant toute sa vie non-efficent.

## Matériel et Méthodes



*Figure 6: Position des localités de prélèvement des échantillons d'acacias utilisés pour la collection des souches.*

(Lebbida F et al, 2009).

## 1- Matériel végétal

### 1.1 - Plants d'acacias

Les différentes espèces d'Acacia utilisées dans le cadre de ce travail proviennent de plants âgés de 18 à 22 semaines produits en sachets de polyéthylène à partir de graines sur un substrat composé d'un mélange à parts égales de sol provenant de la pépinière ou de ses environs immédiats, de terreau et de sable de rivière.



Les espèces d'acacias étudiées sont :

- les trois espèces d'acacias introduites les plus fréquentes : *Acacia saligna*, *acacia longifolia* et *Acacia melanoxydon*.
- Les trois espèces d'acacias considérées comme indigènes à l'Algérie : *Acacia ehrenbergiana*, *Acacia nilotica*, *Acacia tortilis*.
- Trois espèces d'acacias indigènes (natif) utilisées pour la prévalence en pépinières et pour l'extraction de souches associées à ces espèces: *Acacia laeta*, *acacia seyal* et *Acacia albida*.

Les plants ont été recueillis en fonction des disponibilités, en particulier dans le cas des espèces introduites, au niveau de 12 pépinières situées au Nord de l'Algérie (Alger, Bejaia, El Kala, Jijel, Sétif et Tlemcen) et au Sud du pays (Adrar, Béchar, Djelfa, Djanet, Tamanrasset et Touggourt) (Fig.6).

## 1.2 - Semences

Les graines des espèces d'acacias utilisées au laboratoire pour la production de plantules axéniques nous ont été fournies par l'Institut National de Recherche Forestière – Arboretum de Bainem - Alger (INRF). Les graines ont été triées sur la base de la couleur, de la forme et de la taille. La classe la plus représentative a été retenue pour notre travail.

**Tableau 6: Provenance et dates de récolte des semences des diverses espèces d'Acacias utilisées dans le cadre de cette étude.**

| Les semences                | Provenance               | Date de récolte | Origine   |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------|-----------|
| <i>Acacia nilotica</i>      | Tiguanouene(Tamanrasset) | 2004            | Indigène  |
| <i>Acacia tortilis</i>      | Anfegue (Tamanrasset)    | 2005            | Indigène  |
| <i>Acacia ehrenbergiana</i> | Ahaggar (Tamanrasset)    | 2005            | Indigène  |
| <i>Acacia saligna</i>       | Cité Malki (Alger)       | 2007            | Australie |
| <i>Acacia longifolia</i>    | Blida (Algerie)          | 2004            | Australie |
| <i>Acacia melanoxydon</i>   | Forêt Bainem (Alger)     | 2005            | Australie |

## 1.3 - Milieux de culture

Pour la culture et la purification de nos souches de Rhizobia, nous avons utilisé le milieu **Yeast Extract Mannitol (YEM) (Vincent, 1970)** qui est un milieu spécifique aux Rhizobia. (**Annexe 1**)

Lorsque la version solide ou semi-solide de ce milieu est requise, nous ajoutons à la composition de base respectivement 15 et 7g d'Agar-Agar. Nous désignerons la version liquide par "Milieu YEMB", la version solide par "Milieu YEMA". Le milieu YEM est additionné de 9 mL d'une solution de rouge Congo à 0,25%, ce qui permet de détecter d'éventuelles contaminations. En effet, en présence de rouge Congo, les colonies de Rhizobian'absorbant généralement pas ce colorant, forment des colonies blanchâtres, rosées ou orangées alors que les contaminants forment des colonies rouges en raison de la forte absorption de rouge Congo (**Vincent, 1970**).

Pour la culture et la conservation à court terme des souches de Rhizobium, nous avons utilisé le milieu **Tryptone Yeast Extract (TYE) ( Annexe 2)**

La composition du milieu utilisé pour la conservation des souches est en **annexe 3**

Pour la caractérisation phénotypique des souches de Rhizobia, nous avons adopté le milieu de culture préconisé par Amarger, 1997 (**Annexe 4**).

## **2 - Méthodes d'étude**

### **2.1 - Evaluation de la prévalence de la nodulation et de la fixation d'azote chez les acacias**

---

Pour l'évaluation de la prévalence de la symbiose à Rhizobia chez les acacias, nous avons menés des prospections au niveau de 12 pépinières réparties sur l'ensemble du territoire national.

Au niveau de chaque pépinière, 12 plants de chacune des espèces produites ont été examinés pour vérifier la présence de nodules sur leur système racinaire et l'efficacité de ces derniers, c'est-à-dire leur capacité à réduire l'azote moléculaire.

L'espèce est considérée comme étant nodulée si au moins un individu sur les 12 plants, présente un nodule au minimum.

Pour la vérification de l'efficacité, nous procédons à une coupe transversale du nodule et vérifions si son centre présente une coloration rose ou rouge qui indique la présence de légghémoglobine, une hémoprotéine qui n'est produite que par les nodules fixateurs d'azote (Dommergues, 1998).

### **2.2 - Extraction, isolement et purification des souches**

---

Pour l'extraction, l'isolement et la purification des souches, les méthodes adoptées sont celles préconisées par l'International Biological Program (Vincent, 1970).

#### **2.2.1 - Extraction**

L'extraction est réalisée dans des conditions d'asepsie à partir d'un nodule dont la surface est préalablement stérilisée par immersion dans de l'éthanol à 95° pendant 30 secondes puis dans une solution de chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub> à 0.1%) pendant 3 mn suivie d'un rinçage dans 6 bains successifs d'eau distillée stérile afin d'éliminer les traces d'HgCl<sub>2</sub> très toxique. Le nodule ainsi traité est écrasé à l'aide d'une tige en verre dans 0,5 mL d'eau physiologique stérile (NaCl 8,5‰), pour libérer les bactéroïdes qu'il renferme. aliquotes du broyat ainsi obtenu sont ensemencées sur milieu YMA en boîte de Pétri. Après trois à huit jours d'incubation à 25°C, les colonies bactériennes présumées appartenir aux Rhizobia, sont reconnaissables par leur prédominance, leur non absorption du rouge Congo ainsi que par leur aspect gommeux et translucide. Nous avons sélectionné le type colonial le plus représentatif pour procéder à la purification des souches par repiquages successifs sur milieu YMA.

La pureté des isolats est vérifiée par observation microscopique des cellules à l'état frais et sur des frottis colorés selon la technique de Gram (Vincent, 1970).

---

Une fois purifiées, les souches isolées sont conservées à 4°C en tubes à essai sur milieu YMA incliné.

### 2.2.3 - Conservation des souches

Deux méthodes de conservation des souches bactériennes ont été utilisées :

- **Conservation à court terme à 4°C en tubes à essai contenant le milieu YEM solide incliné**. Cette méthode est utilisée dans le cas des sous collections de travail ; les souches sont remises en circulation au moins une fois par an à partir de cryoconservats.
- **Conservation à long terme (4 à 10 ans)**. Cette méthode consiste en une congélation des souches à -20°C dans des cryotubes contenant un milieu de cryoconservation à base de glycérol (qui est un cryoprotecteur).

## 2.3 - Détermination des caractéristiques symbiotiques des souches associées aux acacias

---

L'authentification et la détermination du spectre d'hôte des isolats bactériens extraits à partir des nodosités des acacias ont été réalisées au laboratoire par réinoculation des souches à des plantules axéniques de 6 espèces d'acacias, *A. saligna*, *A. melanoxylon*, *A. longifolia*, *A. ehrenbergiana*, *A. nilotica* et *A. tortilis*.

### 2.3.1 - Culture de plantules d'acacia en conditions axéniques

#### 2.3.1.1 - Scarification des semences

Nous avons procédé à la scarification des graines en pratiquant à l'aide d'une lame à des incisions du tégument, au niveau du côté opposé au micropyle, en évitant de toucher l'embryon et l'albumen de la graine.

#### 2.3.1.2 - Désinfection superficielle des semences

La stérilisation superficielle des semences est assurée par immersion des graines dans de l'éthanol à 90° durant 30s puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5,25% durant 5mn. Les semences ainsi traitées sont rincées dans 6 bains d'eau distillée stérile, mises à imbiber dans de l'eau distillée stérile durant 12h et mises à germer en boîte de Pétri sur couche d'agar (agar à 0,75%). Après 2 à 3 jours d'incubation à 25°C et à l'obscurité, les graines dont la radicule est visible sont transférées en pots. Ce traitement vise à éviter l'apport de rhizobia.

#### 2.3.1.3 - Substrat utilisé pour la culture des acacias

Nous avons utilisé pour la production des plantules d'acacias au niveau du laboratoire un substrat constitué d'un mélange de deux volumes de tourbe brune (Marque Kekkila – Turquie) et d'un volume de sable de rivière.

Le mélange est tamisé à 2 mm et stérilisé par autoclave pendant une heure à 120°C, trois fois de suite, entrecoupées par un séjour de 48h à 25°C. Ce traitement est destiné à éliminer la microflore endogène, en particulier les champignons et d'éventuels Rhizobia.

Ce substrat est réparti stérilement à raison de 200 mL par pot dans des petits pots en plastique (250 mL) dont le fond comporte des perforations assurant l'aération ainsi que le drainage d'un éventuel excès d'eau. Nous plaçons dans chaque pot 3 germinations et procédons immédiatement à un arrosage avec de l'eau distillée stérile en quantité suffisante pour atteindre 80% du potentiel de rétention en eau du mélange sable tourbe. Les pots ainsi préparés sont alors inoculés à l'aide de suspensions bactériennes renfermant des cellules de chacune des souches testées.

#### **2.3.1.4 - Conditions de culture**

Les pots contenant les germinations sont placés à température ambiante sous un éclairage additionnel de 8000 lux avec une photopériode de 16/8 heures de jour/nuit.

Après 60 jours de végétation, les plants sont dépotés en prenant soin de ne pas endommager leur système racinaire. Les racines sont lavées à l'eau courante et examinées pour détecter la présence de nodules. S'ils sont présents, les nodules sont dénombrés et un nodule par plant est coupé transversalement pour déterminer s'il est fixateur d'azote par recherche d'une zone rouge ou rose résultant de la production de leghémoglobine.

#### **2.3.2 - Préparation de l'inoculum**

L'inoculation des pots a été réalisée par aspersion à la surface du substrat de 5mL de culture âgée de 72h obtenues en milieu TY sous agitation, à 100 tr/mn, et à une température de 25°C et. Dans ces conditions, les cultures atteignent une densité cellulaire de l'ordre de  $10^7$ - $10^8$  cellules mL<sup>-1</sup>, largement suffisante pour assurer la nodulation des plantules.

L'inoculation a été réalisée pour l'ensemble des espèces, 3 jours après le transfert des germinations en pots en utilisant une seringue munie d'une aiguille pour canaliser l'aspersion à la base des plantules.

#### **2.3.3 - Etude de la réponse des 6 espèces d'acacia à l'inoculation**

Pour évaluer la réponse des acacias à l'inoculation par les Rhizobia, nous avons choisis de les faire croître en sols non stériles c'est-à-dire des sols dont la microflore indigène n'a pas été éliminée. L'utilisation de sols non stériles permet d'intégrer dans la réponse observée après inoculation, tous les facteurs pouvant influencer la réponse à l'inoculation dans la nature. Cette méthode permet en particulier de tenir compte des éventuels phénomènes de compétition, de synergie et d'antagonisme entre les différentes composantes de la microflore des sols utilisés.

La réponse à l'inoculation a été étudiée par inoculation de plantules d'acacias obtenues en pot sur des sols frais prélevés aussi aseptiquement que possible et tamisés à 2mm.

Les modalités d'obtention des plantules, d'inoculation et de conditions de cultures retenues dans le cas de cette expérimentation sont les mêmes que ceux décrits précédemment.

## **2.4 - Mesure de l'activité nitrogénasique**

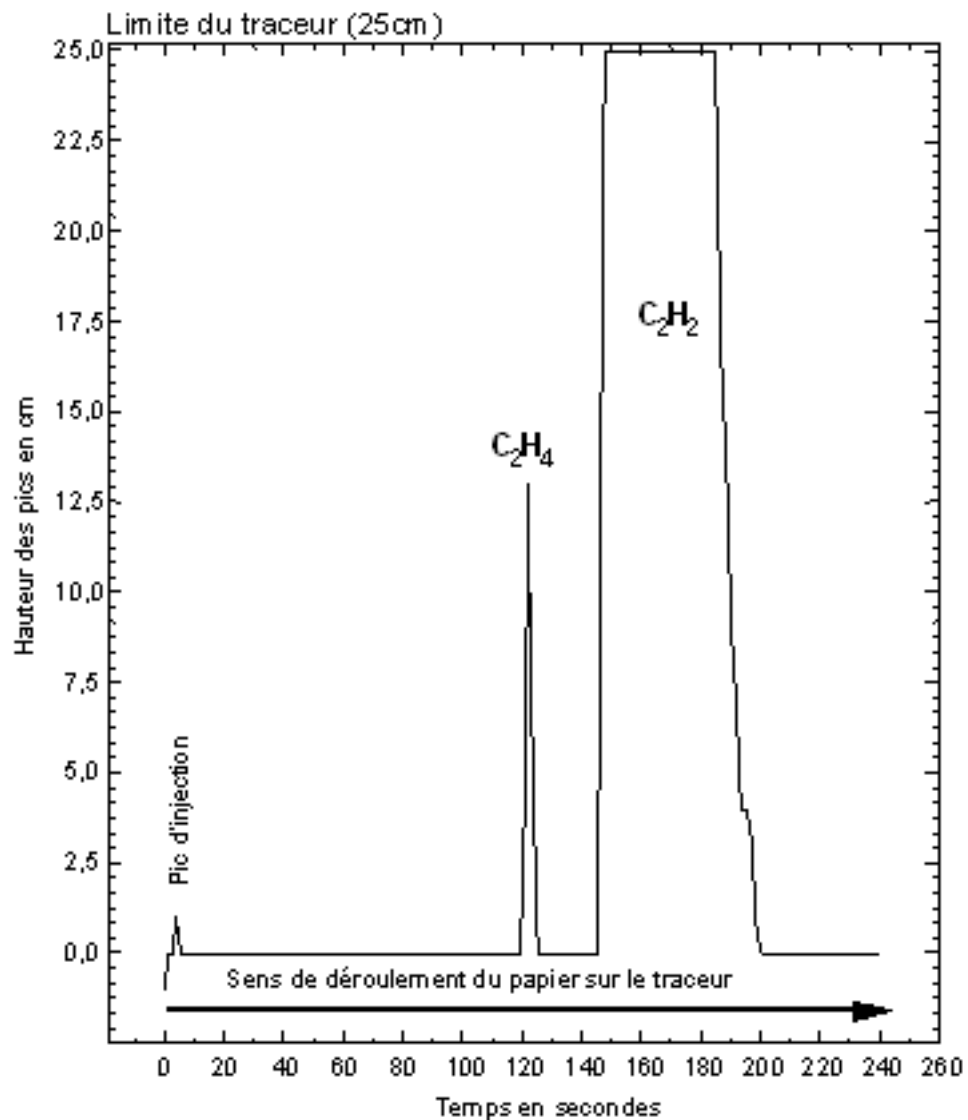
---

Pour la mesure de l'activité fixatrice d'azote des couples symbiotiques, nous avons retenu la technique de réduction de l'acétylène en éthylène et quantifier le dégagement de ce dernier par chromatographie en phase gazeuse (Stewart et al, 1967, Hardy et al, 1968).

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est un Carlo Erba type Fractovap 4200 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne en acier de 2m de long et 1/8 de pouce de diamètre. La phase stationnaire est constituée de Spherosil XOB (d'une granulométrie de 80-100 mesh) imprégné de 10% de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ .

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| <b>Températures (isothermes):</b> |           |
| Four                              | 80°C      |
| Injecteur                         | 100°C     |
| Détecteur                         | 100°C     |
| <b>Débits gazeux:</b>             |           |
| <b>Phase mobile</b>               |           |
| Azote                             | 35ml/min  |
| <b>Flamme du FID</b>              |           |
| Air                               | 300ml/min |
| Hydrogène                         | 30ml/min  |

**Tableau :** Paramètres utilisés pour la mesure de la réduction de L'acétylène par CPG (Amrani 1988; Kaci 1988).



**Figure 7:** Chromatogramme type montrant les pics d'éluion de l'éthylène (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) et de l'acétylène (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>).

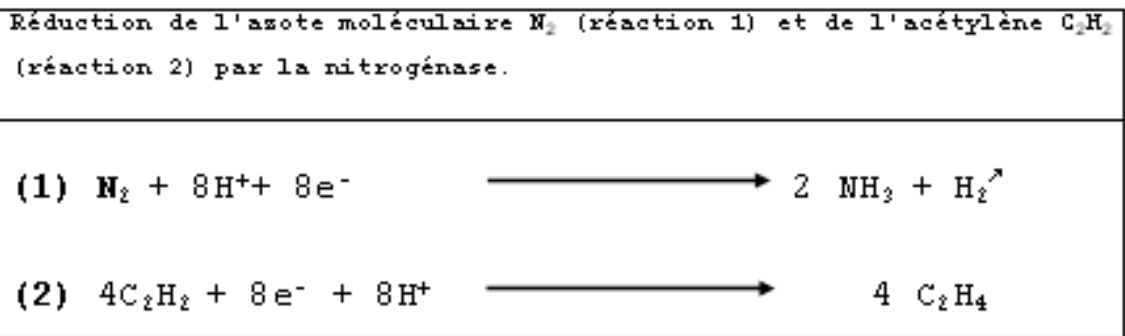
(Lebbida F et al, 2008).

Les conditions opératoires utilisées pour la mesure de la réduction de l'acétylène en éthylène par CPG sont ceux précédemment définis par Amrani (1988) et Kaci, 1988.

#### 2.4.1 - Principe

La nitrogénase est une enzyme peu spécifique vis-à-vis de son substrat (N<sub>2</sub>). Elle peut réduire un grand nombre de composés comportant un triple ou une double liaison (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, HCN, N<sub>2</sub>O) dont l'acétylène qui s'est révélé le plus pratique pour mesurer l'activité fixatrice d'azote (Postgate, 1982).

La chromatographie en phase gazeuse permet de mesurer la vitesse de dégagement d'éthylène qui résulte de la réduction de l'acétylène par la nitrogénase.



### 2.4.2 - Mode opératoire

Les mesures d'activité nitrogénasique sont effectuées sur les racines des lots de plantules de chaque essai, découpées juste avant incubation sous acétylène pour éviter l'altération de leur potentiel fixateur d'azote par épuisement des photosynthétats. Elles sont ensuite placées dans des tubes de type Vacutainer (15 x 95mm) dont les bouchons assurent une étanchéité parfaite aux gaz. A l'aide d'une seringue, une quantité d'acétylène correspondant à 10% du volume des tubes à essai est introduite dans chaque tube. Après 2h d'incubation en présence d'acétylène, un échantillon de l'atmosphère du dispositif de mesure (5ml) est prélevé, stocké dans un petit vacutainer (12 x 70mm) et une aliquote de celui-ci (0,1mL) est analysée par CPG. (Fig.7).

### 2.4.3 - Etalonnage du chromatographe

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de mesure relative, il est nécessaire d'étalonner l'appareil avant chaque série de mesures. Pour cela, à 3 reprises, 0,5mL d'un mélange gazeux (1mL d'éthylène pur obtenu dans un flacon sérum de 1105mL en présence de 200mL d'air en surpression) sont injectés dans le chromatographe.

La hauteur moyenne du pic d'éthylène permet de déterminer la sensibilité relative du chromatographe à l'éthylène. Le contenu en éthylène de chaque essai est déterminé par simple extrapolation de la hauteur de son pic d'éthylène (Stewart et al. 1967; Hardy et al. 1968).

La vitesse de dégagement d'éthylène qui résulte de la réduction de l'acétylène par la nitrogénase est désignée par activité nitrogénasique (ARA) qui est exprimée en micromoles d'éthylène produit par heure et par plante ou par nodule ( $\mu M C_2H_4.h^{-1}.plante^{-1}$  ou  $nodule^{-1}$ ). Cette activité nitrogénasique est en fait l'activité fixatrice d'azote ou encore activité réductrice d'acétylène (ARA).

## 2.5 - Caractérisation phénotypique des souches

### 2.5.1 - Préparation des milieux tests

Les tests de caractérisation ont été menés en microgaleries. Les milieux test ont été préparés sur la base du milieu préconisé par Amarger, 1997 sur lequel nous avons apporté les modifications suivantes :

- **Les milieux de métabolisation des substrats carbonés** . Le mannitol a été remplacé par différentes sources de carbone, stérilisées par microfiltration.

- **Les milieux de métabolisation des substrats azotés** . Le sulfate d'ammonium a été remplacé par différentes sources d'azote, après stérilisation par microfiltration.
- **Les tests de résistance aux antibiotiques** (Spiromycine, Kanamycine et Streptomycine sulfate) **et aux métaux lourds** (MgCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> et CuSO<sub>4</sub>). Les substances testées ont été rajoutées au milieu après stérilisation par microfiltration (à 0.5mL aux concentrations de milieu 100 (µg mL<sup>-1</sup>)).
- L'évaluation de la résistance des souches aux stress. Différentes concentrations de PEG 6000 de 0% à 16%(stress osmotique), de NaCl de 0M à 1.5M (stress salin), de niveau de pH et de température (4°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C 40°C et 45°C) ont été testées.

En ce qui concerne les modalités de préparation des milieux, la modification apportée consiste en une stérilisation par microfiltration à 0,25µm, en conditions stériles, de la majorité des substances, à l'exception du PEG6000, où l'autoclavage était obligatoire, à cause de la consistance visqueuse de ce produit.

## **2.5.2 - Lecture des résultats**

La croissance des souches qui se traduit presque toujours par une acidification ou une alcalinisation du milieu est signalée par un virage du bleu de bromothymol vers le jaune ou vers le bleu. Lorsque ce virage n'est pas obtenu, les puits sont observés à l'œil nu, en vue de rechercher un trouble bactérien révélateur de croissance.

## **2.5.3 - Analyse numérique**

### **2.5.3.1 - La taxonomie numérique**

La taxonomie numérique est basée sur l'évaluation du degré de similitude globale, d'organismes par rapport à un grand nombre de caractères. C'est une méthode de classification qui tient compte des relations phénétiques entre les organismes étudiés (Sneath, 1974 ; Pesenko, 1982).

### **2.5.3.2 - Indice de similitude**

Le résultat primaire d'une analyse numérique des profils phénotypiques est la construction d'une matrice basée sur une formule permettant le calcul d'un coefficient de similitude entre les souches à classer. Il est appelé « indice de similitude ». L'indice le plus couramment utilisé en biologie est l'indice de Jaccard

Formule de Jaccard :  $IJI = \frac{A}{A+B+C}$

**IJI** = coefficient de jaccard

**A, B, C...**= valeur de l'OTU (unité taxonomique opérationnel) chez chaque individu (0 ou 1)

Le dendrogramme n'est qu'une représentation graphique de cette matrice. Il permet une visualisation simple pour une interprétation aisée des résultats obtenus.

### **2.5.3.3 - Logiciel utilisé**

Nous avons utilisé pour nos analyses statistiques le logiciel **M.V.S.P.** (**M**ulti-**V**ariate **S**tatistical **P**ackage) version 3.12 de kovach computing services).



## 2.6 - Caractérisation génotypique

### 2.6.1 - Extraction de L'ADN

L'ADN génomique total est extrait à partir de 1,5mL de culture bactérienne obtenue en milieu TY à l'aide de kits d'extraction-purification (SpinClean Genomic DNA Purification Kit-) selon le protocole suivant :

- 1,5mL de culture cellulaire obtenue en milieu TY sont soumis à une centrifugation à 8000rpm pendant 5mn. Le culot est récupéré.
- Il est lavé deux fois dans 200 µL de tampon de resuspension cellulaire. Au culot obtenu à l'issue des deux lavages, nous rajoutons 200µL de tampon de resuspension et homogénéisons le mélange par agitation au vortex.
- 400µL de tampon de lyse (gDNA Lysis Buffer) et 20µL de Proteinase K sont ajoutés à la suspension cellulaire et le mélange obtenu est incubé 15mn à 65°C après agitation vigoureuse au vortex.

L'échantillon est transféré dans les colonnes d'extraction) purification (SpinClean Genomic DNA Purification Kit)

- placées dans des tubes Eppendorf en présence de 500µL d'une solution tampon de lavage (Wash Buffer MARQUE).
- Les tubes Eppendorf contenant les colonnes sont centrifugés pendant 1mn à 13000rpm. Après élimination de l'éluat nous procédons à une deuxième centrifugation durant 2mn.
- Les colonnes d'extraction - purification sont transférées dans de nouveaux tubes Eppendorf stériles dans lesquels nous ajoutons 100µL d'eau distillée stérile.
- Après 5mn de contact, nous procédons à une centrifugation de 1mn à 13000 rpm et récupérons l'ADN dans l'éluat obtenu.

### 2.6.2 - Amplification du 16S rDNA

Les amorces spécifiques procaryotiques que nous avons utilisées pour l'amplification du 16S rDNA par PCR, est une technique de répliation ciblée qui permet l'amplification avec des amorces spécifiques.

Les amorces que nous avons utilisées pour l'amplification de 16s rDNA figurent au tableau 7a.

**Tableau 7 a: Amorces utilisées pour l'amplification du 16s rDNA et la détermination de la séquence nucléotidique du 16s rDNA.**

|        | Séquence                             | cible    | Fournisseur |
|--------|--------------------------------------|----------|-------------|
| 16F27  | 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC.<br>AG-3' | 16s rDNA | MWG Biotech |
| 16R343 | 5' ACTGCTGCCTCCCGTA 3'               | 16s rDNA | MWG Biotech |
| 16F530 | 5' TTCGTGCCAGCAGCCGCGG 3'            | 16s rDNA | MWG Biotech |

La PCR des segments d'ADN ciblés a été réalisée sur 1µL d'échantillon d'ADN en présence de 5µL de tampon 10x (10 fois concentré) (Invitrogen), 5µL (25mM) de MgCl<sub>2</sub>, 8µL (1,25mM) dNTP (oligonucléotides), 2,5µL (12µm) de chaque amorce et 0.5µL (1,25U) de la taq DNA polymérase.

Le cycle de température retenu pour la réalisation de la PCR a consisté en 94°C pendant 3mn, 35 cycles de réactions à 95°C pendant 1mn, 50°C

**Tableau 7 b : Condition opératoires retenues pour la digestion de l'amplification du gène de l'ARN 16s.**

| Digestion                          | Alul  | Hinfl | MspI  | HhaI  |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (µl) | 16,5  | 16,2  | 16,75 | 16,45 |
| Buffer de l'enzyme (µl)            | 3 (B) | 3 (B) | 3 (B) | 3 (B) |
| BSA (µl)                           | non   | 0,3   | non   | 0,3   |
| Enzyme (µl)                        | 0,5   | 0,5   | 0,25  | 0,25  |
| ADN amplifié (µl)                  | 10    | 10    | 10    | 10    |
| T° de digestion °C                 | 37    | 37    | 37    | 37    |

pendant 1mn, 72°C pendant 1mn et une étape finale d'extension qui se déroule à 72°C pendant 3mn.

L'efficacité de l'amplification et la pureté des produits d'amplification ont été vérifiés par analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%(w/v) additionné de bromure d'éthidium (1mgmL<sup>-1</sup>) pour la lecture des gels sous UV.

### **2.6.3 - Analyse des fragments de restriction**

Des aliquotes de 10 µL du produit de la PCR ont été digérées avec des endonucléases de restriction dans un volume total de 30µL. La digestion a été exécutée par quatre enzymes *Alul*, *HhaI*, *Hinfl* et *MspI* pour les 16S rDNA. Chaque enzyme de restriction présente des exigences opératoires spécifiques, qui se résument en tableau 7 b.

Ces endonucléases ont été appliquées individuellement à des aliquotes différentes des amplifiats.

Les fragments de restriction obtenus sont séparés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 2,5% (migration de 3h sous une tension de 80V en présence d'un tampon Tris Borate EDTA (TBE) à pH 8,0). Le gel d'agarose utilisé renferme 1mgmL<sup>-1</sup> de bromure d'éthidium pour visualiser les bandes sous lumière ultraviolette.

### **2.6.4 - Séquençage du 16S rDNA**

Nous avons fait procéder au séquençage total des produits d'amplification du gène de l'ARN 16s (16s rDNA) de nos souches par la firme NBT (New Biotechnic – Seville – Espagne). Les quatre amorces utilisées pour réaliser le séquençage sont 16F27, 16R1488, 16R343 et 16F530 et le séquenceur utilisé est un séquenceur modèle 310, d'Applied Biosystems.

### **2.6.5 - Traitement des séquences**

Le séquençage automatique de l'ADN comporte un certain degré d'erreurs qui se traduisent sur la séquence brute fournie par le prestataire par la présence de caractères équivoques autres que ceux utilisés pour le codage des bases azotés A G T C par exemple des N, des S, des V....

Nous utilisons pour procéder au nettoyage de ces caractères équivoques le logiciel ChromaPro qui permet de visualiser simultanément les spectres d'absorption obtenus lors de l'analyse et leur transcription littérale.

---

### **2.6.6 - Interrogation des bases de données de séquences génétiques (BLAST)**

Après nettoyage des séquences brutes, nous avons procédé à la comparaison de nos séquences avec celles présentes dans les bases de données spécialisées comme NCBI-GenBank ou EBI. Cette comparaison permet de déterminer rapidement à quel groupe, genre ou espèce est apparentée une souche donnée et de récupérer par conséquent les séquences des souches types les plus pertinentes pour l'analyse de similitude des séquences et la construction de l'arbre phylogénétique.

Dans le cas de NCBI-GenBank, cette fonctionnalité a été nommée BLAST et génère un tableau listant les souches dont la séquence est la plus proche de celle introduite par l'utilisateur.

### **2.6.7 - Alignement des séquences**

Les séquences obtenues auprès du prestataire de service ne sont presque jamais complètes et sont généralement tronquées à leurs extrémités et il est évidemment impossible de les comparer avec d'autres séquences sans procéder au préalable à leur alignement, c'est-à-dire de les positionner en faisant coïncider leur plus grande zone chevauchante. Pour régler ce problème, il a été mis au point des algorithmes dits d'alignement multiples dont le plus utilisé est sans conteste CLUSTALW.

Pour procéder à l'alignement des séquences de nos souches et de celles des souches types récupérées de NCBI-GenBank, nous avons utilisés le logiciel MEGA qui en plus de procéder aux alignements de séquences par la méthode CLUSTALW permet également le calcul des indices de similitudes entre les séquences et la construction d'arbres phylogénétiques par diverses méthodes de reconstruction.

La reconstruction phylogénétique permet sur la base des divergences sur la séquence du 16s de classer les souches selon un ordre de succession dans le temps.

### **2.6.8 - Dépôt des séquences auprès de NCBI-GenBank**

Les séquences du 16s rDNA des souches retenues pour le séquençage ont été déposées auprès NCBI-GenBank et ont été dotées d'un numéro d'accession.

### **2.6.9 - Logiciel utilisé**

Nous avons utilisé pour tracer les graphes et les corrélations le logiciel Origin version 4.

## Résultats et Discussions

|   |             | <i>A. saligna</i> |            |          | <i>A. longifolia</i> |            |          | <i>A. melanoxydon</i> |            |          | <i>A. ehrenbergiana</i> |            |          | <i>A. nilotica</i> |            |          | <i>A. tortilis</i> |            |          | <i>A. laeta</i> |            |          | <i>A. seyal</i> |            |          | <i>A. albida</i> |            |          |   |
|---|-------------|-------------------|------------|----------|----------------------|------------|----------|-----------------------|------------|----------|-------------------------|------------|----------|--------------------|------------|----------|--------------------|------------|----------|-----------------|------------|----------|-----------------|------------|----------|------------------|------------|----------|---|
|   |             | Présence          | Nodulation | Fixation | Présence             | Nodulation | Fixation | Présence              | Nodulation | Fixation | Présence                | Nodulation | Fixation | Présence           | Nodulation | Fixation | Présence           | Nodulation | Fixation | Présence        | Nodulation | Fixation | Présence        | Nodulation | Fixation | Présence         | Nodulation | Fixation |   |
| 1 | Bainem      | R                 | +          | +        | +                    | -          | -        | -                     | +          | +        | +                       | +          | +        | +                  | +          | +        | +                  | +          | +        | +               | -          | -        | -               | -          | -        | -                | -          | -        | - |
| 2 | Bejaia      | R                 | +          | +        | +                    | -          | -        | -                     | +          | +        | +                       | -          | -        | -                  | -          | -        | -                  | -          | -        | -               | -          | -        | -               | -          | -        | -                | -          | -        | - |
| 3 | El Kala     | R                 | +          | +        | +                    | +          | +        | +                     |            |          |                         | -          | -        | -                  | -          | -        | -                  | -          | -        | -               | -          | -        | -               | -          | -        | -                | -          | -        | - |
| 4 | Jijel       | R                 | +          | +        | +                    | -          | -        | -                     | +          | +        | +                       | -          | -        | -                  | -          | -        | -                  | -          | -        | -               | -          | -        | -               | -          | -        | -                | -          | -        | - |
| 5 | Sétif       | R                 | +          | +        | +                    | -          | -        | -                     | +          | +        | +                       | -          | -        | -                  | -          | -        | -                  | -          | -        | -               | -          | -        | -               | -          | -        | -                | -          | -        | - |
| 6 | Tlemcen     | R                 | +          | +        | +                    | +          | +        | +                     | -          | -        | -                       | -          | -        | -                  | -          | -        | -                  | -          | -        | -               | -          | -        | -               | -          | -        | -                | -          | -        | - |
| 1 | Adrar       | R                 | +          | +        | +                    | -          | -        | -                     | -          | -        | -                       | +          | +        | +                  | +          | +        | +                  | +          | +        | +               | +          | +        | +               | -          | -        | -                | -          | -        | - |
| 2 | Bechar      | R                 | +          | +        | +                    | -          | -        | -                     | -          | -        | -                       | -          | -        | -                  | -          | -        | -                  | +          | +        | +               | -          | -        | -               | -          | -        | -                | -          | -        | - |
| 3 | Djanet      | R                 | +          | +        | +                    | -          | -        | -                     | -          | -        | -                       | +          | +        | +                  | +          | +        | +                  | +          | +        | +               | +          | +        | +               | -          | -        | -                | -          | -        | - |
| 4 | Djelfa      | R                 | +          | +        | +                    | -          | -        | -                     | +          | +        | +                       | -          | -        | -                  | -          | -        | -                  | -          | -        | -               | -          | -        | -               | -          | -        | -                | -          | -        | - |
| 5 | Tamanrasset | R                 | +          | +        | +                    | -          | -        | -                     | -          | -        | -                       | +          | +        | +                  | +          | +        | +                  | +          | +        | +               | +          | +        | +               | +          | +        | +                | +          | +        | + |
| 6 | Touggourt   | R                 | +          | +        | +                    | -          | -        | -                     | -          | -        | -                       | -          | -        | -                  | -          | -        | -                  | -          | -        | -               | +          | +        | +               | -          | -        | -                | -          | -        | - |

**Tableau.8 :** Origine et statut symbiotique (nodulation et fixation d'azote) des plants de différentes espèces d'acacias recueillis au niveau des 12 pépinières.

## 1- Prévalence pépinières

### 1.1- Prévalence des acacias au niveau des pépinières retenues

Les 9 espèces d'acacia étudiées, sont inégalement produites au niveau des pépinières ciblées (Tab.8). Certaines d'entre elles ne sont produites que par quelques pépinières (cas pour *A. longifolia*, *A. laeta*, *A. seyal* et *A. albida* recueillis au niveau d'une ou de deux pépinières), d'autres (*A. tortilis*, *A. melanoxydon*, *A. ehrenbergiana* et *A. nilotica*...) sont produites par plus de 3 pépinières et seule une espèce, *A. saligna* s'est révélée produite par les douze pépinières étudiées.

La prévalence de la production des différentes espèces d'acacias au niveau de ces pépinières reflète leur importance relative dans les opérations de boisement, de reboisement et d'aménagements horticoles menés en Algérie par les conservations forestières de wilaya, l'INRF, l'Agence Nationale des Autoroutes (ANA), l'Agence Nationale des Barrages (ANB), les alectivités locales et les particuliers.

Ces données qualitatives n'ont cependant pas pu être complétées et confortées par des données quantitatives. Les pépinières et organismes interrogés ne disposant pas de données précises sur les volumes de production des plants des différentes espèces.

Sur la base des prospections que nous avons mené au niveau de ces pépinières, *A. saligna* se révèle être l'espèce la plus fréquemment produite ; en effet, cette espèce est de loin la mieux représentée en Algérie (El-Lakany, 1987, Tiedeman et Johnson, 2004).

Le succès de cette espèce en Algérie et de manière plus générale en Afrique du Nord est due au fait qu'*A. saligna* est une espèce à croissance rapide. Elle est relativement tolérante au déficit hydrique puisqu'elle peut se développer dans des régions dont les précipitations annuelles n'excèdent pas 200-250mm tout en tolérant des niveaux d'alcalinité et de salinité modérés (Vercoe, 1986 ; Fox, 1995).



Figure 8 : Nodules de plants d'acacias provenant des différentes pépinières.

### 1.1.1- Prévalence de la symbiose à Rhizobia

L'examen du système racinaire des plants recueillis au niveau des 12 pépinières nous a permis de vérifier qu'ils sont nodulés et fixateurs d'azote. En effet, les 12 plants recueillis au niveau de chaque pépinière ont montré sur leur système racinaire les nodosités caractéristiques de la symbiose Rhizobia-légumineuses (fig.8).

Les nodules observés sur le système racinaire des plants examinés se sont tous révélés de type indéterminé et de morphologie astragalloïde selon la classification établie par Corby en 1981.

Ils se présentent sous la forme de lobes beaucoup plus allongés que large. Dans certains cas, ces lobes, confluent à la base ou émettant des branches dans leur partie inférieure forment des amas coralloïdes dont le diamètre peut excéder 2cm. En dehors de ce trait principal, les nodules observés sur les racines des différentes espèces ont montré

uniquement des variations sur le plan de la taille, de la couleur et de la texture de la surface du nodule (Fig.8).

Cette morphologie des nodules observée chez les différentes espèces d'acacia étudiées est en accord avec les données de la littérature qui rapporte que les représentants de ce genre produisent tous des nodules indéterminés de type astragalloïde (Brockwell et al, 2005).

Il est important de signaler à ce niveau que la forme des nodosités racinaires des légumineuses est déterminée par la plante hôte (Hirsch, 1992 ; Hirsch et al, 2001). De manière générale, les légumineuses d'origine tropicale comme le haricot (*Phaseolus vulgaris*) produisent toutes des nodules de type déterminé, généralement non branchés tandis que les légumineuses des régions tempérées comme le pois chiche (*Cicer arietinum*) produisent des nodules de type indéterminé et généralement branchés (Corby, 1981 et 1988, Allen et Allen, 1981).

L'examen de coupes à main levée pratiquées sur les nodules présents sur le système racinaire des plants étudiés nous a permis de vérifier qu'ils sont tous fixateurs d'azote (Tab. 8). En effet, les nodules des plants examinés ont présenté une zone centrale rose, rouge ou rougeâtre révélatrice de la présence de léghémoglobine, une hémoprotéine produite uniquement par les nodules fixateurs d'azote (Downie, 2005 ; Ott, 2005).

Ce résultat indique que les sols des différentes pépinières renferment une flore Rhizobienne comportant des souches suffisamment compétentes, envers les espèces d'acacias étudiées, pour les noduler et former des symbioses efficaces.

Ce résultat n'est pas étonnant dans le cas des espèces indigènes. En effet, celles-ci ont coévolué longtemps avec la microflore rhizobienne indigène et ont fini par modifier/sélectionner des souches qui leurs sont aujourd'hui adaptées voire très spécifiques (Wolde-Meskel et al, 2003 ; Leary et al, 2006 ; Thrall et al, 2007).

Cependant, dans le cas des trois espèces d'acacias australiens (*A. saligna*, *A. longifolia* et *A. melanoxylon*) qui n'ont été introduites qu'à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, soit un passé relativement court, nous ne pouvons pas invoquer une coévolution, entre les acacias et les rhizobia indigènes, pour justifier leur capacité à établir une symbiose à rhizobia sur les sols des pépinières d'Algérie. La nodulation de leurs plants, signifie qu'ils sont capables de recruter au niveau de la microflore rhizobienne indigène, des souches de rhizobia suffisamment spécifiques pour assurer l'infection des racines et le développement des nodosités efficaces. Ce comportement qui a été déjà rapporté pour de nombreuses légumineuses introduites dans plusieurs régions du monde est qualifié de promiscuité symbiotique (Perret, 2000); il résulterait de la conjonction de deux facteurs:

1. La présence dans le sol de souches de rhizobia capables de réagir spécifiquement à une large gamme de flavonoïdes et donc capables de noduler un large panel de plantes hôtes. Ce comportement est poussé à l'extrême dans le cas de la souche de *Rhizobium* NGR243 qui est capable de noduler plus de 112 genres de légumineuses. Ce comportement a inspiré de nombreux travaux de biotechnologie visant à élargir le spectre d'hôte de souches de *Rhizobia* très efficaces en vue de la production d'inoculants universels c'est-à-dire

|            |   | <i>A. sahlgne</i> | <i>A. longispina</i> | <i>A. melanoxylon</i> | <i>A. ehrenbergiana</i> | <i>A. nilotica</i> | <i>A. zanzibar</i> | <i>A. laeta</i> | <i>A. seyal</i> | <i>A. albida</i> |
|------------|---|-------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|------------------|
|            |   | PNS               | PNS                  | PNS                   | PNS                     | PNS                | PNS                | PNS             | PNS             | PNS              |
| Bainem     | R | 161.26±23.11      | -                    | 87.27±17.31           | 11.41±3.17              | 13.34±4.11         | 17.23±3.03         | -               | -               | -                |
| Bejaia     | R | 176.38±33.27      | -                    | 92.34±13.72           | -                       | -                  | -                  | -               | -               | -                |
| El Kala    | R | 272.05±42.63      | 154.24±21.11         | -                     | -                       | -                  | -                  | -               | -               | -                |
| Fijel      | R | 206.62±27.81      | -                    | 123.78±19.81          | -                       | -                  | -                  | -               | -               | -                |
| Séif       | R | 46.81±11.36       | -                    | 38.47±16.23           | -                       | -                  | -                  | -               | -               | -                |
| Tlemcen    | R | 96.23±22.17       | 66.17±19.43          | -                     | -                       | -                  | -                  | -               | -               | -                |
| Adrar      | R | 24.39±5.31        | -                    | -                     | 21.17±4.38              | 17.56±5.3          | 26.34±7.11         | -               | -               | 32.16±8.54       |
| Bechar     | R | 27.61±4.28        | -                    | -                     | -                       | -                  | -                  | -               | -               | -                |
| Djanet     | R | 30.19±9.33        | -                    | -                     | 28.47±4.21              | -                  | 11.71±3.54         | -               | -               | -                |
| Djelfa     | R | 4.22±1.11         | -                    | 6.38±2.08             | -                       | 10.31±3.67         | 6.29±1.87          | -               | -               | -                |
| Tamanasset | R | 35.37±2.27        | -                    | -                     | 31.51±5.84              | -                  | -                  | -               | -               | -                |
| Touggourt  | R | 39.25±4.53        | -                    | -                     | -                       | 18.43±5.24         | 23.61±4.87         | 33.17±7.22      | 48.22±6.33      | 48.24±9.13       |
| Moyenne    |   | 74.94±15.59       | 110.2±20.27          | 69.68±13.83           | 23.14±4.45              | 14.91±4.38         | 17.02±4.08         | 33.17±7.22      | 48.22±6.33      | 40.24±6.83       |

**Tableau 9: Moyenne des biomasses nodulaire sèche en mg/ plante réalisée sur 5 plants de chaque espèce d'acacias étudiés au niveau des pépinières.**

capables de former une symbiose fixatrice d'azote avec un large panel de légumineuses (Viprey et al, 2000).

2. La synthèse par la plante hôte d'une large gamme de flavonoïdes qui lui permet d'induire les gènes *Nod* chez un plus grand panel de rhizobia. C'est le cas de *Macroptillum atropurpureum* dont le niveau de promiscuité symbiotique est tel qu'elle est nodulée par tous les Rhizobia connus. C'est pour cette raison que cette légumineuse est souvent utilisée dans les laboratoires comme plante cible pour l'authentification des souches de rhizobia quelle que soit leur plante hôte d'origine. (Hartwig et al, 1991; Streit et al, 1996; Van de Sande et Bisseling; 1997; Bergum et al, 2001).

La promiscuité symbiotique qui se rencontre exclusivement chez les légumineuses des régions tropicales résulte de leur faible spécificité vis-à-vis des Rhizobia (Perret et al, 2000). Elle se rencontre en plus de *Macroptillum atropurpureum*, chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*), l'arachide (*Arachis hypogea*) et chez la plupart des acacias australiens (Dommergues et al, 1999 ; Brockwell et al, 2005 ; Leary et al, 2006).

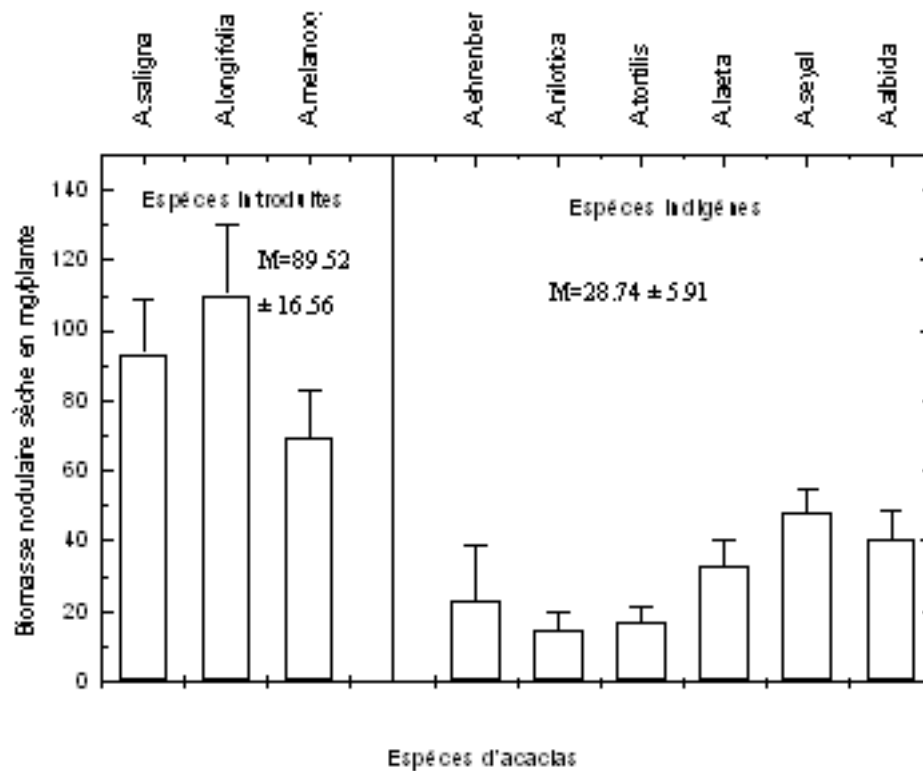
### 1.1.2 - Performances symbiotiques des différentes espèces d'acacias au niveau des pépinières

#### 1.1.2.1 - Nodulation

En raison de la grande variabilité de la taille des nodules, y compris au niveau d'un même plant, nous avons retenus comme paramètre d'évaluation du taux de nodulation non pas le nombre de nodules mais leur biomasse sèche qui est considérée comme le paramètre le plus fiable pour évaluer le taux de nodulation d'une légumineuse.

Les taux de nodulation des plants d'acacias étudiés sont très différents selon l'espèce et la pépinière considérée.

Les résultats que nous avons obtenus (Tab.9) indiquent que La biomasse des nodules présents sur le système racinaires des plants varie, selon l'espèce et la pépinière considérée, dans une très large gamme s'étalant entre 6,29 ± 1,87 à 272,05 ± 42,63 mg/plante c'est-à-dire un rapport de 1 à 45, ce qui est considérable.



**Figure 9 :** Biomasse nodulaire sèche en mg/plante des plants des différentes espèces d'acacia recueillis au niveau des pépinières. Les barres représentent la moyenne de la biomasse nodulaire sèche surmontée de son erreur standard. La moyenne, toutes espèces confondues obtenue pour les acacias indigènes et introduits sont consignées dans le volet correspondant.

Les biomasses nodulaires les plus élevés ont été enregistrées pour *A. saligna* et les plus faibles avec *A. nilotica*.

Les taux de nodulations enregistrés pour une espèce donnée varient suivant la pépinière considérée c'est ainsi par exemple que pour *A. saligna*, la biomasse nodulaire est de  $272,05 \pm 42,63$  mg/plante au niveau de la pépinière d'El Kala et de seulement  $4,22 \pm 1,11$  mg/plante au niveau de la pépinière de Djelfa.

L'analyse des taux de nodulations en fonction du statut (autochtone ou introduite), de la localité géographique des pépinières indique de plus que les espèces introduites sont mieux nodulés avec une biomasse nodulaire de  $89,52 \pm 16,56$  mg/plante que les espèces indigènes avec  $28,74 \pm 5,91$  mg/plante (Fig.9).

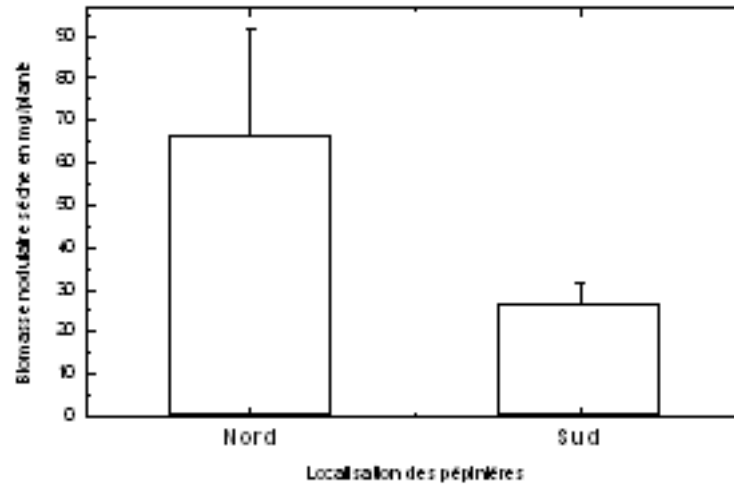
Le taux de nodulation d'une légumineuse dépend de nombreux facteurs dont:

- La magnitude numérique, dans le sol, des souches de Rhizobia compétentes vis-à-vis de la légumineuse considérée c'est-à-dire des souches capables de l'infecter et de la noduler (Nazih et Weaver, 1994). En effet, les conditions édaphiques prévalant au niveau du sol (texture, teneur en éléments, température, humidité, pH, ...) peuvent favoriser ou au contraire défavoriser la croissance des rhizobia et par conséquent la nodulation (Waterer et al, 1992 ; Dovel et al, 1993 ; Montanez, 2000).
- Le degré de susceptibilité de la légumineuse vis-à-vis des rhizobia présents dans le sol. En effet, au sein d'un même groupe de légumineuse, il peut exister une grande variation de la susceptibilité à la nodulation. Le cas extrême étant l'existence de

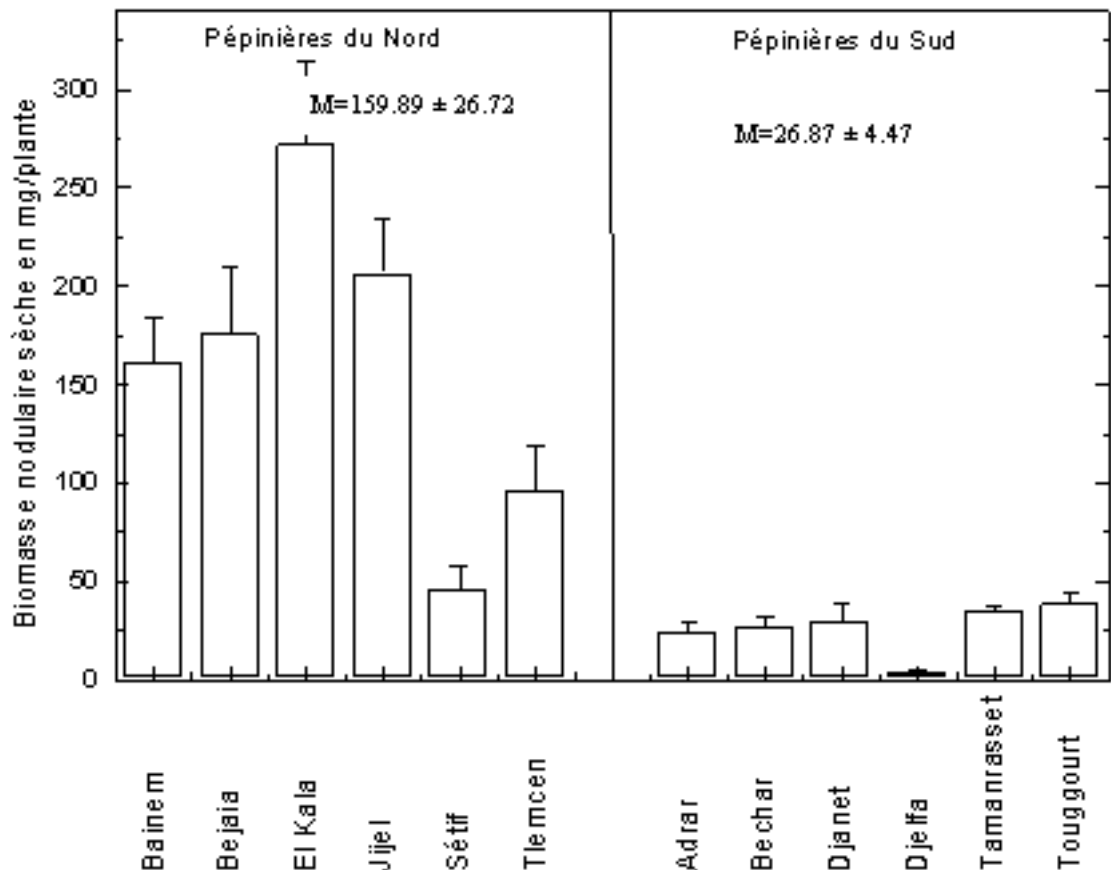


légumineuses réfractaires à la nodulation comme c'est le cas pour certains cultivars ou variétés de Soja (cv Weber) ou de petit-pois (cv Afghanistan).

L'effet des conditions du milieu sur l'établissement de la symbiose entre la légumineuse et les souches de rhizobia compétentes. Même si les conditions du milieu sont propices à la présence de rhizobia et à leur prolifération, elles peuvent inhiber voire empêcher la nodulation.



**Figure 10:** biomasse nodulaire sèche en mg/plante des plants d'acacias, toutes espèces confondues, en fonction de la répartition septentrionale ou méridionale des pépinières d'origine. Les barres représentent la moyenne de la biomasse nodulaire sèche surmontée de l'erreur standard.



**Figure 11:** Biomasse nodulaire sèche en mg/plante des plants d'*Acacia saligna* recueillis au niveau des 12 pépinières ciblées. Les barres représentent la moyenne de la biomasse nodulaire sèche surmontée de l'erreur standard. La moyenne, toutes espèces confondues obtenues pour les pépinières du Nord et du Sud du pays sont consignées dans le volet correspondant

- Ainsi par exemple, la présence dans le sol de formes d'azote combiné (ammoniac et nitrates) en quantité appréciable favorise aussi bien la plante que les rhizobia qui trouvent ainsi une source d'azote facilement accessible mais se révèle par contre inhibitrice vis-à-vis de la nodulation.

Sur la base de ces données, les variations des taux de nodulation des différents acacias en fonction de l'espèce et de la pépinière considérées peut trouver son explication dans :

- Les différentes espèces d'acacias présenteraient une susceptibilité variable vis-à-vis du pool rhizobien des sols utilisés pour leur production. En effet, la biomasse nodulaire moyenne toutes pépinières confondues s'est montré très variable d'une espèce à l'autre. C'est ainsi que nous avons enregistré le maximum pour *A. longifolia* (110,2 ± 20,27 mg/plante) et le minimum pour *A. nilotica* (14,91 ± 4,58 mg/plante) (fig.9) ce qui indique que ces espèces sont respectivement la plus susceptible et la moins susceptible au pool de rhizobia des pépinières prises en considération. La comparaison la biomasse nodulaire toutes pépinières confondues montre que les espèces introduites présentent globalement des biomasses nodulaires nettement supérieures à ceux des espèces indigènes. Cette différence qui peut s'expliquer par la promiscuité symbiotique des espèces introduites qui les rend capables de pouvoir

sélectionner les Rhizobia sur un large panel et donc d'établir la symbiose avec des souches qui leur sont très compétentes.

- Le fait que les sols utilisés pour leur production renfermeraient une microflore rhizobienne très variable sur le plan quantitatif et/ou qualitatif comme cela est illustré par la nette supériorité des biomasses nodulaires sèches enregistrés pour les plants provenant des pépinières du Nord du pays ( $66 \pm 12,34$ ) comparativement à ceux des plants provenant du sud du pays ( $26,78 \pm 4,25$ ) (Fig.10).

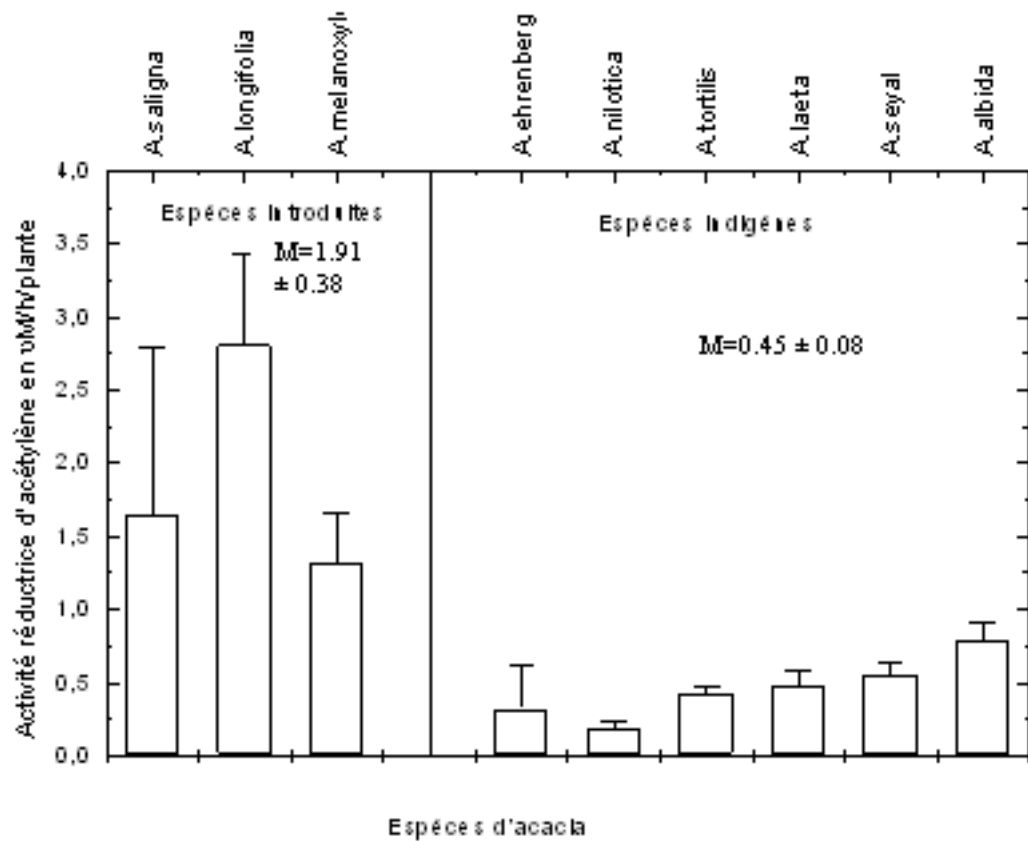
|             |   | <i>A. saligna</i> | <i>A. longifolia</i> | <i>A. melancaylon</i> | <i>A. ehrenbergiana</i> | <i>A. nilotica</i> | <i>A. acaciis</i> | <i>A. laeta</i> | <i>A. seyal</i> | <i>A. albidia</i> |
|-------------|---|-------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
|             |   | ARA               | ARA                  | ARA                   | ARA                     | ARA                | ARA               | ARA             | ARA             | ARA               |
| Baïnen      | R | 2.52±0.17         | -                    | 1.54±0.17             | 0.60±0.14               | 0.11±0.04          | 0.13±0.06         | -               | -               | -                 |
| Bejaia      | R | 3.63±0.13         | -                    | 2.11±0.53             | -                       | -                  | -                 | -               | -               | -                 |
| El Kala     | R | 4.03±0.37         | 3.17±0.59            | -                     | -                       | -                  | -                 | -               | -               | -                 |
| Jijel       | R | 2.52±0.31         | -                    | 1.49±0.47             | -                       | -                  | -                 | -               | -               | -                 |
| Séif        | R | 2.83±0.21         | -                    | 1.31±0.54             | -                       | -                  | -                 | -               | -               | -                 |
| Tlemcen     | R | 3.10±0.61         | 2.45±0.66            | -                     | -                       | -                  | -                 | -               | -               | -                 |
| Adrar       | R | 0.11±0.03         | -                    | -                     | 0.29±0.06               | 0.16±0.07          | 0.58±0.06         | -               | -               | 0.76±0.11         |
| Bechar      | R | 0.24±0.08         | -                    | -                     | --                      | --                 | --                | --              | --              | --                |
| Djanet      | R | 0.25±0.07         | -                    | -                     | 0.13±0.05               | --                 | 0.34±0.04         | -               | -               | -                 |
| Djéfa       | R | 0.16±0.04         | -                    | 0.13±0.05             | --                      | 0.31±0.03          | 0.36±0.07         | -               | -               | -                 |
| Tamanrasset | R | 0.17±0.10         | -                    | -                     | 0.27±0.03               | --                 | --                | --              | --              | --                |
| Touggourt   | R | 0.21±0.05         | -                    | -                     | -                       | 0.19±0.05          | 0.73±0.09         | 0.47±0.11       | 0.55±0.09       | 0.83±0.13         |
| Moyenne     |   | 1,64±0,18         | 2,81±0,62            | 1,31±0,35             | 0,32±0,07               | 0,19±0,04          | 0,42±0,06         | 0,47±0,11       | 0,55±0,09       | 0,79±0,12         |

**Tableau 10 :** Moyenne du niveau d'activité réductrice d'acétylène en  $\mu\text{M}/\text{h}$ / plante faite sur 5 plants de chaque espèce d'acacias au niveau des pépinières

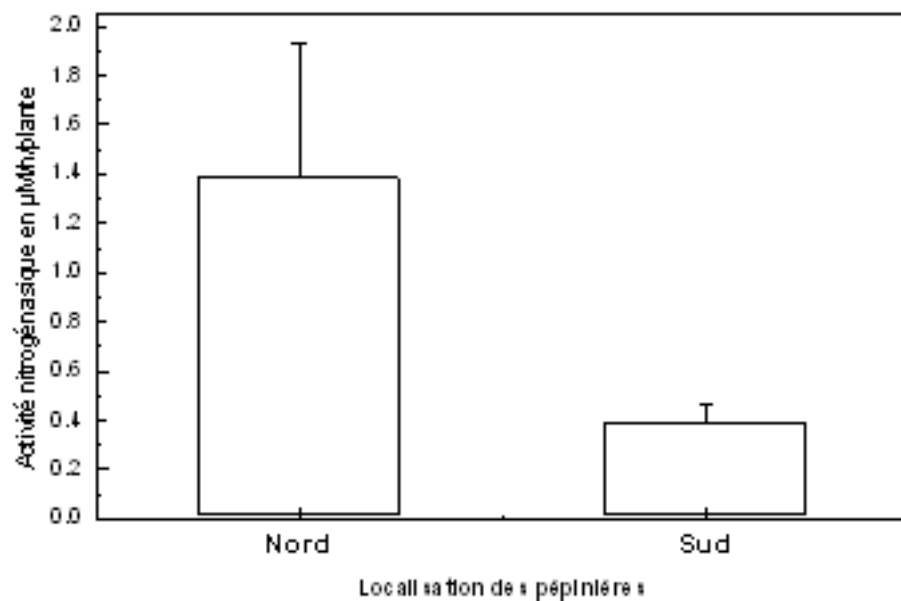
- Les sols du nord du pays en raison d'une meilleure texture, d'une plus grande richesse en éléments nutritifs et de conditions édaphiques moins contraignantes hébergeraient une microflore rhizobienne nettement plus abondante permettant une meilleure nodulation des plants d'acacias (Slattery et al, 2001).
- Les variations de la biomasse nodulaire sèche qui existent pour une espèce donnée en fonction de la pépinière considérée et de la localisation septentrionale ou méridionale de celle-ci sont bien illustrées dans le cas d'*A. saligna*, la seule espèce produite par toutes les pépinières ciblées (Fig.11).
- Outre ces facteurs directement liés aux rhizobia ou aux légumineuses, les variations observées dans les taux de nodulations des plants d'Acacias peuvent résulter de l'effet des conditions édaphiques propres à chaque pépinière. En effet, les caractéristiques physiques, physico-chimiques et chimiques du sol et les conditions climatiques propres à chaque pépinière sont de nature à influencer le niveau de nodulation (Zahran, 1999 ; Räsänen, 2002). Nous pensons que ce serait particulièrement le cas de la température dont les minima et les maxima sont plus cléments au nord qu'au sud du pays.

Nos résultats laissent indiquer que les sols des pépinières du Nord renfermeraient une microflore rhizobienne compétente plus abondante et/ou plus diversifiée et qu'elle bénéficierait de conditions édaphiques plus propices à la nodulation des neuf espèces d'acacias étudiées.

Lafay et Burdon, (2001), Liu et al, (2005), Gu et al, 2007 ; Dupuy et Dreyfus (1992) ont montré dans que la nodulation est mieux assurée dans les zones humides que les zones sèches. Zahran, (1999) attribue cette différence à la nature des sols, beaucoup plus pauvres au Sud qu'au nord et aux conditions climatiques défavorables dans la région sud en particulier en raison de la dessiccation et de la salinité.



**Figure 12:** Niveau d'activité nitrogénasique (ARA) (pouvoir fixateur d'azote en  $\mu\text{M/h/plante}$ ) des plants des différentes espèces d'acacia recueillis au niveau des pépinières. Les barres représentent la moyenne du pouvoir fixateur d'azote surmontée de l'erreur standard. La moyenne, toutes espèces confondues obtenue pour les acacias indigènes et introduits sont consignées dans le volet correspondant.



**Figure 13:** Niveau d'activité nitrogénasique (ARA) (pouvoir fixateur d'azote en  $\mu\text{M/h/plante}$ ) des plants d'acacias, toutes espèces confondues, en fonction de

*la répartition septentrionale ou méridionale des pépinières d'origine. Les barres représentent la moyenne du pouvoir fixateur d'azote surmontée de l'erreur standard.*

### 1.1.2.2 - Fixation d'azote

Les plants recueillis au niveau des pépinières montrent sur le plan de leur pouvoir fixateur d'azote de grandes variations comme cela a été observé précédemment pour les taux de nodulation (Tab.10). Le niveau d'activité nitrogénasique des plants varie dans une gamme comprise entre  $0,11 \pm 0,03 \mu\text{M}$  de  $\text{C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$  avec *A. nilotica* et  $4,03 \pm 0,37 \mu\text{M}$  de  $\text{C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$  pour *A. saligna* et soit un facteur de 1 à 36 proches du facteur de 1 à 46 observé pour les biomasses nodulaires (Fig.12).

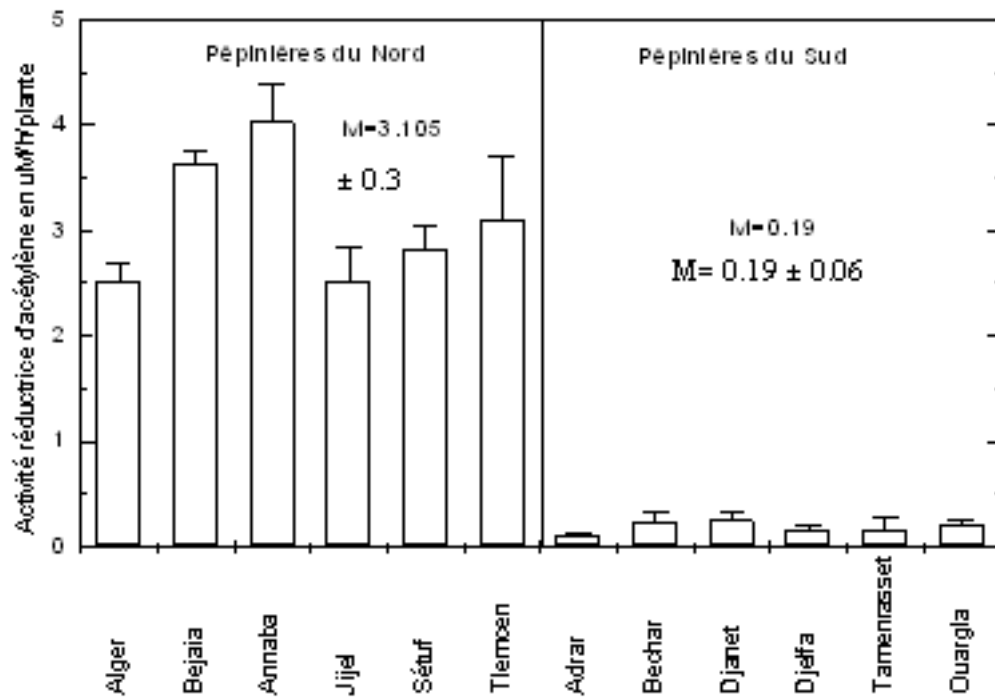
Les niveaux d'activité nitrogénasique enregistrés pour une espèce donnée varient suivant la pépinière considérée L'ARA des plants provenant des pépinières du nord s'est révélée quelle que soit l'espèce considérée nettement plus élevée (intense) avec  $1,39 \pm 1,26 \mu\text{Mde C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$  que celle des plants provenant des pépinières du sud avec  $0,38 \pm 0,32 \mu\text{Mde C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$  (Fig.13).

Le niveau d'activité nitrogénasique d'*A. saligna* est de  $4,03 \pm 0,37 \mu\text{Mde C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$  au niveau de la pépinière d'El Kala et de seulement  $0,11 \pm 0,03 \mu\text{Mde C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$  au niveau de la pépinière d'Adrar (Fig.14).

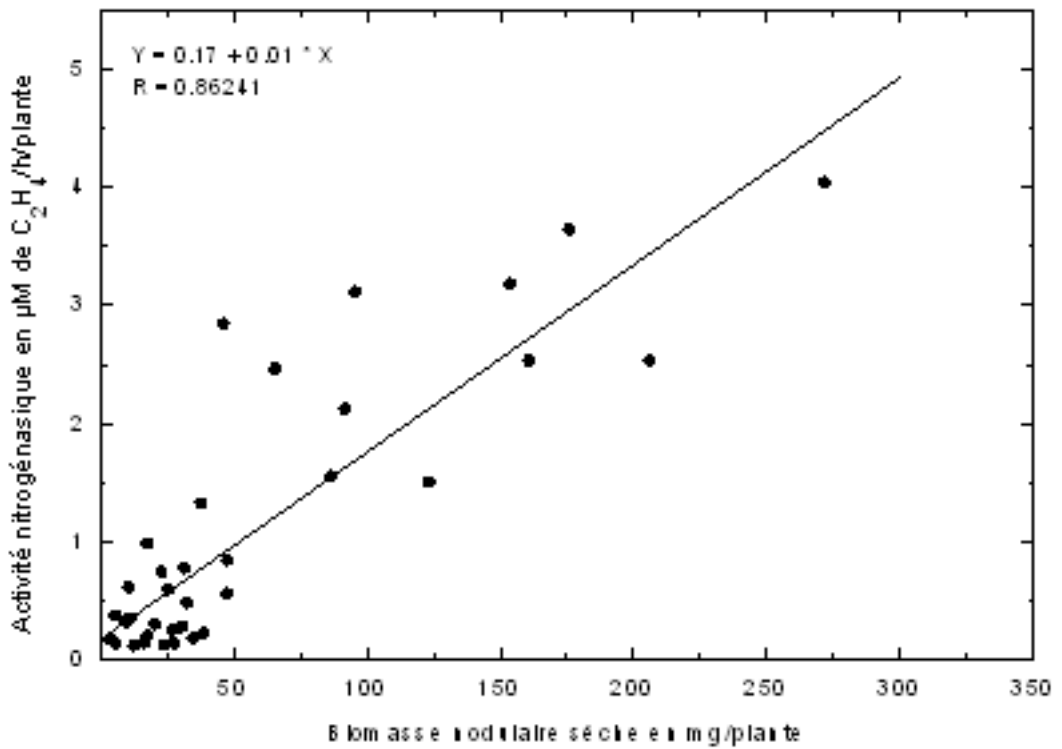
Le niveau d'activité réductrice d'une légumineuse dépend essentiellement de son taux de nodulation. En effet, en dehors des cas de nodulation par souche non fixatrice ou peu fixatrice ARA est proportionnelle avant tout à la biomasse nodulaire c'est-à-dire la quantité de symbiosomes, unité fondamentale de la symbiose rhizobia-légumineuses, que la plante héberge au niveau de ses nodosités.

En dehors du taux de nodulation, l'ARA du couple symbiotique dépend essentiellement du pouvoir photosynthétique de la plante hôte, conditionné par l'état de la plante (âge, état physiologique, stade phénologique...) et par tous les facteurs édaphiques qui peuvent influencer sur la photosynthèse (Postgate et al, 1982).

Dans notre cas, la similarité des variations des taux de nodulation et d'ARA de nos résultats laisse indiquer que le niveau d'efficacité des plants des différentes espèces d'acacias serait déterminé



**Figure 14 :** niveau d'activité nitrogénasique (ARA) (pouvoir fixateur d'azote en  $\mu\text{M}/\text{h}/\text{plante}$ ) des plants d'*Acacia saligna* recueillis au niveau des 12 pépinières ciblées. Les barres représentent la moyenne du pouvoir fixateur d'azote de sa erreur standard. La moyenne, toutes espèces confondues obtenues pour les pépinières du Nord et du Sud du pays sont consignées dans le volet correspondant



**Figure 15:** Régression linéaire du niveau d'activité nitrogénasique (ARA) sur la biomasse nodulaire des plants d'acacias. R représente le coefficient de

*corrélation entre les deux paramètres (Chaque point représente la moyenne arithmétique de 5 plants pour chaque espèce et pour chaque pépinière)*

essentiellement par leur niveau de nodulation comme le montre l'analyse de corrélation qui utilise le test paramétrique de Spearman.

La régression linéaire de l'activité réductrice d'acétylène sur la biomasse nodulaire sèche des différents couples symbiotiques indique que les 2 paramètres sont fortement corrélés puisque l'indice de corrélation obtenu dans ces conditions est de  $R = 0,86$ . Cette corrélation confirme que l'ARA des couples symbiotiques recueillis au niveau des différentes pépinières dépend essentiellement de leur taux de nodulation et ce quelle que soit l'espèce et la pépinière considérée.(Fig.15)

**ASA:** Acacia saligna    **AME:** Acacia melanoxylon    **ALO:** Acacia longifolia  
**AEH:** Acacia ehrenbergiana    **ANI:** Acacia nilotica    **ATO:** Acacia tortilis  
**ABL:** Acacia albida    **ASE:** Acacia seyal    **ALA:** Acacia laeta

|            | Élevation | Contour  | Couleur    | Aspect des colonies | Taille des colonies |
|------------|-----------|----------|------------|---------------------|---------------------|
| AS A-ALG-1 | Convexe   | Régulier | Blanchâtre | Trans lucide        | 3,2                 |
| AS A-ALG-2 | Convexe   | Régulier | Blanchâtre | Trans lucide        | 3,1                 |
| AS A-ALG-3 | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 3,2                 |
| AME-ALG-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Brillant            | 8,7                 |
| AEH-ALG-1  | Convexe   | Lobés    | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,6                 |
| ANH-ALG-1  | Convexe   | Lobés    | Blanchâtre | Trans lucide        | 8,7                 |
| ATO-ALG-1  | Convexe   | Régulier | Blanchâtre | Trans lucide        | 8,7                 |
| ATO-ALG-2  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,5                 |
| ATO-ALG-3  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,7                 |
| AS A-BEJ-1 | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 3,2                 |
| AME-BEJ-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Brillant            | 2,1                 |
| AS A-ANN-1 | Convexe   | Régulier | Blanchâtre | Brillant            | 3,2                 |
| ALO-ANN-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,4                 |
| AS A-JUJ-1 | Convexe   | Régulier | Blanchâtre | Trans lucide        | 3,1                 |
| AME-JUJ-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 3,1                 |
| AS A-SET-1 | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,8                 |
| AME-SET-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,7                 |
| AS A-TLE-1 | Convexe   | Lobés    | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,6                 |
| ALO-TLE-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,7                 |
| AS A-ADR-1 | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,7                 |
| AEH-ADR-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Brillant            | 8,2                 |
| ANH-ADR-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,6                 |
| ATO-ADR-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 11,3                |
| AL-ADR-1   | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,5                 |
| ATO-BEC-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,7                 |
| AS A-DJA-1 | Convexe   | Régulier | Blanchâtre | Trans lucide        | 8,7                 |
| AEH-DJA-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Brillant            | 8,6                 |
| ANH-DJA-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,6                 |
| ATO-DJA-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,7                 |
| AS A-DJE-1 | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,1                 |
| AS A-DJE-2 | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,7                 |
| AS A-DJE-3 | Convexe   | Régulier | Blanchâtre | Trans lucide        | 8,7                 |
| AME-DJE-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Brillant            | 8,7                 |
| AS A-TAM-1 | Convexe   | Lobés    | Rosâtre    | Brillant            | 8,6                 |
| AS A-TAM-2 | Convexe   | Lobés    | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,7                 |
| AS A-TAM-3 | Convexe   | Lobés    | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,7                 |
| AEH-TAM-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,2                 |
| ANH-TAM-1  | Convexe   | Régulier | Blanchâtre | Trans lucide        | 8,7                 |
| ATO-TAM-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Brillant            | 8,5                 |
| ATO-TAM-2  | Convexe   | Régulier | Blanchâtre | Trans lucide        | 8,6                 |
| ATO-TAM-3  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,7                 |
| ALA-TAM-1  | Convexe   | Régulier | Blanchâtre | Trans lucide        | 8,7                 |
| ASE-TAM-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,4                 |
| AL-TAM-1   | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,7                 |
| AS A-OUA-1 | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Trans lucide        | 8,7                 |
| ATO-OUA-1  | Convexe   | Régulier | Rosâtre    | Brillant            | 8,4                 |

**Tableau 11:** Caractéristique morphologique des colonies des souches associées aux acacias après 7 jours d'incubation à 28°C.

## 2 - Caractérisation symbiotique des Rhizobia associées aux acacias

### 2.1 - Caractérisation symbiotique

---

#### 2.1.1 - Isolement

A partir des plants recueillis au niveau des différentes pépinières, nous avons pu extraire et purifier 46 isolats bactériens. Ces isolats forment en milieu YMA RC des colonies visibles à l'œil nu après 2 à 11 jours d'incubation à 28°C, ce qui laisse indiquer que leur taux de croissance est très variable.

Les colonies formées par nos souches sont circulaires, à bord régulier et à élévation convexe. Elles sont toutes de texture homogène et de couleur blanche ou crème ou rosâtre. Aucune d'entre-elles n'a montré de pigmentation ou de fluorescence naturelle.

Elles présentent un aspect translucide et brillant. Ces derniers caractères étant en relation avec l'excrétion à l'extérieur des cellules de polysaccharides extracellulaires (exopolysaccharides ou EPS) responsable de l'aspect mucoïde des colonies de Rhizobia.

La taille des colonies formées par nos souches sur milieu YEMA après 7 jours d'incubation à 28°C est très variable. Elle s'échelonne entre 11,3 mm pour la souche formant les plus grands clones (souche ASA-TAM-1) et 2,1 mm pour les souches formant les plus petits clones: (souches ASA-ALG-1). La taille moyenne des colonies est pour l'ensemble du soucier de l'ordre de 7,46 mm (Tab. 11).

Des observations microscopiques réalisées sur des cellules vivantes colorées au bleu de méthylène et des cellules fixées colorées par la technique de Gram (Vincent, 1970) nous ont permis de vérifier que tous les isolats se présentent sous la forme de bacilles relativement courts et arrondis aux extrémités, tous mobiles et présentant une réaction Gram négatif.

Dans l'ensemble, le soucier que nous avons constitué a présenté des caractéristiques coloniales et cellulaires homogènes, en accord avec les descriptions communément admises pour les rhizobia dans la littérature. La seule différence consistante observée lors de la



+ Plants nodulés                      - Plants non nodulé  
 RSA: Acacia Saligna    RME: Acacia Melanoxylon    RLO: Acacia longifolia  
 REH: Acacia Ehrenbergiana    RMI: Acacia Nilotica    RTO: Acacia Tortilis  
 RAL: Acacia Albida    RSE: Acacia Seyal    RLA: Acacia Laeta

|           | Nodulation | Plante d'origine | Pépinière   | Haute d'aumentation |
|-----------|------------|------------------|-------------|---------------------|
| ASA-ALG-1 | +          | A. saligna       | Akjer       | A. saligna          |
| ASA-ALG-2 | +          | A. saligna       | Akjer       | A. saligna          |
| ASA-ALG-3 | +          | A. saligna       | Akjer       | A. saligna          |
| AME-ALG-1 | -          | A. melanoxylon   | Akjer       | A. melanoxylon      |
| REH-ALG-1 | +          | A. ehrenbergiana | Akjer       | A. ehrenbergiana    |
| RMI-ALG-1 | +          | A. nilotica      | Akjer       | A. nilotica         |
| RTO-ALG-1 | +          | A. tortilis      | Akjer       | A. tortilis         |
| RTO-ALG-2 | +          | A. tortilis      | Akjer       | A. tortilis         |
| RTO-ALG-3 | +          | A. tortilis      | Akjer       | A. tortilis         |
| ASA-BEJ-1 | +          | A. saligna       | Belaja      | A. saligna          |
| AME-BEJ-1 | +          | A. melanoxylon   | Belaja      | A. melanoxylon      |
| ASA-ANN-1 | +          | A. saligna       | Annaba      | A. saligna          |
| RLO-ANN-1 | -          | A. longifolia    | Annaba      | A. longifolia       |
| ASA-JJE-1 | +          | A. saligna       | Jjel        | A. saligna          |
| AME-JJE-1 | +          | A. melanoxylon   | Jjel        | A. melanoxylon      |
| ASA-SET-1 | -          | A. saligna       | Setf        | A. saligna          |
| AME-SET-1 | +          | A. melanoxylon   | Setf        | A. melanoxylon      |
| ASA-TLE-1 | +          | A. saligna       | Tlemce      | A. saligna          |
| RLO-TLE-1 | +          | A. longifolia    | Adrar       | A. longifolia       |
| ASA-ADR-1 | +          | A. saligna       | Adrar       | A. saligna          |
| REH-ADR-1 | +          | A. ehrenbergiana | Adrar       | A. ehrenbergiana    |
| RMI-ADR-1 | +          | A. nilotica      | Adrar       | A. nilotica         |
| RTO-ADR-1 | +          | A. tortilis      | Adrar       | A. tortilis         |
| RAL-ADR-1 | +          | A. albida        | Adrar       | A. nilotica         |
| RTO-BEK-1 | +          | A. tortilis      | Bechar      | A. tortilis         |
| ASA-LUA-1 | +          | A. saligna       | Djaet       | A. saligna          |
| REH-LUA-1 | +          | A. ehrenbergiana | Djaet       | A. ehrenbergiana    |
| RMI-LUA-1 | +          | A. nilotica      | Djaet       | A. nilotica         |
| RTO-LUA-1 | +          | A. tortilis      | Djeita      | A. tortilis         |
| ASA-LUE-1 | -          | A. saligna       | Djeita      | A. saligna          |
| ASA-LUE-2 | +          | A. saligna       | Djeita      | A. saligna          |
| ASA-LUE-3 | +          | A. saligna       | Djeita      | A. saligna          |
| AME-LUE-1 | +          | A. melanoxylon   | Djeita      | A. melanoxylon      |
| ASA-IAM-1 | +          | A. saligna       | Tamanrasset | A. saligna          |
| ASA-IAM-2 | +          | A. saligna       | Tamanrasset | A. saligna          |
| ASA-IAM-3 | +          | A. saligna       | Tamanrasset | A. saligna          |
| REH-IAM-1 | +          | A. ehrenbergiana | Tamanrasset | A. ehrenbergiana    |
| RMI-IAM-1 | +          | A. nilotica      | Tamanrasset | A. nilotica         |
| RTO-IAM-1 | +          | A. tortilis      | Tamanrasset | A. tortilis         |
| RTO-IAM-2 | -          | A. tortilis      | Tamanrasset | A. tortilis         |
| RTO-IAM-3 | +          | A. tortilis      | Tamanrasset | A. tortilis         |
| RAL-IAM-1 | +          | A. laevis        | Tamanrasset | A. tortilis         |
| RSE-IAM-1 | +          | A. seyal         | Tamanrasset | A. longifolia       |
| RAL-IAM-1 | +          | A. albida        | Tamanrasset | A. saligna          |
| ASA-OUA-1 | +          | A. saligna       | Ouarzila    | A. saligna          |
| RTO-OUA-1 | +          | A. tortilis      | Ouarzila    | A. tortilis         |

**Tableau 12: Test d'authentification des souches de BNL étudiées.**

procédure d'extraction et de purification des souches réside dans leur vitesse de croissance. En effet, certaines souches forment des colonies visibles à l'œil nu après seulement 2 à 3 jours d'incubation en milieu YMA tandis que d'autres ne le font qu'après 7 à 9 jours d'incubation. Cette observation laisse indiquer que le souche comporterait des rhizobia à croissance rapide et des rhizobia à croissance lente.

Bien que nos isolats aient présenté sur le plan des caractéristiques coloniales et cellulaires les attributs des Rhizobia, ils ne peuvent être considérés comme tels que s'ils sont capables de noduler leur légumineuse d'origine ou toute autre légumineuses lorsqu'elles sont réinoculées en conditions bactériologiques contrôlées

### 2.1.2 - Authentification des isolats

Une souche bactérienne, même extraite des nodosités d'une légumineuse, ne peut être considérée comme une souche de Rhizobia que si elle est capable d'induire la nodulation,

en conditions bactériologiques contrôlées, après réinoculation à sa plante hôte originelle ou à une plante taxonomiquement voisine (Tab. 12) (Vincent, 1981).

Sur les 46 souches 37 sont authentifiées par leur plante d'origine à l'exception de quatre souches (AAL-ADR-1, ALA-TAM-1, ASE-TAM-1 et AAL-TAM-1) qui ont été authentifiées avec d'autres espèces d'acacias car nous n'avons pas à notre disposition les semences de la plante d'origine de ces espèces (Tab. 12).

Cependant, 5 isolats (AME-ALG-1, ALO-ANN-1, ASA-SET-1, ASA-DJE-1, ATO-TAM-2) soit une proportion de 10,86% se sont révélés pour leur part incapables de noduler la plante d'origine. Il s'agirait dans ce cas :

De souches contaminantes (non-Rhizobiennes) provenant de la surface des nodules et qui auraient échappés à la procédure de stérilisation superficielle du nodule. A l'isolement, ces souches peuvent produire des colonies dont l'aspect est similaire à celui des souches de rhizobia (non-absorption du rouge Congo et aspect mucoïde) et être considérées à tort comme telle. C'est souvent le cas par exemple des souches de *Pseudomonas* bien représentées dans la rhizosphère

- des légumineuses et résistantes aux procédures de stérilisation de la surface nodulaire (Beauchamp, 1993).
- De souches de rhizobia ayant perdu leurs capacités symbiotiques. En effet, les gènes intervenant dans l'établissement de la symbiose chez les légumineuses sont portés par des plasmides (Zeze et al, 2001). Cette localisation prédispose les souches de Rhizobium à la suite de la perte fréquente de leur pouvoir infectif par délétions ou encore par altération de leur plasmide symbiotique (psym) lors du transfert de plasmides entre souches (Fenton, 1994). Pour s'assurer de ce point, nous avons décidé de retenir ces cinq souches pour le reste des analyses et déterminer s'il s'agit de contaminants, endophytes nodulaires ou des souches de rhizobia ayant perdues leurs capacités d'infecter la plante hôte par curage du méga plasmide (psym).
- de souches rhizobiennes ou non rhizobiennes qui seraient des endophytes, c'est-à-dire des souches naturellement présentes au sein du nodule en échappant au système de reconnaissance rhizobia-légumineuse. Ces souches empruntent généralement le cordon d'infection lors de la pénétration dans la racine de la plante hôte d'une souche de rhizobia compétente lors de la procédure d'isolement des bactéries présentes dans le nodule. Ces souches non-compétentes ou non symbiotiques ne peuvent pas induire la nodulation lorsqu'elles sont réinoculées à la plante hôte d'origine, soit du fait qu'elles ne sont pas spécifiques (cas des endophytes rhizobiens) soit du fait qu'elles ne possèdent pas le système génétique requis pour la symbiose (cas des endophytes non rhizobiens).

de souches non rhizobiennes ayant acquis temporairement les gènes requis par la nodulation par transfert vertical et qui les auraient perdus lors de la procédure d'isolement et de purification. C'est souvent le cas pour les représentants du genre *Agrobacterium* qui sont très fréquemment isolés de nodosités de légumineuses (Young, 1994 ; Martinez-Romero, 1994). Cependant, aucun des nombreux auteurs ayant isolé des souches d'*Agrobacterium* à partir de nodules de légumineuses

+ Plants nodulés                      - Plants non nodulés  
**ASA**: Acacia Saligna    **AME**: Acacia Melanoxylon    **ALO**: Acacia longifolia  
**AEH**: Acacia Ehrenbergiana    **ANI**: Acacia Nilotica    **ATO**: Acacia Tortilis  
**AAL**: Acacia Albida    **ASE**: Acacia Seyal    **ALA**: Acacia Laeta.

|           | <i>A. saligna</i> | <i>A. longifolia</i> | <i>A. melanoxylon</i> | <i>A.</i> | <i>A. nilotica</i> | <i>A. tortilis</i> |
|-----------|-------------------|----------------------|-----------------------|-----------|--------------------|--------------------|
| ASA-ALG-1 | +                 | +                    | +                     | -         | -                  | -                  |
| ASA-ALG-2 | +                 | +                    | +                     | -         | -                  | -                  |
| ASA-ALG-3 | +                 | +                    | +                     | -         | -                  | -                  |
| AME-ALG-1 | -                 | -                    | -                     | -         | -                  | -                  |
| AEH-ALG-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ANI-ALG-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ATO-ALG-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ATO-ALG-2 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ATO-ALG-3 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ASA-BEJ-1 | +                 | +                    | +                     | -         | -                  | -                  |
| AME-BEJ-1 | +                 | +                    | +                     | -         | -                  | -                  |
| ASA-ANN-1 | +                 | +                    | +                     | -         | -                  | -                  |
| ALO-ANN-1 | -                 | -                    | -                     | -         | -                  | -                  |
| ASA-JJJ-1 | +                 | +                    | +                     | -         | -                  | -                  |
| AME-JJJ-1 | +                 | +                    | +                     | -         | -                  | -                  |
| ASA-SET-1 | -                 | -                    | -                     | -         | -                  | -                  |
| AME-SET-1 | +                 | +                    | +                     | +         | -                  | +                  |
| ASA-TLE-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ALO-TLE-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ASA-ADR-1 | +                 | +                    | +                     | +         | -                  | +                  |
| AEH-ADR-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ANI-ADR-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ATO-ADR-1 | +                 | +                    | +                     | +         | -                  | +                  |
| AAL-ADR-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ATO-BEC-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ASA-DJA-1 | +                 | +                    | +                     | +         | -                  | +                  |
| AEH-DJA-1 | +                 | +                    | +                     | +         | -                  | +                  |
| ANI-DJA-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ATO-DJA-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ASA-DJE-1 | -                 | -                    | -                     | -         | -                  | -                  |
| ASA-DJE-2 | +                 | +                    | +                     | +         | -                  | +                  |
| ASA-DJE-3 | +                 | +                    | +                     | +         | -                  | +                  |
| AME-DJE-1 | +                 | +                    | +                     | +         | -                  | +                  |
| ASA-TAM-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ASA-TAM-2 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ASA-TAM-3 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| AEH-TAM-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ANI-TAM-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ATO-TAM-1 | +                 | +                    | +                     | +         | -                  | +                  |
| ATO-TAM-2 | -                 | -                    | -                     | -         | -                  | -                  |
| ATO-TAM-3 | +                 | +                    | +                     | +         | -                  | +                  |
| ALA-TAM-1 | +                 | +                    | +                     | +         | -                  | +                  |
| ASE-TAM-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| AAL-TAM-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ASA-OUA1  | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |
| ATO-OUA-1 | +                 | +                    | +                     | +         | +                  | +                  |

**Tableau 13:** Spectre d'hôte des différentes souches isolées

- n'as pu les faire renoduler au laboratoire ou encore mettre en évidence les gènes de la nodulation (Mhamdi et al, 2005 ; Mrabet et al, 2006).
- Par ailleurs, les tests de nodulation ayant été mené sur un substrat stérilisé, on ne peut pas exclure que la non nodulation observée dans le cas de certains isolats soit due à l'absence de groupes bactériens connus pour faciliter la nodulation. En effet, le sol renferme des bactéries dont la présence au niveau de la rhizosphère est de nature à favoriser la nodulation par les rhizobia. En absence de ces groupes bactériens facilitant l'infection des racines et que l'on appelle RFN (rhizobactéries favorisant la nodulation), la nodulation des légumineuses peut être fortement réduite ou totalement inhibée (Triplet et Sadowsky, 1992).

### 2.1.3 - Détermination du spectre d'hôte

**Caractérisation des rhizobia de quelques acacias d'Algérie en vue de la production d'inoculum pour la bactérisation des acacias en pépinières**

Nous avons inoculé nos isolats à des plantules d'acacias introduites (*A. saligna*, *A. longifolia* et *A. melanoxylon*) et des plantules indigènes (*A. ehrenbergiana*, *A. tortilis* et *A. nilotica*).

Nos résultats indiquent que sur les 46 isolats réinoculés, 41 soit 89,13% se sont capables de noduler au moins une des légumineuses cibles lorsqu'elles sont réinoculées en conditions bactériologiques contrôlées à des plantules axéniques (Tab.13) Ces souches peuvent être donc considérées comme des BNL.

Les 41 souches authentifiées comme des rhizobia présentent des spectres d'hôtes variables. Certaines comme AEH-ALG-1, ASA-BEJ-1, ANI-TAM-1 se sont révélées capables de noduler les 6 espèces d'acacias étudiées. A l'opposé, d'autres souches, comme ASA-ALG-1, ASA-ALG-2, ASA-ALG-3 se sont montrées capables de ne noduler que trois espèces d'acacias (*A. saligna*, *A. melanoxylon* et *A. longifolia*), toutes introduites. Enfin, un groupe de souches intermédiaires comportant les souches AME-SET-1, ALA-TAM-1, ATO-TAM-3 assure la nodulation de 4 à 5 des 6 espèces d'acacia testées (Fig.16).

+ Plants nodulés                      - Plants non nodulés  
 ASR: Acacia Saligna    AME: Acacia Melanoxylon    RL0: Acacia longifolia  
 AEH: Acacia Ehrenbergiana    ANI: Acacia Nilotica    RT0: Acacia Tortilis  
 AAL: Acacia Albida    ASE: Acacia Seyal    ALA: Acacia Laeta.



**Figure 16:** Photos de nodules obtenus par le test d'authentification et de l'inoculation croisé.

L'analyse des résultats des tests de nodulation indique que le soucier que nous avons constitué peut être subdivisé en deux groupes de souches :

- Huit (08) souches (ASA-ALG-1, ASA-ALG-2, ASA-ALG-3, ASA-BEJ-1, AME-BEJ-1, ASA-ANN-1, ASA-JIJ-1 et AME-JIJ-1) à spectre de nodulation étroit puisqu'elles ne sont capables de noduler que des espèces d'acacias introduites (*Acacia saligna*, *Acacia longifolia* et *Acacia melanoxylon*). Ces souches proviennent majoritairement de plants d'acacias australiens, recueillis de pépinières du nord du pays. Elles se sont distinguées lors de la procédure d'isolement/purification par une croissance relativement lente puisqu'elles ne forment des colonies visibles à l'œil nu qu'après 7 jours d'incubation.
- Trente et trois (33) souches à spectre de nodulation large puisqu'elles se sont montrées capables de noduler aussi bien des espèces d'acacias introduites qu'indigènes. Ces souches proviennent majoritairement de plants d'acacias introduits ou indigènes recueillis au niveau des pépinières du sud du pays. A l'opposé des précédentes, ces souches sont majoritairement à croissance rapide puisqu'elles forment des colonies visibles à l'œil nu après seulement 2 à 3 jours d'incubation à 28°C en milieu YMA.

Ces résultats indiquent que les taux de nodulation et de fixation d'azote varient suivant le couple symbiotique considéré (Tab.14). Dans le cas d'*A. saligna* par exemple la souche ASA-ALG-2 s'est montré la plus compétente avec un taux de nodulation de  $64,23 \pm 9,90$  mg/plante et une activité nitrogénasique de  $467,73 \pm 86,80$   $\mu$ M de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante. A l'opposé, la souche ANI-DJA-1 est la moins compétente avec un taux de nodulation de  $2,74 \pm 0,93$  mg/plante et une activité nitrogénasique de  $17,18 \pm 1,87$   $\mu$ M de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante.

Les meilleurs taux de nodulation des couples symbiotiques sont enregistrés avec les souches à spectre étroit, (ASA-BEJ-1, ASA-ALG-2, ASA-ALG-1, ASA-ANN-1 et ASA-JIJ-1), les plus efficaces sont ASA-ALG-1,

## Caractérisation des rhizobia de quelques acacias d'Algérie en vue de la production d'inoculum pour la bactérisation des acacias en pépinières

PSN: Poids nodulaire sèche en mg/plante REB : Activité Réductrice Acétylène  
 ASA: *Acacia saligna* AME: *Acacia melanoxylon* ALO: *Acacia longifolia*  
 AEB: *Acacia ehrenbergiana* ANI: *Acacia nilotica* ATO: *Acacia tortilis*  
 ABL: *Acacia albida* ASE: *Acacia seyal* ALA: *Acacia laeta*.

|           | <i>A. saligna</i> |        | <i>A. longifolia</i> |        | <i>A. melanoxylon</i> |        | <i>A. ehrenbergiana</i> |       | <i>A. nilotica</i> |       | <i>A. acacia</i> |        |
|-----------|-------------------|--------|----------------------|--------|-----------------------|--------|-------------------------|-------|--------------------|-------|------------------|--------|
|           | PSN               | REA    | PSN                  | REA    | PSN                   | REA    | PSN                     | REA   | PSN                | REA   | PSN              | REA    |
| ASA-ALG-1 | 53.20             | 393.09 | 38.04                | 284.24 | 38.18                 | 320.91 |                         |       |                    |       |                  |        |
| ASA-ALG-2 | 44.23             | 447.73 | 39.29                | 191.02 | 43.02                 | 391.52 |                         |       |                    |       |                  |        |
| ASA-ALG-3 | 48.44             | 401.13 | 45.10                | 214.02 | 39.09                 | 284.34 |                         |       |                    |       |                  |        |
| AME-ALG-1 |                   |        |                      |        |                       |        |                         |       |                    |       |                  |        |
| AEB-ALG-1 | 18.74             | 101.75 | 15.51                | 89.08  | 12.43                 | 105.25 | 21.75                   | 11.02 | 10.43              | 74.79 | 23.01            | 133.98 |
| ANI-ALG-1 | 13.51             | 114.44 | 14.43                | 97.35  | 13.43                 | 88.48  | 20.10                   | 10.42 | 9.91               | 43.93 | 30.32            | 141.08 |
| ATO-ALG-1 | 14.08             | 131.24 | 15.00                | 119.49 | 15.25                 | 109.29 | 27.11                   | 8.87  | 11.79              | 55.90 | 24.30            | 124.47 |
| ATO-ALG-2 | 17.43             | 110.52 | 13.37                | 98.78  | 10.91                 | 98.48  | 28.97                   | 9.59  | 13.01              | 74.87 | 30.54            | 133.12 |
| ATO-ALG-3 | 12.48             | 91.44  | 15.41                | 91.53  | 12.43                 | 79.29  | 27.84                   | 8.04  | 10.85              | 47.09 | 34.09            | 133.44 |
| ASA-BEI-1 | 43.30             | 173.40 | 45.73                | 129.08 | 53.01                 | 150.30 |                         |       |                    |       |                  |        |
| AAL-BEI-1 | 50.10             | 155.98 | 34.19                | 114.12 | 41.94                 | 135.25 |                         |       |                    |       |                  |        |
| ASA-ABU-1 | 53.92             | 132.78 | 38.94                | 98.47  | 45.15                 | 114.95 |                         |       |                    |       |                  |        |
| ALO-ABU-1 |                   |        |                      |        |                       |        |                         |       |                    |       |                  |        |
| ASA-JIJ-1 | 20.21             | 121.94 | 34.28                | 90.71  | 42.04                 | 107.74 |                         |       |                    |       |                  |        |
| AME-JIJ-1 | 35.88             | 0      | 25.92                | 0      | 30.04                 | 0      |                         |       |                    |       |                  |        |
| ASA-SET-1 |                   |        |                      |        |                       |        |                         |       |                    |       |                  |        |
| AME-SET-1 | 14.12             | 74.60  | 11.43                | 57.24  | 9.19                  | 79.80  | 14.39                   | 7.84  |                    |       | 17.10            | 101.29 |
| ASA-TLE-1 | 15.15             | 82.58  | 12.45                | 41.53  | 9.90                  | 87.84  | 17.43                   | 8.35  | 8.38               | 40.77 | 18.39            | 108.92 |
| ALO-TLE-1 | 11.02             | 40.31  | 9.08                 | 48.98  | 7.17                  | 42.43  | 12.89                   | 4.08  | 4.92               | 57.18 | 13.44            | 84.95  |
| ASA-AIE-1 | 11.75             | 80.41  | 8.78                 | 48.04  | 9.80                  | 80.40  | 8.54                    | 7.43  |                    |       | 10.84            | 78.39  |
| AEB-AIE-1 | 7.32              | 52.58  | 5.31                 | 44.49  | 4.14                  | 52.53  | 5.34                    | 4.29  | 3.08               | 24.94 | 4.77             | 51.29  |
| AAL-AIE-1 | 5.34              | 47.42  | 3.88                 | 40.10  | 4.44                  | 47.37  | 3.92                    | 4.95  | 2.22               | 22.54 | 4.95             | 44.24  |
| ATO-AIE-1 | 10.52             | 54.70  | 7.55                 | 47.94  | 8.79                  | 54.47  | 7.73                    | 5.98  |                    |       | 9.48             | 55.27  |
| AAL-AIE-1 | 8.54              | 98.97  | 4.22                 | 83.78  | 7.17                  | 98.99  | 4.29                    | 9.49  | 3.59               | 47.01 | 7.85             | 94.45  |
| ATO-BEC-1 | 7.84              | 42.89  | 5.92                 | 53.14  | 4.57                  | 42.83  | 5.77                    | 7.22  | 3.33               | 29.83 | 7.20             | 41.29  |
| ASA-DIA-1 | 12.58             | 49.48  | 9.08                 | 41.84  | 10.51                 | 49.49  | 9.18                    | 5.77  |                    |       | 11.41            | 48.28  |
| AEB-DIA-1 | 9.90              | 53.41  | 7.14                 | 45.31  | 4.24                  | 58.49  | 7.22                    | 2.14  |                    |       | 9.14             | 52.24  |
| AAL-DIA-1 | 4.39              | 34.08  | 4.59                 | 30.51  | 5.35                  | 34.04  | 4.44                    | 2.58  | 3.74               | 17.18 | 5.91             | 35.14  |
| ATO-DIA-1 | 8.04              | 39.18  | 5.82                 | 33.14  | 7.78                  | 39.19  | 5.88                    | 1.55  | 3.42               | 18.43 | 5.38             | 32.49  |
| ASA-DIE-1 |                   |        |                      |        |                       |        |                         |       |                    |       |                  |        |
| ASA-DIE-2 | 11.75             | 94.91  | 8.47                 | 81.94  | 9.80                  | 94.87  | 8.04                    | 4.80  |                    |       | 7.85             | 80.45  |
| ASA-DIE-3 | 8.97              | 80.41  | 4.53                 | 70.10  | 7.47                  | 80.40  | 4.08                    | 5.88  |                    |       | 4.13             | 49.03  |
| AME-DIE-1 | 7.01              | 54.44  | 5.10                 | 44.22  | 5.84                  | 54.45  | 4.74                    | 5.47  |                    |       | 4.73             | 45.48  |
| ASA-TAM-1 | 8.35              | 42.89  | 4.02                 | 53.14  | 4.97                  | 42.83  | 5.47                    | 4.95  | 3.25               | 27.78 | 5.59             | 52.37  |
| ASA-TAM-2 | 7.84              | 79.38  | 5.82                 | 47.14  | 4.57                  | 79.39  | 5.34                    | 7.43  | 3.08               | 35.04 | 5.38             | 44.13  |
| ASA-TAM-3 | 9.59              | 85.57  | 4.94                 | 72.35  | 7.98                  | 85.54  | 4.49                    | 10.52 | 3.74               | 37.78 | 4.45             | 71.29  |
| AEB-TAM-1 | 11.45             | 44.33  | 8.37                 | 37.55  | 9.80                  | 44.34  | 7.94                    | 4.85  | 4.53               | 19.57 | 7.85             | 34.99  |
| ANI-TAM-1 | 7.84              | 31.94  | 5.41                 | 27.04  | 4.57                  | 31.92  | 5.34                    | 5.05  | 3.08               | 14.10 | 4.24             | 31.72  |
| ATO-TAM-1 | 7.01              | 47.42  | 5.10                 | 40.10  | 5.84                  | 47.37  | 4.74                    | 4.29  |                    |       | 5.48             | 47.10  |
| ATO-TAM-2 |                   |        |                      |        |                       |        |                         |       |                    |       |                  |        |
| ATO-TAM-3 | 7.84              | 45.24  | 5.41                 | 38.37  | 4.57                  | 45.35  | 5.34                    | 4.29  |                    |       | 4.24             | 45.14  |
| ALA-TAM-1 | 13.41             | 57.73  | 9.80                 | 48.88  | 11.41                 | 57.48  | 9.38                    | 4.80  |                    |       | 10.75            | 57.42  |
| ASE-TAM-1 | 11.45             | 47.42  | 8.37                 | 40.10  | 9.80                  | 47.37  | 7.94                    | 5.15  | 4.53               | 20.84 | 9.25             | 47.10  |
| AAL-TAM-1 | 19.18             | 79.38  | 14.94                | 87.55  | 14.04                 | 89.40  | 13.09                   | 8.74  | 4.94               | 35.04 | 15.14            | 89.03  |
| ASA-OUA-1 | 11.94             | 0      | 8.47                 | 0      | 10.00                 | 0      | 8.14                    | 0     | 4.70               | 0     | 9.44             | 0      |
| ATO-OUA-1 | 7.11              | 0      | 5.10                 | 0      | 5.94                  | 0      | 4.85                    | 0     | 2.82               | 0     | 5.59             | 0      |

**Tableau 14 :** Biomasse nodulaire sèche en mg/plante et activité nitrogénasique en  $\mu\text{M}/\text{h}/\text{plante}$  des plants d'acacias obtenus au laboratoire.

ASA-ALG-2 et ASA-ALG-3. Dans le cas des souches à spectre large, les couples les plus efficaces sont ATO-ALG-1 et AAL-TAM-1.

Les couples symbiotiques obtenus par réinoculation des souches à des plantules axéniques des 6 espèces d'acacias sont dans la grande majorité des cas efficaces (Tab.14 et 15) c'est-à-dire capable de réduire l'azote moléculaire. En effet, sur les 276 combinaisons, 211 couples symbiotiques sont obtenus. Soit 196 une proportion de 92,89 % ont montré une activité réductrice de l'acétylène variant entre  $467,73 \pm 86,80$  avec ASA-ALG-2 et  $14,1 \pm 3,74 \mu\text{M}$  de  $\text{C}_2\text{H}_4/\text{h}/\text{plante}$  avec ANI-TAM-1. Seuls 15 couples symbiotiques, ceux impliquant les souches AME-JIJ-1, ASA-OUA-1 et ATO-OUA-1 ont induit la formation de nodules non fixateurs d'azote avec *Acacia saligna*, *Acacia longifolia* et *Acacia melanoxylon*. Dans le cas de la première et avec les 6 espèces d'acacias dans le cas des 2 dernières.

L'inefficience de ces souches, extraites à partir de nodosités efficaces sur les plants recueillis au niveau des pépinières de Jijel et d'Ouargla, peut trouver son explication dans la présence:

- De souches de rhizobia ayant perdu la capacité de fixer l'azote ; ce qui serait d'autant plus vraisemblable que ces souches sont incapables de fixer l'azote même avec leur plante hôte d'origine
- De souches de rhizobia différentes de celles qui ont induit la formation des nodosités utilisées pour l'extraction des souches. Il s'agirait d'endophytes rhizobien assez spécifiques pour induire la nodulation mais pas assez pour fixer l'azote moléculaire. En effet, la symbiose Rhizobia légumineuse est un processus à spécificité d'étape et une souche peut être capable de noduler la plante mais pas de réduire l'azote moléculaire. Il est alors possible que nous ayons retenu la colonie d'un rhizobia endophyte lors de la purification des souches en raison de la prédominance de ses colonies sur les rhizobia symbiotiques.

La détermination du spectre d'hôte des souches, de leur infectivité et efficacité avec les 6 espèces d'acacias indique que les deux groupes définis précédemment sur la base du spectre d'hôte sont très





acacias australiens tels *Acacia saligna* en Afrique du Sud et dans une moindre mesure *Acacia longifolia* en Europe (Holmes et al. (1997), Susana et al. (2007), Bala et al. (2003))

A l'inverse, lorsqu'une espèce est très spécifique pour son microsymbionte, il arrive souvent qu'elle ne puisse pas établir de symbiose fixatrice d'azote avec les rhizobia indigènes à l'aire d'introduction comme cela a été observé pour de nombreuses légumineuses des régions tempérées particulièrement en Australie où les représentants cultivés des genres *Trifolium*, *Medicago* sont rarement ou peu nodulés. Dans ces conditions, la seule façon d'assurer l'établissement de la symbiose à rhizobia chez ces espèces reste le recours à l'inoculation comme c'est le cas par exemple pour les luzernes et les trèfles en Australie, les luzernes et le pois chiche au Canada.

|  |      | Groupe I | Groupe II |
|--|------|----------|-----------|
| Durée d'incubation moyenne nécessaire à la formation de colonies visibles à l'œil nu |      | 5,7j     | 3,2j      |
| Taille moyenne des colonies après 7 jours d'incubation à 28°C sur milieu YMA-RC      |      | 3,2mm    | 8,7mm     |
| Acidification du milieu YMA-BB   |      | 15%      | 88%       |
| Alcalinisation du milieu YMA-BB  |      | 63%      | 7%        |
| Sans réaction sur milieu YMA-BB  |      | 12%      | 5%        |
| Croissance à 4°C   |      | 0%       | 0%        |
| Croissance à 10°C  |      | 0%       | 3%        |
| Croissance à 15°C  |      | 12,5%    | 6%        |
| Croissance à 20°C  |      | 37,5%    | 24,2%     |
| Croissance à 25°C  |      | 100%     | 100%      |
| Croissance à 30°C  |      | 100%     | 100%      |
| Croissance à 35°C  |      | 62,5%    | 84,8%     |
| Croissance à 40°C  |      | 12,5%    | 36,3%     |
| Croissance à 45°C  |      | 0%       | 9%        |
| Croissance à 50°C  |      | 0%       | 0%        |
| Croissance en présence de NaCl   | 0.5M | 87,5%    | 100%      |
|  | 1M   | 37,5%    | 63,6%     |
|  | 1.5M | 0%       | 6%        |
| Croissance en présence de PEG 6000   | 4%   | 87,5%    | 100%      |
|  | 8%   | 50%      | 90,9%     |
|  | 12%  | 12,5%    | 66,6%     |
|  | 16%  | 0%       | 15,1%     |
| Croissance au pH   | pH3  | 0%       | 0%        |
|  | pH5  | 0%       | 0%        |
|  | pH7  | 87,5%    | 72,7%     |
|  | pH8  | 50%      | 24,2%     |
|  | pH9  | 37,5%    | 24,2%     |
| Spectre d'utilisation des substrats carbonés (b)                                     |      | 62,5%    | 84,8%     |
| Spectre d'utilisation des substrats azotés (b)                                       |      | 75%      | 84,8%     |
| Résistance aux métaux lourds ©   |      | 25%      | 48,4%     |
| Résistance aux antibiotiques c   |      | 25%      | 33,3%     |

**Tableau. 16:** Profils phénotypique des deux groupes d'isolats

a- Colonies visibles à l'œil nu après un maximum de 7 jours

b- pourcentage moyen de substrats carbonés et azotés métabolisés par les souches du groupe considéré

c- pourcentage moyen de métaux lourds ou d'antibiotiques vis-à-vis desquels les souches du groupe considéré sont résistantes

## **3 - Caractérisation microbiologique**

### **3.1 - Caractérisation phénotypique des souches**

---

Pour une caractérisation phénotypique plus poussée des souches authentifiées, nous avons retenus 82 caractères incluant utilisation de différentes sources de carbone et d'azote, la tolérance à la salinité (NaCl) et à la dessiccation (PEG6000), la croissance à différentes températures et pH, la résistance à des agents antibactériens antibiotiques et aux métaux lourds (annexe.6).

#### **3.1.1 - Etude phénotypique**

Nous avons convenus dans cette division de séparer les souches en deux groupes sur la base de leur vitesse de croissance et de leur spectre d'hôte. Dans le premier groupe nous avons rangé 8 souches à croissance lente qui nodulent uniquement une ou plusieurs des trois espèces d'acacias introduites. Ces souches proviennent toutes de plants d'acacias australiens produits par les pépinières du nord du pays.

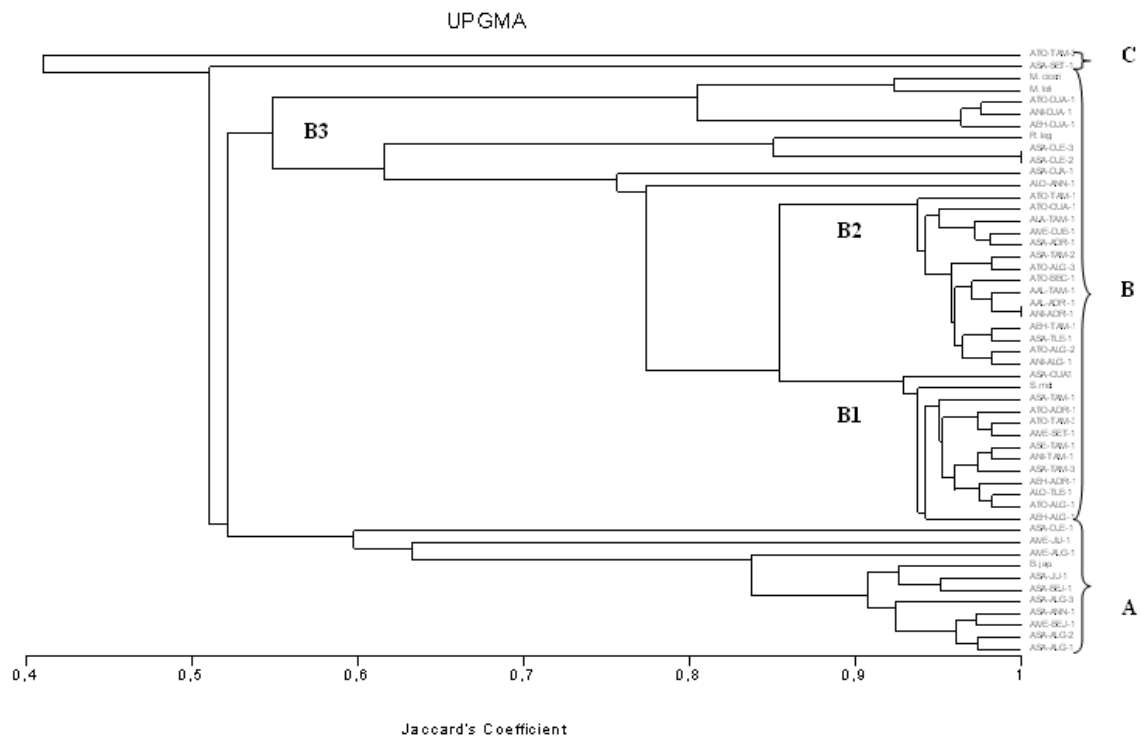
Dans le deuxième groupe nous avons rangés les 33 souches à croissance rapide qui se sont révélées capables de noduler au moins une espèce de chacun des deux lots d'acacias étudiées c'est-à-dire les 3 espèces introduites et les trois espèces indigènes.

L'analyse globale des profils phénotypiques obtenus nous a permis de faire la distinction entre les souches des deux groupes précédemment définis sur la base de leur vitesse de croissance, de la taille de leurs colonies, de leur pouvoir de modifier le pH du milieu YMA-BB, de leur croissance (Tab.16).

Les souches du groupe I, caractérisé par un spectre d'hôte étroit vis-à-vis des différentes espèces d'acacias étudiées se distinguent des souches du groupe II par les caractères essentiels suivants:

- Une vitesse de croissance nettement plus lente; en effet la durée d'incubation moyenne des souches du groupe I est de 5,7j alors que celle du groupe II est de 3,2 j
- Un degré de compétence saprophytique c'est à dire une capacité de métaboliser une large gamme de substrats carbonés plus faible.
- Le spectre d'utilisation des substrats carboné et azoté est plus important chez les souches du groupe II (84,8% pour les deux types de substrats) alors qu'il est respectivement de 62.5 et 75% chez les souches du groupe I
- Une tendance alcalinisatrice vis-à-vis du milieu YMA en présence de la plupart des substrats carbonés testés. Le groupe I a tendance à alcaliniser le milieu (63% contre 7% pour le groupe II; par contre le groupe II a tendance à acidifier le milieu (88% contre 15% pour le groupe I).
- Une tolérance à la salinité (NaCl) vis-à-vis les deux concentrations (0,5M et 1M) tandis que les souches du groupe II tolèrent les trois concentrations 0,5M, 1M et 1,5M avec un taux élevé (100%, 63,6% et 6% contre 87,5%, 37,5% et 0% pour le groupe I).

- Les espèces des groupe I et groupes II ont montré des variations similaires à celles observées pour la salinité ; une tolérance très élevé enregistré pour le groupe II aux PEG (4%, 8% et 12%) et une faible résistance au PEG 16%. Les espèces du groupe I ont montré une très forte sensibilité.
- Les espèces des groupe I et groupes II montrent une prolifération de 100% aux températures de 25°C et 30°C ce qui indique que la microflore édaphique est de nature mésophile. Une proportion relativement faible des espèces du groupe I croît à 35°C et 40°C (respectivement 62,5% et 12,5% contre 84,8 et 36,3 pour le groupe II). Une prolifération nulle à 4°C, 10°C, 45°C et 50°C (0% contre respectivement 0%, 3%, 9% et 0% pour les espèces du groupe II).
- Les espèces des groupe I et groupes II ont une résistance intrinsèque assez importante vis-à-vis les agents antibactériens (25% pour les espèces du groupe I et 33,3% pour celles du groupe II) et aux métaux lourds ; la moyenne des espèces du groupe I s'est révélée faible par rapport à celle du groupe II (respectivement 25% contre 48,8%).



**Figure 17:** Phénogramme représentant la distribution des souches associées aux acacias en tenant compte de l'ensemble des caractères étudiés.

- Une bonne croissance à pH neutre a été constaté pour les deux groupes de rhizobia ce qui indique qu'elles sont neutrophiles. Les souches du groupe II arrivent à proliférer à pH8 et pH9 avec une moyenne de 50%/37,5% contre seulement 24,2% pour les souches du groupe I. Aucune souche ne peut croître au pH3 et pH5.

### 3.1.2 - Analyse numérique

L'analyse numérique des profils phénotypiques obtenus pour les souches de rhizobia étudiées (Fig.17) indique que le souchier est très diversifié. En effet, le taux de similitude des souches varie dans une fourchette allant de 42 à 100.

Le phénogramme indique que le souchier constitué comporte deux clusters principaux A, B et un petit cluster C.

Le cluster A porte les 8 souches du groupe I c'est-à-dire les souches à croissance lente isolée des plants d'acacias exotiques provenant des pépinières du nord du pays et deux autres souches AME-ALG-1 et ASA-DJE-1 non nodulantes. Ce cluster supporte également les souches de référence *Bradyrhizobium japonicum*. Ce qui laisse suggérer que les souches du cluster A seraient apparentées au genre *Bradyrhizobium*.

Le cluster B et C portent, quant à eux, les souches du groupe II c'est-à-dire les souches à croissance rapide associées aux acacias indigènes au niveau de toutes les pépinières et aux acacias exotiques au niveau des pépinières du sud. Le cluster B est composé de trois sous cluster le premier B1 est plus homogène (93% de similitude) renferme les souches ayant des caractéristique proche de *Sinorhizobium meliloti*, le deuxième B2 renferme les souches qui se trouvent entre les deux souches de références (*S.meliloti* et *R.leguminosarum* avec un pourcentage de similitude de 86%. Alors que le troisième le moins homogène (54%) renferme les souches proches de *R.leguminosarum*, *M.loti* et *M.ciceri*.

La proximité, au niveau de ce cluster des références de *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium léguminosarum* et deux *Mesorhizobium* (*M.ciceri* et *M.loti*) indique que les souches du groupe II seraient apparentées à l'un de ces trois genres. En dehors de ces subdivisions majeures, le phénogramme montre des branches mineures portant quelques souches qui se distinguent des autres comme par exemple la branche C, qui porte la souche ATO-TAM2 et la souche ASA-SET1, deux souches qui se sont révélées incapables de renoduler les plants des 6 espèces d'acacias au laboratoire et dont la position excentrée sur le dendrogramme laisse supposer qu'elles ne sont apparentés à aucune des souches de références incluses dans l'analyse et portées par des cluster différentes.

Cependant, la proximité phénotypique des souches de référence, aussi étroite soit elle, ne nous peuvent pas assigner nos souches à un groupede rhizobia précis. En effet, des souches d'espèces, voire de genres différents peuvent présenter des profils phénotypiques sensiblement identiques.

Par conséquent, en dehors des souches du groupe I qui sont très vraisemblablement des bradyrhizobium en raison de la lenteur de leur croissance et de leur spectre d'utilisation des substrats carbonés et de leur caractère alcalinisant, les autres souches peuvent appartenir à n'importe lequel des autres genres de rhizobia qui, rappelons le, ne présentent pas de caractéristiques phénotypiques discriminantes.

Les résultats de cette analyse illustrent bien les limites de la taxonomie numérique comme outil de classification et d'identification des rhizobia. En effet, même si le nombre

de caractères pris en considération est «élevé», la phénétique ne reflète, en réalité, qu'une quantité réduite d'information de surcroît basée sur des caractères instables en raison de la plasticité du génome bactérien. C'est pour cette raison qu'elle est aujourd'hui surtout utilisée comme outil d'évaluation de la diversité ou en complément des techniques de biologie moléculaire dans les approches polyphasiques (De lajudie et Zakhia, 2006) telles que requises par le comité taxonomique international pour toute description d'espèce nouvelle.

Ces caractéristiques des souches du groupe I, en particulier leur vitesse de croissance lente et leur caractère alcalinisant, laissent indiquer qu'elles seraient apparentées au genre *Bradyrhizobium* ou rhizobia à croissance lente, un genre prédominant en milieu tropical qui comporte aujourd'hui 7 espèces dont deux qui ne sont pas nodulantes (*B. betae* et *B. iriomotense*) (Jordan, 1982).

A l'opposé, les caractéristiques des souches du groupe II suggèrent qu'elles feraient partie des Rhizobia à croissance rapide, un groupe de rhizobia prédominant en zones tempérées et qui est représenté aujourd'hui par 12 genres et près de 80 espèces si l'on inclut les *B. rhizobia* et les espèces reconnues comme non nodulantes (Jordan, 1982).

Aussi, pour préciser la nature des souches associées aux acacias dans les pépinières d'Algérie et évaluer leur diversité, nous avons fait appel à la PCR-RFLP (polymorphisme de restriction) du 16s rDNA.

## 3.2 - Caractérisation géotypique

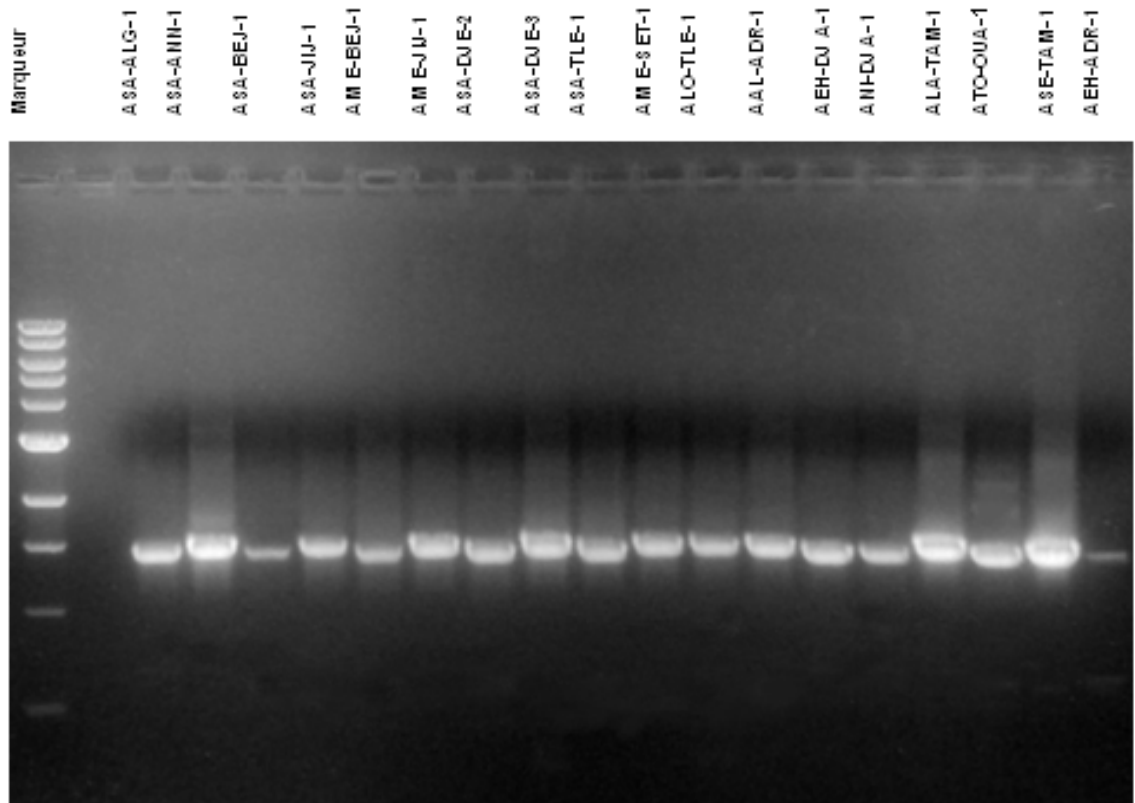
### 3.2.1 - Profils de restriction du 16s rDNA

Le gène de l'ARN 16s bien conservé et abondant dans les cellules est utilisé pour identifier les rhizobia au niveau générique ou spécifique. En 1983, Kimura a émis le concept d'horloge "évolutionnaire": la vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement de conséquences phénotypiques, mais elles sont étroitement corrélées avec le temps. Pour ces raisons Woese, (1987) a proposé l'horloge moléculaire comme un moyen de dater la divergence entre les organismes.

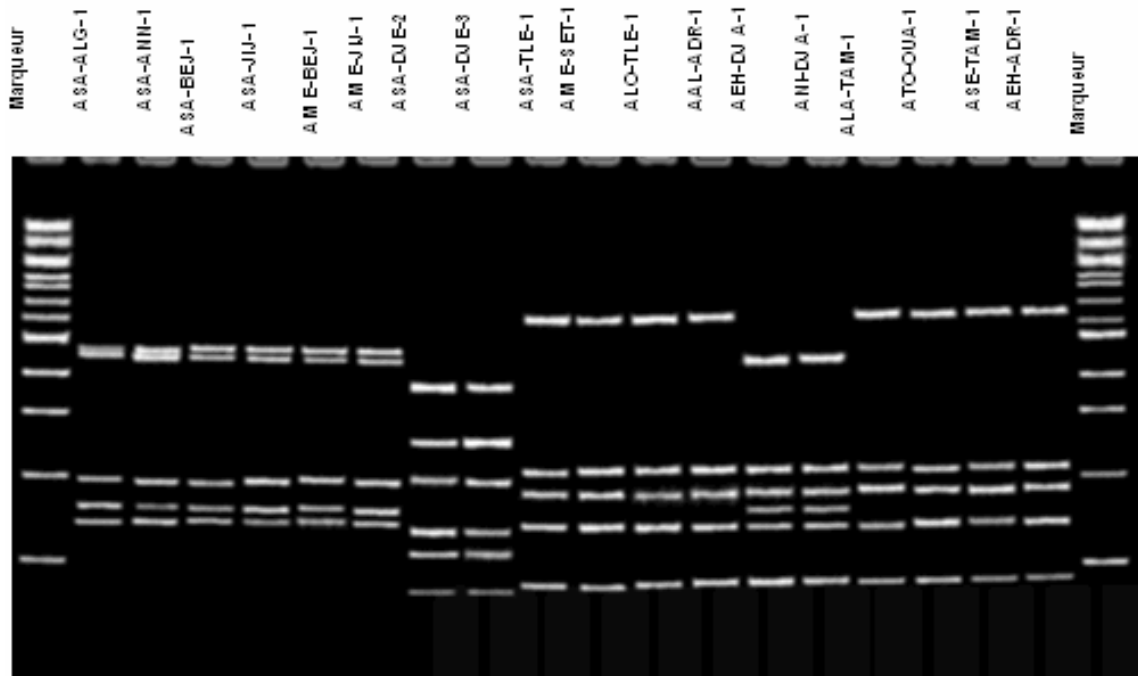
Cette relative stabilité de l'évolution a pour conséquence que la PCR-RFLP du 16s rDNA de différentes espèces donne le même profil et dans le pire des cas le même profil est obtenu pour le même genre.

Généralement, la PCR-RFLP du 16s rDNA présente une résolution au niveau spécifique. Cependant, lorsqu'on utilise un nombre réduit d'enzymes de restriction, il est courant de trouver des espèces différentes présentant le même profil de restriction. En effet la différence entre les séquences 16s de certaines espèces très apparentées n'est pas assez importante pour produire des fragments de restriction différents. C'est le cas par exemple pour *Sinorhizobium meliloti* et *Sinorhizobium medicae*, des biovars de l'espèce *Rhizobium léguminosarum* ou pour les représentants du genre *Bradyrhizobium*.

**Caractérisation des rhizobia de quelques acacias d'Algérie en vue de la production d'inoculum pour la bactérisation des acacias en pépinières**



**Figure 18 :** électrophorèse des amplifiats obtenus par PCR-RFLP de l'rADN 16s.de quelques souches nodulant les acacias.



**Figure 19 :** Profils électrophorétique de la restriction par RFLP de l'ADNr 16S obtenue pour quelques souches après la digestion par endonuclease ALU1.

Toutefois, en utilisant un grand nombre de restictases, la PCR RFLP du 16s permet de distinguer les différentes espèces au niveau d'un genre et même les différents biovars au sein de la même espèce. (Amarger et al, 1997 Laguerre et al, 1994).

L'électrophorèse des amplifiats du 16s rDNA des souches associées aux différentes espèces d'acacias étudiées indique que sa taille est de l'ordre de 1500 pb pour toutes les souches. En effet, la taille du gène de l'ARN 16s est de 1500 pb pour tous les procaryotes (Laguerre et al, 1994) (Fig.18).

L'établissement des profils de restriction du 16s rDNA vis-à-vis de 4 enzymes de restriction (AluI, HhaI, HinfI et MspI) appliquées isolément sur le produit d'amplification du 16s rDNA des 46 souches, nous a permis de mettre en évidence 21 électromorphes différents pour les 4 enzymes de restrictions utilisées (Fig.19). Le plus grand nombre d'électromorphes a été obtenu pour AluI (Figure 19) et HinfI (6 électromorphes) et le plus petit avec HhaI et MspI (5 électromorphes). Les enzymes AluI et HinfI se révèlent ainsi les plus discriminantes et HhaI et MspI, les enzymes les moins discriminantes.

L'association des électromorphes obtenus avec les 4 enzymes de restriction a permis de définir pour les 46 souches, 6 profils électromorphiques différents:

- AAAA : ASA-ALG-1, ASA-ALG-2, ASA-ALG-3, ASA-BEJ-1, AME-BEJ-1, ASA-ANNI-1, ASA-JIJ-1 et AME-JIJ-1.
- HCCD : AEH-ALG-1, ANI-ALG-1, ATO-ALG-1, ATO-ALG-2, ATO-ALG-3, AME-SET-1, ASA-TLE-1, ALO-TLE-1, ASA-ADR-1, AEH-ADR-1, ANI-ADR-1, ATO-ADR-1, AAL-ADR-1, ATO-BEC-1, ATO-DJA-1, AME-DJE-1, ASA-TAM-1, ASA-TAM-2, ASA-TAM-3, AEH-TAM-1, ANI-TAM-1, ATO-TAM-1, ATO-TAM-3, ALA-TAM-1, ASE-TAM-1, AAL-TAM-1, ASA-OUA-1 et ATO-OUA-1.
- DCDB : ASA-DJA-1, AEH-DJA-1 et ANI-DJA-1.
- EDGE : ASA-DJE-2 et ASA-DJE-3.
- IEEE : AME-ALG-1, ALO-ANI-1, ASA-SET-1 et ASA-DJE-1.





Cependant les deux génotypes (IEEE et JFFF) ne correspondent à aucun des profils obtenus pour les 4 souches de références. Il s'agit des souches AME-ALG-1, ALO-ANN-1, ASA-SET-1, ASA-DJE-1 et ATO-TAM-2 qui étant toutes incapables de noduler au moins une des 6 espèces d'acacias, peuvent être considérés à ce niveau comme n'étant pas des rhizobia et qu'il s'agit vraisemblablement de souches contaminantes ou endophytes.

Parmi les 41 souches qui peuvent être apparentés au rhizobia, celles du groupe I, caractérisées par un spectre d'hôte étroit et une origine septentrionale ont toutes présenté le même profil électromorphique, AAAA ; ce profil est similaire à celui obtenu dans les mêmes conditions pour *Bradyrhizobium japonicum*, ce qui indique que les souches du groupe I appartiennent bien cette espèce comme l'indique leur proximité avec la souche de référence *Bradyrhizobium japonicum* sur le phénogramme (Fig. 17). Nos résultats laissent indiquer que les espèces introduites sont nodulées par les *Bradyrhizobium* au nord du pays.

Les souches du groupe II se sont révélées quant à elle beaucoup moins homogènes sur le plan génotypique. En effet, les 33 souches de ce groupe ont montré 3 génotypes différents: HCCD, DCDB, EDGE, ces trois génotypes correspondent respectivement à ceux obtenus pour les souches de références incluses dans l'analyse PCR RFLP, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti* et *Rhizobium gallicum*.

Le génotype le plus fréquent chez ces souches avec un pourcentage de 60,68% est le génotype HCCD similaire à celui de *Sinorhizobium meliloti*. Ces souches appartiennent donc à l'espèce *Sinorhizobium meliloti* qui se révèle l'espèce la plus fréquemment associée avec les espèces d'acacias. Ce résultat indique que les espèces indigènes sont nodulées en majorité par des *Sinorhizobium meliloti* dans les pépinières que ce soit au sud ou au nord du pays.

Les autres souches du groupe II ont montré un profil similaire à celui obtenu pour les souches de référence du genre *Rhizobium* ; ce sont les isolats provenant de la pépinière de Djanet (ASA-DJA-1, AEH-DJA-1 et ANI-DJA-1). D'autres sont similaires au profil des souches de référence de *Mesorhizobium* ; c'est le cas des isolats de Djelfa (ASA-DJE-2 et ASA-DJE-3). Ces souches peuvent être affiliées par conséquent respectivement aux genres *rhizobium* et *Mesorhizobium*.

L'analyse des souches extraites des nodosités des 6 espèces d'acacias indique que ce groupe de plante peut être nodulé par des souches de rhizobia appartenant à 4 genres différents *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Rhizobium*.

Les espèces indigènes *Acacia ehrenbergiana*, *Acacia nilotica* et *Acacia tortilis* sont nodulées essentiellement par des *Sinorhizobium* que ce soit au nord ou au sud du pays.

Les espèces exotiques ont montré quant à elles une différence dans leur « choix » de rhizobia selon qu'elles proviennent de pépinières du Nord ou du Sud du pays. Au nord du pays, ces espèces sont nodulées par des souches de *Bradyrhizobium*, leur microsymbiote préférentiel (Odee *et al*, 1998 ; Dommergues *et al*, 1999 ; Hatimi *et al*, 2001 ; Mansour *et al*, 2003 ; Räsänen et Lindstrom, 2003), tandis qu'au sud elles le sont par des rhizobia à croissance rapide du genre *Sinorhizobium* et accessoirement des genres *Rhizobium* et *Mesorhizobium*.

Cette différence dans la nature des rhizobia associés aux acacias introduits au niveau des pépinières du Nord et du Sud du pays laisse indiquer que la microflore rhizobienne des sols utilisés pour la production des plants au niveau de ces deux régions est très dissemblable.

Les *Bradyrhizobium*, qui semblent prédominants ou plus compétitifs au niveau des pépinières du Nord, étant plus compétents vis-à-vis des acacias australiens que les autres Rhizobia (Odee et al, 1998 ; Dommergues et al, 1999 ; Hatimi et al, 2001 ; Mansour et al, 2003 Räsänen et Lindstrom, 2003), nodulent de manière exclusive les plants d'*Acacia saligna*, *Acacia longifolia* et *Acacia melanoxylon*.

A l'opposé, dans les sols des pépinières du Sud, la population de *Bradyrhizobium* est vraisemblablement absente, réduite ou peu compétitive et les acacias australiens sont donc nodulés par la population rhizobienne compétente la plus représentée et/ou la plus compétitive ; des *Sinorhizobium* dans la majorité des cas, *Rhizobium* dans le cas de la pépinière de Djanet et *Mesorhizobium* dans le cas de la pépinière de Djelfa.

L'absence, la faible représentation ou compétitivité des *Bradyrhizobium* dans les sols des pépinières du Sud peut s'expliquer par une inadaptation de celles-ci à la dessiccation, aux températures élevées et la salinité qui affectent les sols du Sud (Zahran, 1999 ; Graham, 2007).

Des disparités régionales de la nature des Rhizobia nodulant les acacias ou d'autres légumineuses ont été rapportées par de nombreux auteurs qui les attribuent à la sélection par les plantes hôtes et aux facteurs du milieu de la microflore rhizobienne spécifiques et à un couvert végétal donné (Lafay et Burdon, 2001 ; Liu et al, 2005 ; Gu et al, 2007). Dans le cas des acacias, Barnet et Catt, (1991) ont montré que les Rhizobia associés aux acacias australiens en Nouvelle-Galles-du-Sud sont représentés par des *Rhizobium* dans les zones arides et par des *Bradyrhizobium* en forêt pluviale et dans la zone chaude littorale.

### **3.2.2 - Séquence de 16s rDNA**

Les séquences d'ARN ribosomal (ARNr) 16S sont très fréquemment utilisées pour l'identification au niveau spécifique.

Pour une identification plus précise des souches de rhizobia associées aux acacias dans les pépinières d'Algérie et la mise en évidence de leurs relations phylogénétiques nous avons procédé au séquençage d'une souche de chacun des génotypes déterminés par la PCR-RFLP.

Les souches retenues sont ASA-ALG-3, ASA-DJE-3, ATO-BEC-1, ANI-DJA-1 et ASE-TAM-1 représentative des groupes PCR RFLP assignés au genre *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* et *Mesorhizobium* et les souches IEEE et JFFF représentatives des groupes PCR-RFLP obtenus pour les isolats incapables de renoduler au laboratoire au moins une des 6 espèces d'Acacias.

### **3.2.3 - Similitude de séquence**

**Tableau 16 : Résultats du blaste préliminaire sur NCBI Gen-Bank montrant les souches séquencées les plus apparentées à celles des 5 souches isolés d'acacias et retenu pour séquençage.**

| <b>Souche d'acacias</b> | <b>Souche de référence la plus proche</b>  |
|-------------------------|--|
| ASA-ALG-3               | 99% <i>Bradyrhizobium</i> (sp/japonicum /yuanmingense /liaoningense / bacterium) |
| ASA-DJE-3               | 99% <i>Mesorhizobium loti</i>  |
| ATO-BEC-1               | 99% <i>Sinorhizobium (meliloti /sp)</i>  |
| ANI-DJA-1               | 99% <i>Rhizobium (gallicum /sp /loessense)</i>                                   |
| ASE-TAM-1               | 98% <i>Sinorhizobium (meliloti /sp/Kummerowiae)</i>                              |

La matrice de similitude obtenue à l'aide de ClustalW par comparaison des séquences de nos souches avec celles de souches types recueillis à partir de NCBI Gen-Bank figure au tableau 17. Celle-ci indique que les séquences des souches ATO-BEC-1, ANI-DJA-1, ASA-ALG-3, ASA-DJE-3 et

|                                       | B._betae_PL7HG1_(AY372184) | B._elkanii_USDA_76_(U35000) | B._iriotomense_EK05_(AB300992) | B._japonicum_LMG_6138_(X66024) | B._liaoningense_LMG_18230_(AJ250813) | M._ciceri_UPM-Ca7_(U07934) | M._loti_ATCC_33669_(D14514) | M._mediterraneum_UPM-Ca36_(L38825) | R._etli_CFN_42_(U28916) | R._galegae_ATCC_43677_(D11343) | R._gallicum_R602sp_(U86343) | R._giardinii_H152_(U86344) | R._leguminosarum_LMG_14904_(AM181757) | S._americanum_CFNEL_156_(AF506513) | S._arboris_LMG_14919_(AM181744) | S._fredii_ATCC_35423_(D14516) | S._medicae_LMG_19921_(AM181754) | S._meliloti_LMG_6133_(X67222) | S._saheli_LMG_7837_(X68390) | S._terangae_LMG_7834_(X68388) | ATO-BEC1.seq | ANI-DJA1.seq | ASA-ALG3.seq | ASA-DJE3.seq | ASE-TAM1.seq |
|---------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| B._betae_PL7HG1_(AY372184)            | ***                        | 97,1                        | 99,1                           | 99,4                           | 98,5                                 | 88,8                       | 88,8                        | 90,9                               | 89,7                    | 90,1                           | 88,8                        | 89,9                       | 89,8                                  | 89,8                               | 89,5                            | 89,6                          | 89,3                            | 89,6                          | 89,8                        | 88,8                          | 89,8         | 99,1         | 88,5         | 88,1         |              |
| B._elkanii_USDA_76_(U35000)           | 2,9                        | ***                         | 96,7                           | 97,6                           | 95,1                                 | 90,1                       | 90,9                        | 89,7                               | 88,8                    | 89,8                           | 89,9                        | 89,2                       | 89,6                                  | 89,5                               | 89,1                            | 89,1                          | 89,7                            | 90,7                          | 89,7                        | 88,6                          | 89,5         | 97,2         | 88,8         | 88,8         |              |
| B._iriotomense_EK05_(AB300992)        | 0,9                        | 3,4                         | ***                            | 98,8                           | 98,9                                 | 89,9                       | 89,6                        | 90,3                               | 89,3                    | 90,3                           | 89,1                        | 89,1                       | 89,9                                  | 89,6                               | 89,6                            | 89,6                          | 89,8                            | 89,8                          | 89,8                        | 89,8                          | 89,8         | 99,1         | 98,8         | 88,3         |              |
| B._japonicum_LMG_6138_(X66024)        | 0,6                        | 2,4                         | 1,2                            | ***                            | 88,8                                 | 88,8                       | 88,8                        | 89,9                               | 89,9                    | 89,9                           | 89,9                        | 89,9                       | 89,9                                  | 89,9                               | 89,9                            | 89,9                          | 89,9                            | 89,9                          | 89,9                        | 89,9                          | 89,9         | 99,1         | 98,8         | 88,8         |              |
| B._liaoningense_LMG_18230_(AJ250813)  | 0,6                        | 2,5                         | 1,1                            | 0,2                            | ***                                  | 88,8                       | 88,8                        | 89,9                               | 89,9                    | 89,9                           | 89,9                        | 89,9                       | 89,9                                  | 89,9                               | 89,9                            | 89,9                          | 89,9                            | 89,9                          | 89,9                        | 89,9                          | 89,9         | 99,1         | 98,8         | 88,8         |              |
| M._ciceri_UPM-Ca7_(U07934)            | 13                         | 5                           | 12                             | 13                             | 13                                   | ***                        | 99,9                        | 98,4                               | 93,9                    | 93,9                           | 93,9                        | 95,2                       | 94,7                                  | 95,7                               | 96,3                            | 96,6                          | 96,6                            | 95,9                          | 95,9                        | 95,9                          | 93,3         | 88,9         | 94,1         | 94,9         |              |
| M._loti_ATCC_33669_(D14514)           | 12                         | 11                          | 12                             | 13                             | 13                                   | 0,4                        | ***                         | 98,6                               | 93,4                    | 94,4                           | 93,9                        | 95,3                       | 94,7                                  | 95,7                               | 96,3                            | 96,6                          | 96,6                            | 95,9                          | 95,9                        | 95,9                          | 93,3         | 88,9         | 94,1         | 94,9         |              |
| M._mediterraneum_UPM-Ca36_(L38825)    | 12                         | 10                          | 12                             | 12                             | 12                                   | 1,5                        | 1,5                         | ***                                | 93,6                    | 94,4                           | 94,9                        | 95,7                       | 94,2                                  | 96,4                               | 96,6                            | 96,6                          | 96,6                            | 95,9                          | 95,9                        | 95,9                          | 93,3         | 88,9         | 94,1         | 94,9         |              |
| R._etli_CFN_42_(U28916)               | 11                         | 5                           | 12                             | 11                             | 11                                   | 7,1                        | 7,1                         | 7                                  | ***                     | 95,9                           | 98,8                        | 95,8                       | 98,8                                  | 95,8                               | 95,8                            | 95,8                          | 95,8                            | 95,8                          | 95,8                        | 95,8                          | 95,8         | 93,3         | 88,9         | 94,1         |              |
| R._galegae_ATCC_43677_(D11343)        | 11                         | 11                          | 11                             | 11                             | 11                                   | 6,1                        | 5,7                         | 5,4                                | 5,2                     | ***                            | 96,9                        | 95,2                       | 95,2                                  | 94,3                               | 94,3                            | 94,3                          | 94,3                            | 94,3                          | 94,3                        | 94,3                          | 94,3         | 93,3         | 88,9         | 94,1         |              |
| R._gallicum_R602sp_(U86343)           | 11                         | 12                          | 11                             | 11                             | 11                                   | 7                          | 6,7                         | 6,4                                | 2,1                     | 3,7                            | ***                         | 95,2                       | 97,2                                  | 95,2                               | 94,3                            | 94,3                          | 94,3                            | 94,3                          | 94,3                        | 94,3                          | 94,3         | 93,3         | 88,9         | 94,1         |              |
| R._giardinii_H152_(U86344)            | 13                         | 12                          | 13                             | 13                             | 13                                   | 4                          | 5                           | 4,6                                | 4,9                     | 5,3                            | 4,7                         | 5,2                        | ***                                   | 95,4                               | 96,6                            | 96,6                          | 96,6                            | 96,6                          | 96,6                        | 96,6                          | 96,6         | 96,6         | 96,6         | 96,6         |              |
| R._leguminosarum_LMG_14904_(AM181757) | 11                         | 12                          | 11                             | 11                             | 11                                   | 6,3                        | 6,2                         | 6,3                                | 1,2                     | 4,8                            | 2,7                         | 5                          | ***                                   | 95,5                               | 95,5                            | 95,5                          | 95,5                            | 95,5                          | 95,5                        | 95,5                          | 95,5         | 97,2         | 89,9         | 94,6         |              |
| S._americanum_CFNEL_156_(AF506513)    | 11                         | 8                           | 11                             | 11                             | 12                                   | 4,8                        | 4,8                         | 4,1                                | 5,1                     | 6,1                            | 5                           | 3,8                        | 4,8                                   | ***                                | 98,9                            | 99,8                          | 99,8                            | 99,8                          | 99,8                        | 99,8                          | 99,8         | 95,8         | 89,9         | 95,8         |              |
| S._arboris_LMG_14919_(AM181744)       | 12                         | 11                          | 11                             | 12                             | 12                                   | 4                          | 4                           | 4,5                                | 5                       | 6,2                            | 5,6                         | 3,8                        | 4,6                                   | 1,2                                | ***                             | 98,8                          | 99,8                            | 99,8                          | 99,8                        | 99,8                          | 99,8         | 94,6         | 89,9         | 96,4         |              |
| S._fredii_ATCC_35423_(D14516)         | 12                         | 11                          | 11                             | 12                             | 12                                   | 5                          | 4,6                         | 4,3                                | 5,3                     | 5,9                            | 4,8                         | 3,7                        | 5                                     | 0,2                                | 1,4                             | ***                           | 99,7                            | 98,5                          | 97,9                        | 97,9                          | 94,6         | 89,9         | 95,6         |              |              |
| S._medicae_LMG_19921_(AM181754)       | 12                         | 11                          | 11                             | 12                             | 12                                   | 4,4                        | 4,3                         | 4,8                                | 5                       | 6,3                            | 5,8                         | 3,4                        | 4,4                                   | 1,3                                | 0,4                             | 1,4                           | ***                             | 99,7                          | 98,5                        | 97,9                          | 97,9         | 94,6         | 89,9         | 95,6         |              |
| S._meliloti_LMG_6133_(X67222)         | 12                         | 11                          | 12                             | 12                             | 12                                   | 4,4                        | 4,3                         | 4,8                                | 5,1                     | 6,5                            | 5,8                         | 3,7                        | 4,6                                   | 1,1                                | 0,4                             | 1,3                           | 0,3                             | ***                           | 98,8                        | 97,9                          | 97,9         | 94,6         | 89,9         | 95,6         |              |
| S._saheli_LMG_7837_(X68390)           | 12                         | 10                          | 11                             | 12                             | 12                                   | 4,9                        | 4,9                         | 4,2                                | 5                       | 6,1                            | 5                           | 4,3                        | 4,9                                   | 0,4                                | 1,3                             | 0,6                           | 1,7                             | 1,4                           | ***                         | 99,1                          | 95,8         | 89,9         | 95,8         | 97,5         |              |
| S._terangae_LMG_7834_(X68388)         | 11                         | 10                          | 11                             | 11                             | 12                                   | 4,5                        | 4,5                         | 3,9                                | 5                       | 5,8                            | 5                           | 4,1                        | 5                                     | 1,4                                | 2,1                             | 1,5                           | 2,4                             | 2,4                           | 1,1                         | ***                           | 97,3         | 95,8         | 95,8         | 96,7         |              |
| ATO-BEC1.seq                          | 13                         | 12                          | 12                             | 13                             | 13                                   | 5                          | 4,9                         | 5,5                                | 5,8                     | 7,1                            | 6,5                         | 4,4                        | 5,1                                   | 1,9                                | 1,1                             | 2                             | 1                               | 0,7                           | 2,1                         | 3,1                           | ***          | 93,3         | 88,9         | 95,9         |              |
| ANI-DJA1.seq                          | 12                         | 11                          | 11                             | 12                             | 12                                   | 7,4                        | 7                           | 6,8                                | 2,4                     | 4                              | 0,3                         | 5,6                        | 3                                     | 5,3                                | 6                               | 5,1                           | 6,2                             | 6,2                           | 5,4                         | 5,4                           | 6,9          | ***          | 89,9         | 93,3         |              |
| ASA-ALG3.seq                          | 1                          | 2,9                         | 1,6                            | 0,4                            | 0,6                                  | 5                          | 5                           | 7                                  | 9                       | 1                              | 9                           | 6                          | 3                                     | 3                                  | 7                               | 5                             | 8                               | 13                            | 5                           | 3                             | 7            | 1            | ***          | 13,9         |              |
| ASA-DJE3.seq                          | 13                         | 12                          | 13                             | 13                             | 13                                   | 0,7                        | 0,3                         | 1,9                                | 7,5                     | 6                              | 7                           | 5                          | 6,5                                   | 5,1                                | 4,4                             | 5                             | 4,6                             | 4,6                           | 5,2                         | 4,9                           | 5,3          | 7,4          | 13,9         | ***          |              |
| ASE-TAM1.seq                          | 13                         | 12                          | 13                             | 13                             | 13                                   | 5,1                        | 5                           | 5,5                                | 5,8                     | 7,2                            | 6,5                         | 4,4                        | 5,2                                   | 1,9                                | 1,2                             | 2,1                           | 1,1                             | 0,8                           | 2,2                         | 3,2                           | 0,2          | 6,9          | 13,8         | ***          |              |

**Tableau 17: Matrice de similitude obtenue à l'aide de clustaw par comparaison des séquences de nos souches avec celles de souches types recueillis à partir de NCBI GenBank.**

ASE-TAM-1 ont présenté leur plus grand degré de similitude avec Sinorhizobium meliloti/ medicae avec 99.4%/99,1%, Rhizobium gallicum avec 99.7%, Bradyrhizobium japonicum avec 99.6%, Mesorhizobium loti et avec 99.7% et Sinorhizobium meliloti avec 98,8%, respectivement et ce en accord avec les conclusions précédemment tirées lors de l'analyse des profils de restriction de l'ARN 16 de ces souches.

En dehors des souches dont le profil de restriction du gène de l'ARN 16s s'est montré similaire avec celui des souches de références incluses dans l'analyse, 4 souches ont présenté un profil différent pour les 4 souches de références utilisées. Il s'agit des souches

AME-ALG-1, ALO-ANNI-1, ASA-SET-1 qui ont présentés le profil IEEF et ATO-TAM-2 qui a présenté le profil JFFF.

Ce résultat laisse indiquer que ces souches qui s'étaient révélés incapable de renoduler les plants des 6 d'acacias ne sont pas effectivement des souches de rhizobia.

Ces deux souches sont donc des contaminants de la surface du nodule ou des endophytes que nous avons à tort considérés comme des rhizobia lors de la procédure d'extraction-purification des souches. Bien que de nombreux auteurs aient isolé des *Agrobacterium* à partir des nodules de nombreuses légumineuses et ont argué que ces derniers, si proches des rhizobia au point d'être intégrés au genre *Rhizobium*, ont pu acquérir les gènes requis pour nodulation et fixation par transfert horizontal, aucun, n'as pu prouver à ce jour cette éventualité.

La reconstruction phylogénétique effectuée à l'aide d'un logiciel MEGA en prenant en compte les séquences du gène 16S des 4 souches associées aux acacias et 69 souches types de rhizobia obtenus auprès de NCBI-GenBank nous a permis de construire l'arbre représenté par la figure 20.

Cet arbre représente toutes les branches phylogénétiques supportent des espèces capables d'établir une symbiose nodulaire avec les légumineuses. On y distingue 4 grandes lignées :

- lignée des Mesorhizobium et Sinorhizobium.

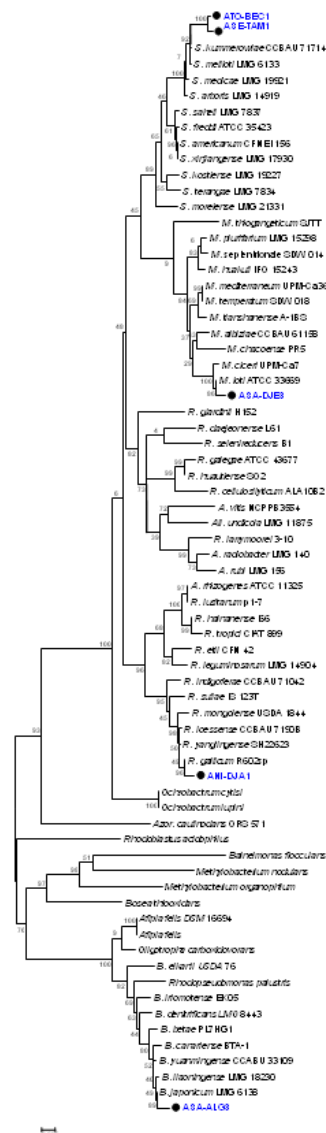


Figure 20 : Arbre phylogénétique.

- lignée des Rhizobium
- lignée des Bradyrhizobium
- lignée des Ochrobactrum
  - La souche ATO-BEC-1 et la souche ASE-TAM-1 sont portées par la même branche de sinorhizobium avec pour plus proche voisin de *Sinorhizobium méliiloti*, une espèce associée aux *Médicago*, *Trigonella* et *Melilotus* ainsi qu'à de nombreux acacias en Afrique.
  - La souche ASA-DJE-3 ligné des *Mesorhizobium* avec pour plus proche voisin de *Mesorhizobium loti*, une espèce communément associée aux légumineuses du genre lotus.
  - La souche ANI-DJA-1 est portée par la branche des Rhizobium et a pour proche voisin *Rhizobium gallicum*, une espèce surtout méditerranéenne associées généralement aux pois-chiche mais aussi à certains acacias.

- La souche ASA-ALG-2 est quant à elle localisée sur la branche phylogénétique des Bradyrhizobium avec *Bradyrhizobium japonicum* comme plus proche voisin.

A l'issus de la caractérisation du souchier, nous pouvant conclure que les différentes espèces d'acacias prises en considération sont nodulés par 4 genres de rhizobia différents.

- Les Bradyrhizobium qui semblent représentés par une seule espèce *Bradyrhizobium japonicum* qui nodule exclusivement les espèces introduites dans les pépinières du nord du pays.
- Les Sinorhizobium qui semblent être représentés par des souches de l'espèce *sinorhizobium meliloti*. Les sinorhizobium nodulent toutes les espèces d'acacias au niveau du sud du pays et préférentiellement les acacias indigènes au nord.

## **4 - Essai d'inoculation**

Les résultats enregistrés pour les plants d'acacias recueillis directement au niveau des différentes pépinières ont montré dans l'ensemble que la nodulation et la fixation d'azote étaient nettement plus réduites aux niveaux des pépinières du Sud du pays.

Cette infériorité des performances symbiotiques des plants recueillis au niveau des pépinières du Sud du pays résulterait vraisemblablement de:

- La pauvreté de la flore rhizobienne dans les sols du Sud qui serait à l'origine des faibles taux de nodulation enregistrés pour les espèces introduites et les espèces indigènes.
- L'absence ou la très faible représentation des Bradyrhizobia qui est le microsymbionte préféré des acacias australiens au niveau des pépinières du Sud.

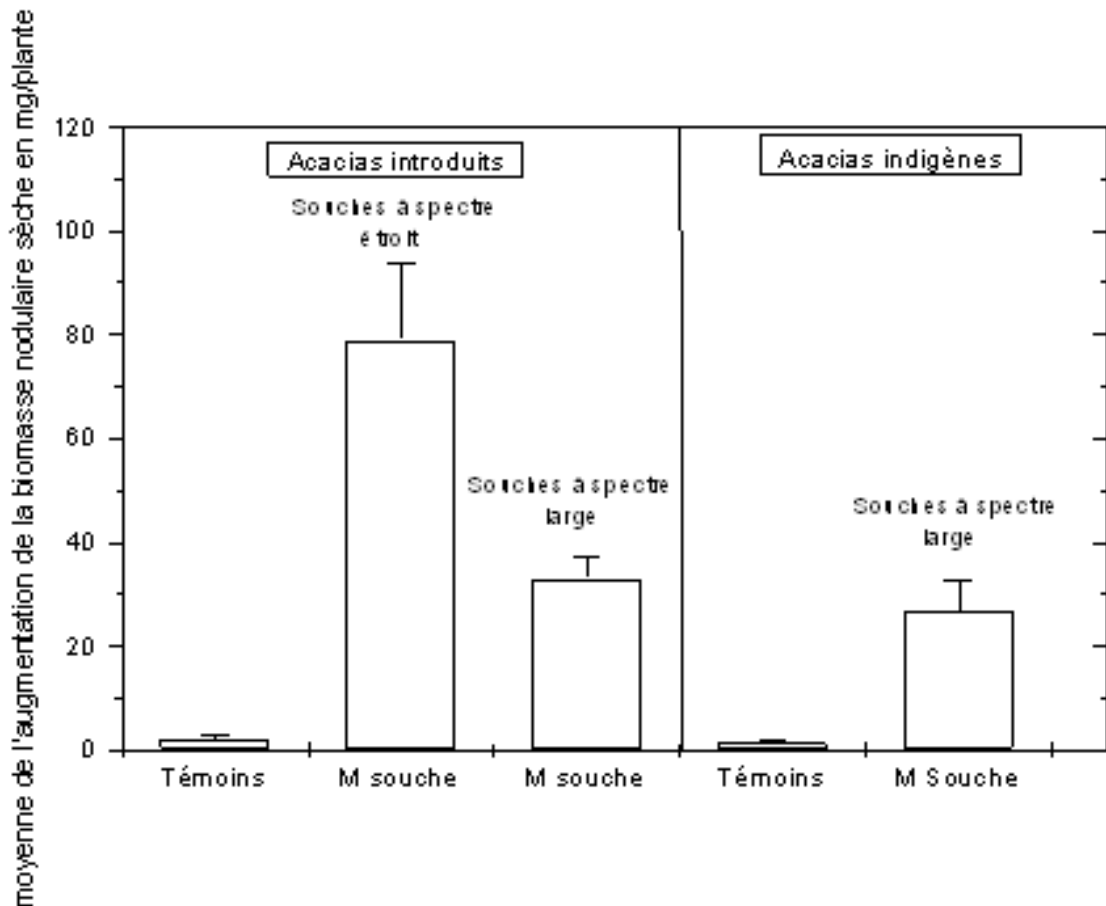
Ces résultats nous ont amenés à pratiquer l'inoculation afin de déterminer dans quelle mesure un apport consistant de cellules rhizobiennes compétentes sélectionnées pour leur potentiel élevé de fixation d'azote peut améliorer la nodulation et la fixation d'azote des plants d'acacia. Cette pratique utilisée dans de nombreux pays permettrait de s'assurer de produire au niveau des pépinières des plants bien nodulés et par conséquent capable de fixer de grandes quantité d'azote.

Dans ces conditions, ces plants une fois transférés sur les aires de plantations seraient à même d'exprimer pleinement leur potentiel de fixation d'azote participant à l'enrichissement du milieu en cet élément. Cependant la pratique de l'inoculation n'est intéressante que si l'espèce ciblé répond bien à l'apport de rhizobia par le biais de l'inoculant.

C'est pour cette raison que nous avons voulu vérifier si les six espèces d'acacias prises en considération répondent bien à l'inoculation et par conséquent, il serait intéressant de développer des inoculants destinés aux pépinières.

|                         |     | Témoins   | ASA-ALG-1   | ASA-ALG-2    | ATO-ALG-1  | REL-TRH-1  |
|-------------------------|-----|-----------|-------------|--------------|------------|------------|
| <i>A. saligna</i>       | BNS | 2,85±0,67 | 91,21±33,44 | 113,67±21,12 | 41,14±7,9  | 39,11±5,8  |
| <i>A. mellanoxylon</i>  | BNS | 1,07±0,58 | 69,71±9,54  | 74,46±11,21  | 28,57±3,66 | 31,17±4,08 |
| <i>A. longifolia</i>    | BNS | 2,31±0,61 | 78,26±11,13 | 59,18±7,08   | 26,18±4,18 | 44,13±3,53 |
| <i>A. ehrenbergiana</i> | BNS | 1,07±0,39 |             |              | 36,88±8,81 | 24,54±8,03 |
| <i>A. nilotica</i>      | BNS | 0,83±0,27 |             |              | 23,14±5,38 | 19,63±6,08 |
| <i>A. tortilis</i>      | BNS | 2,04±0,58 |             |              | 34,28±9,19 | 29,42±4,28 |

**Tableau 18:** Taux de nodulation (biomasse nodulaire sèche en mg/plante) des plants des différentes espèces d'acacia réinoculées avec leurs témoins correspondant.



**Figure 21 :** Biomasse nodulaire sèche en mg/plante des acacias introduits et indigènes réinoculées par des souches à spectre large et étroit ayant une performance symbiotique. Les barres représentent la moyenne d'augmentation de la biomasse nodulaire sèche surmontée de l'erreur standard.

La moyenne, toutes espèces et souches confondues obtenue pour les acacias indigènes et introduits sont consignées dans le volet correspondant.

Nous avons donc inoculé, au laboratoire, des plants des différentes espèces d'acacias avec des suspensions de 4 souches ayant montré, lors des essais d'inoculation croisée sur mélange sable/tourbe stérile, de bonnes performances symbiotiques vis-à-vis des différentes espèces d'acacias. Nous avons enregistré les meilleurs taux de nodulation et

## Caractérisation des rhizobia de quelques acacias d'Algérie en vue de la production d'inoculum pour la bactérisation des acacias en pépinières

de fixation d'azote pour les acacias introduits avec ASA-ALG1 et ASA-ALG2 et de moyens taux de nodulations avec les six espèces d'acacias étudiées.

Les souches retenues sont deux souches de Rhizobia à spectre large ATO-ALG1 et AAL-TAM1, et deux souches de Rhizobia à spectre étroit, à savoir ASA-ALG1 et ASA-ALG2.

Les essais d'inoculation ont été réalisés directement sur sol frais non stérilisé pour se rapprocher le plus possible des conditions naturelles c'est-à-dire des effets que peuvent induire les composantes du sol ou encore les synergies ou antagonismes entre les différents composants de la microflore.

Le sol retenu pour les essais d'inoculation est celui de la pépinière de Djelfa pour lequel ont été enregistrées les plus faibles performances symbiotiques chez les plants des différentes espèces d'acacias en raison vraisemblablement de sa pauvreté en rhizobia.

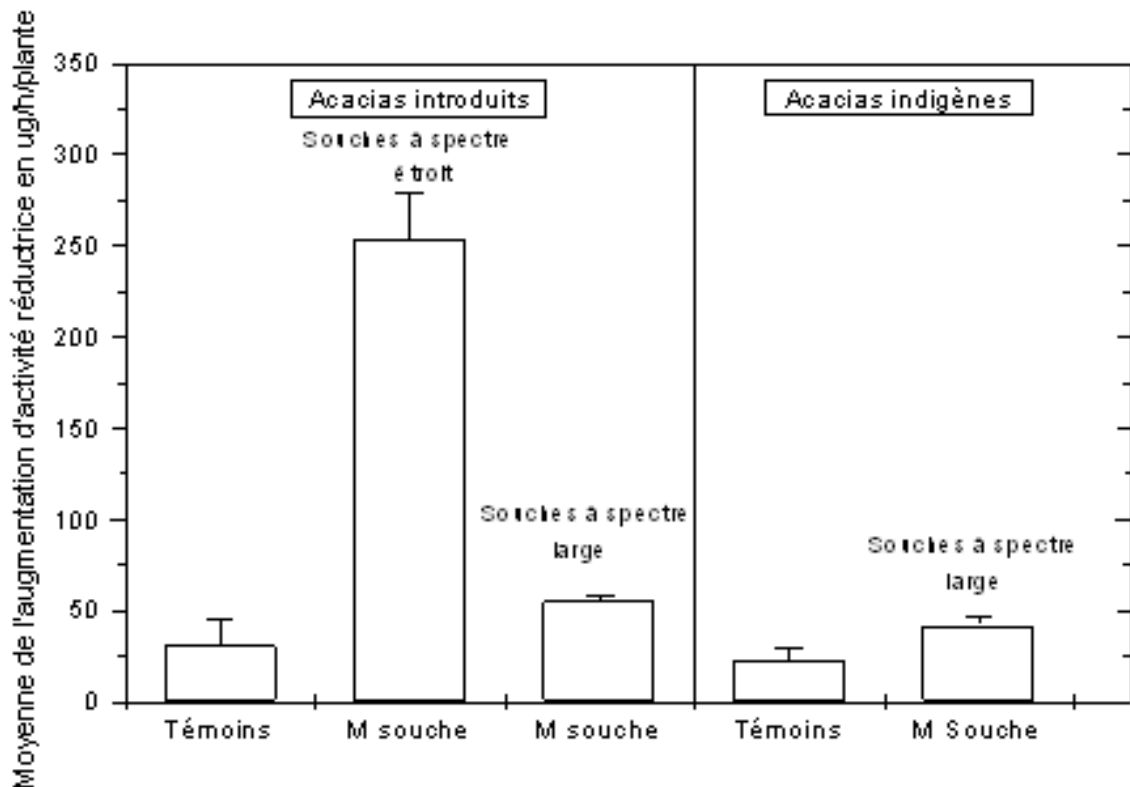
Les résultats des tests d'inoculation indiquent que l'apport de rhizobia se traduit toujours, lorsque la souche inoculée est compétente, par une augmentation considérable du taux de nodulation des plants des différentes espèces d'acacias (Tab.18). En effet Comparativement au témoin non inoculé la biomasse nodulaire sèche des plants des six espèces a été multipliée par un facteur variant entre 20 et 40.

Les plus fortes stimulations de la nodulation ( $113,67 \pm 21,12$  mg/plante et  $91,21 \pm 33,44$  mg/plante) ont été observées pour les plants d'*acacia saligna* avec les deux souches ASA-ALG-2 et ASA-ALG-1 respectivement et les plus faible stimulations sont enregistrés pour *Acacia nilotica* ( $23,14 \pm 5,38$  et  $19,63 \pm 6,08$ ) inoculée, avec les deux souches ATO-ALG-1 et AAL-TAM-1. (Tab.18).

|                         |     | Témoin      | ASA-ALG-1    | ASA-ALG-2    | ATO-ALG-1    | AAL-TAM-1   |
|-------------------------|-----|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| <i>A. saligna</i>       | ARA | 31,18±18,54 | 389,15±53,21 | 541,14±68,17 | 109,35±22,14 | 94,11±18,08 |
| <i>A. melanoxylon</i>   | ARA | 23,82±14,13 | 184,78±26,08 | 261,22±33,17 | 117,56±19,33 | 68,87±8,54  |
| <i>A. longifolia</i>    | ARA | 38,15±11,08 | 158,35±28,11 | 171,25±35,17 | 86,34±13,57  | 42,25±6,25  |
| <i>A. ehrenbergiana</i> | ARA | 16,25±6,84  | 0            | 0            | 87,25±11,25  | 64,12±8,62  |
| <i>A. nilotica</i>      | ARA | 0           | 0            | 0            | 13,25±6,12   | 18,06±7,03  |
| <i>A. tortilis</i>      | ARA | 29,17±5,48  | 0            | 0            | 95,19±10,43  | 66,18±9,03  |

**Tableau 19:** Niveau d'activité nitrogénasique (ARA) (pouvoir fixateur d'azote en  $\mu\text{M}/\text{h}/\text{plante}$ ) des plants des différentes espèces d'acacia réinoculées avec leurs témoins correspondant.





**Figure 22:** Niveau d'activité nitrogénasique (ARA) (pouvoir fixateur d'azote en  $\mu\text{M}/\text{h}/\text{plante}$ ) des acacias introduits et indigènes réinoculées par des souches à spectre large et étroit ayant une performance symbiotique. Les barres représentent la moyenne d'augmentation du pouvoir fixateur d'azote surmontée de sa erreur standard. La moyenne, toutes espèces et souches confondues obtenue pour les acacias indigènes et introduits sont consignées dans le volet correspondant.

Dans l'ensemble les meilleures réponses à l'inoculation ont été enregistrées avec *Acacia saligna*, exception faite de la souche AAL-TAM-1 qui a induit la stimulation la plus importante de la nodulation avec *Acacia longifolia* ( $44,13 \pm 3,53 \text{ mg/plante}$ )(Tab.18).

L'augmentation moyenne, souches à spectre large et étroit, acacias confondues indigènes et introduits, des taux de nodulations des plants s'est révélée nettement plus importante pour les plants des trois espèces introduites que pour ceux des trois espèces indigènes. (Fig.21). Cette supériorité s'observe nettement plus importante chez les acacias introduits avec les 2 souches (ASA-ALG-1 et ASA-ALG-2) à spectre étroit c'est-à-dire les préférées qu'avec les souches à spectre large.

Les résultats des tests d'inoculation réalisés indiquent que la nodulation des plants des 3 espèces introduites est mieux stimulée que celle des plants des 3 espèces d'acacias indigènes avec les souches à spectre étroit. Cette meilleure réponse à l'inoculation des plants des espèces introduites est vraisemblablement en relation avec leur promiscuité symbiotique.

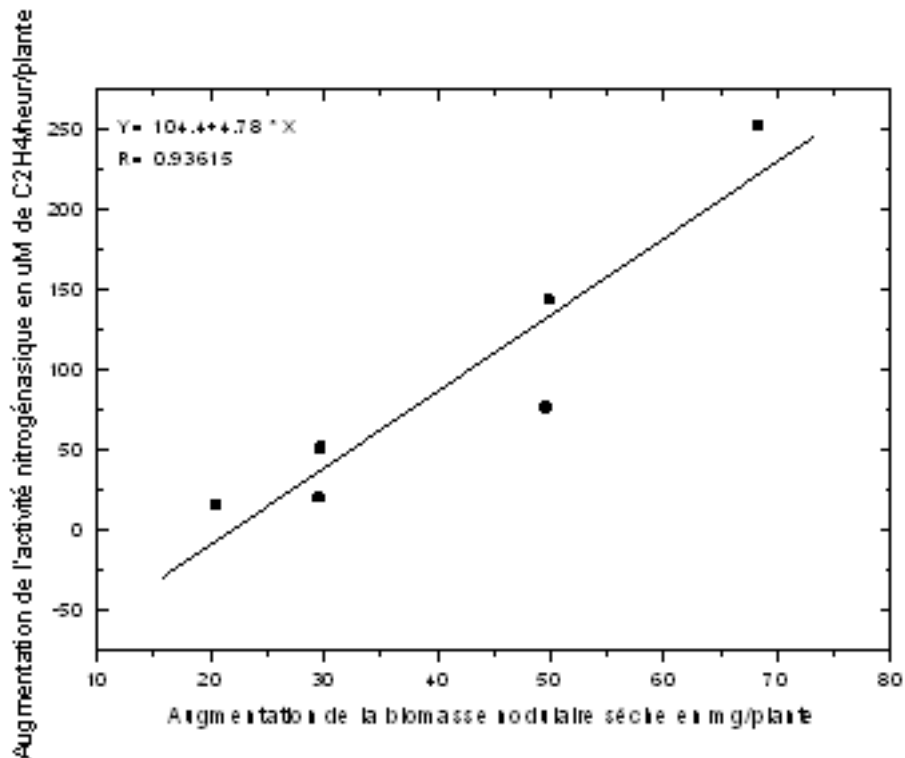
L'activité nitrogénasique des couples symbiotiques obtenus montre les mêmes variations que celles observées pour la nodulation.

Les meilleurs potentiels de fixation d'azote sont enregistrés pour *Acacia saligna* ( $541,14 \pm 68,17 \mu\text{M}/\text{heure/plante}$  et  $380,15 \pm 53,21$ ) avec les souches ASA-ALG-2 et ASA-ALG-1 respectivement pour les souches à spectre large souches, à l'exception faite pour

la souche ATO-ALG-1 qui a donné un potentiel de fixation d'azote important avec *Acacia melanoxylon* (Tab.19).

Comme pour la nodulation, l'augmentation moyenne, souches à spectre large et étroit, acacias confondues indigènes et introduites confondues, de l'ARA s'est révélée beaucoup plus importante chez les espèces introduites (Fig.22).

L'augmentation de l'activité nitrogénasique (ARA) sur la biomasse nodulaire sèche des plants d'acacias et de toutes souches confondues montre qu'ils sont bien fortement corrélés puisque l'indice de



**Figure.23 :** Régression linéaire de l'augmentation du niveau d'activité nitrogénasique (ARA) sur l'augmentation de la biomasse nodulaire des plants d'acacias. *R* représente le coefficient de corrélation entre les deux paramètres (chaque point représente la moyenne arithmétique des 4 souches confondues pour chaque espèce).

corrélation obtenu dans ces conditions est de  $R = 0,93615$ . Cette corrélation reconferme que l'ARA des couples symbiotiques dépend essentiellement de leur taux de nodulation quelle que soit l'espèce considéré (Fig.23).

Les résultats des tests d'inoculation réalisée, au laboratoire, sur des échantillons de sol provenant de la pépinière de Djelfa indiquent que les 6 espèces d'acacias montrent une bonne réponse à l'inoculation. L'apport de rhizobia compétents exogène se traduit chez les plants de ces espèces par une augmentation consistante et parfois considérable du taux de nodulation des plants et par voie de conséquence de leur potentiel fixateur d'azote.

La stimulation de l'ARA s'est révélée beaucoup plus importante chez les 3 espèces introduites.

Cependant, les 3 espèces introduites ont montré par rapport aux trois espèces indigènes une nette supériorité dans leur réponse à l'inoculation que ce soit avec les souches à ASA-ALG-2 ou les souches ASA-ALG-1, ATO-ALG-1 et AAL-TAM-1. Ce résultat

laisse suggérer que le potentiel symbiotique des acacias introduits est nettement supérieur à celui des 3 espèces indigènes prises en considération. Cette supériorité résultera:

- D'une spécificité moindre vis-à-vis des rhizobia, ce qui implique une plus grande facilité de l'infection.
- La croissance rapide des plants arrive à fournir beaucoup plus de photosynthétats dès les premiers stades de développement et donc peut supporter une charge nodulaire plus conséquente.

## Conclusion générale

Cette étude réalisée au niveau de douze pépinières sur la symbiose à rhizobia chez six espèces d'acacias parmi lesquelles trois espèces introduites (*A. saligna*, *A. melanoxylon* et *A. longifolia*) et trois espèces autochtones (*A. ehrenbergiana*, *A. nilotica* subsp. *adstringens* et *A. tortilis* subsp. *raddiana*) nous a permis de vérifier que celles-ci sont toujours nodulées et fixatrices d'azote. Les sols utilisés pour leur production renferment par conséquent des souches compétentes envers ces différentes espèces d'acacias

Les performances symbiotiques (biomasse nodulaire sèche et l'activité réductrice d'acétylène) des plants examinés indiquent que les sols des pépinières du Nord renfermeraient une microflore rhizobienne compétentes plus abondante et/ou plus diversifiée que celle des pépinières du sud et qu'elles bénéficieraient en plus de conditions édaphiques plus propices à la nodulation des six espèces d'acacias étudiées.

Par ailleurs, nos résultats indiquent qu'a biomasse nodulaire sèche et l'activité réductrice d'acétylène enregistrée chez les acacias introduits se sont révélés nettement supérieurs à ceux enregistrés pour les indigènes. Cette différence a été rapprochée de la promiscuité symbiotique des acacias introduits c'est-à-dire de leur capacité de contracter la symbiose avec un plus large panel de rhizobia, propriété qui leur permet de s'associer plus fréquemment avec des souches de rhizobia compétentes.

La caractérisation phénotypique des souches de Rhizobia associées aux six espèces d'acacia indique que celles-ci sont nodulés par des Rhizobia qui sont vraisemblablement différents.

Les espèces d'acacia autochtones sont nodulées, que ce soit au Nord ou au Sud du pays, par des Rhizobia à croissance rapide présentant un spectre d'hôte large que les profils de restriction du gène de leur ARN16s nous as permis de rapprocher des genres Rhizobium, Sinorhizobium et Mesorhizobium.

En ce qui concerne les acacias introduits, nos résultats indiquent qu'ils sont nodulés par des Rhizobia à croissance lente que leurs profils PCR-RFLP rapprochent du genre Bradyrhizobium au niveau des pépinières du Nord du pays et par des Rhizobia à croissance rapide appartenant aux genres.

Le séquençage du gène de l'ARN 16s d'un représentant de chacun des groupes de Rhizobia associés aux acacia nous as permis de confirmer que les souches associées appartiennent aux quatre espèces suivantes : *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium gallicum*, *Mesorhizobium loti* et *Bradyrhizobium japonicum*.

Les différences importantes observées entre les performances symbiotiques des plants provenant des pépinières du Sud et du Nord du pays indiquent qu'il serait intéressant de procéder à l'inoculation des plants d'acacias au niveau des pépinières en particulier celles du sud indique qu'il serait intéressant de recourir à l'inoculation, au niveau de ces pépinières, des graines ou des plantules de l'espèce par des souches de Rhizobia performantes pour produire des plants mieux nodulés et plus efficaces.

Pour ce faire, nous comptons étendre nos travaux à un plus grand nombre d'espèces d'acacias et de pépinières pour constituer une collection de souches compétentes parmi

lesquelles nous procéderons à la sélection de souches performantes pour la production et l'évaluation d'inoculants destinés aux pépinières.

## Références bibliographiques

- Aguilard M.M., Ashby A.M., Richards A.J.M., Loake G.J., Watson M.D. et Shaw C.H. 1988 - Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *J.Gen.Micobiol.*134: 2741-2746.
- Allen O.N and Allen E.K. 1981 - *The Leguminosae. A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation*, Univ. of Wisconsin Press.
- Antoun H and Prévost D. 2006 – Ecology of plant growth promoting rhizobacteria, In:PGPR:Biocontrol and Biofertilization.Siddiqui,Z A (ed).Springer,pp.1-38.
- Amarger N.V. Macheret, and G. Laguerre. 1997 - *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 996-1006.
- Amrani S. 1988 - Etude de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses chez la Luzerne (*Medicago sativa* L.) et le Bersim (*Trifolium alexandrinum* Juslen). Thèse de Magister. ISN-USTHB. 80 pages.
- Bala A., Murphy P. et Giller K.E. 2003 - Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. *Mol. Ecol.*, 12, 917–929.
- Barbour W.M., Hattermann D.R. and Stacey G. 1991 - Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environ. Microbiol.*57:2635 – 2639.
- Barnet Y.M., Catt P.C., Hearne D.H. 1985 - Biological nitrogen fixation and root-nodule bacteria (*Rhizobium* sp. and *Bradyrhizobium* sp.) in two rehabilitating sand dune areas planted with *Acacia* spp. *Aust J Bot* 33: 595–610.
- Barnet Y.M. and Catt P.C. 1991 - Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Acacia* spp. *Plant and Soil.* 135:109–120.
- Beauchamp C.J. 1993 - Mode d'action des Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agents de lutte biologique. *Phytoprot. Rev.* 74:19-27.
- Beijerinck M.W. 1888 - Cultur des bacillus radicola aus denKnollchen.*Bot.Ztg.*46,740-750.
- Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A. and Squartini A. 2004 - Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *hedysarum*. *Syst.Appl.Microbiol.*27:462-468.
- Bergum A.A., Leibovitch S., Migner P. et Zhang F. 2001 – Specific flavonoïds induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*pisum sativum* L.) and Lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments.*J.Exp.Bot.*Jul.52:1537-1543.
- Brockwell J., S.D. Searle A.C. Jeavons and M. Waayers. 2005 - *Nitrogen fixation in acacias: An untapped resource for sustainable plantations, farm forestry and land reclamation (ACIAR Monograph No. 115)*. ACIAR, Canberra, 132 p.

- Broughton W.J. and Perret X. 1999 - Genealogy of legume-Rhizobium symbioses." *Current Opinion in Plant Biology*. 2(4): 305-311.
- Caetano-Anollés G., Wrobel-Boerner E and Bauer W.D. 1992 - Growth and movement of spot inoculated *Rhizobium meliloti* on the root surface of alfalfa. *Plant Physiology*. 98: 1181-1189.
- Casida 1982 - is the combination "Sinorhizobium adhaerens"(Casida 1982) Willens and al. 2003 - Legitimate? Request for an opinion. *Int. J. Evol-Microbiol*. 53:2101-2110.
- Celles J.C et Maniere R. 1980 - Remarque sur la distribution en Afrique nord occidentale d'Acacia seyal Delile et d'Acacia ehrenbergiana Hayane. *Candollea*. 35 :183-200 ;Genève.
- Chappill J.A., and Maslin B.R. 1995 - A phylogenetic assessment of tribe Acacieae. In: *Advances in Legume Systematics 7, Phylogeny*. Crisp, M. and Doyle, J.J., eds. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp. 77-99.
- Chen W.X., Yan G.H., Li J.L. 1988 - Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 28:392-397.
- Chen W.M.S., Laevens T.M., Lee T., Coenye P., De Vos M., Mergeay and Vandamme P. 2001 - *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 51:1729-1735.
- Chevallier A. 1934 - Nouvelles observations sur quelques Acacias de l'Afrique occidentale. *Rev. Bot. Appl.* 14 :875-884.
- Corby H.D.L. 1981 - The systematic value of leguminous root nodules. In *Advances in Legume Systematics, Part 2*, Polhil. R.M and Raven, P.H. (Eds.), pp. 657-669.
- Corby H D L. 1988 - Types of rhizobial nodules and their distribution among the *Leguminosae*. *Kirkia* 13 : 53-123.
- Corzo J., Santamaria M., Gultierrez A.M. 1997 - Transient Energy Coupling Between Rhizobia and Legume Cells Mediated by the Peribacteroide Membrane ATPase Proton Pump. *Biosc. Repo.* 17(4). pp 390-400.
- Dakora F.D. 2000 - Commonality of root nodulation signals and nitrogen assimilation in tropical grain legumes belonging to the tribe Phaseoleae. *Aust. J. Plant Physiol.* 27 :885-892.
- De Faria S.M., G.P. Lewis, Sprent J.I and J.M. Sutherland. 1989 - Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytol.*, 111, 607-619.
- De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.D., Dreyfus B., Kersters K et Gillis M. 1994 - Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:715-733.
- De lajudie, P., Willems A., Nick G., Moreira F., Molouba F., Host B., Torck U., Neyra M., Collons M.T., Lindsrom K., Dreyfus B. and Gillis M. 1998a - Characterization

- of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp.nov. *Int.J.Sys.bacteriol.*48 :369-382.
- De Lajudie P., Willems A., Nick G., Moreire F., Molouba F., Hoste B., Torcj U., Neyra M., Collins M D., Lindstrom K., Dreyfus B and Gillis M. 1998b- Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp.nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.*48,369-382.
- Dommergues Y., Duhoux E et Diem H.G. 1999 - *Les arbres fixateurs d'azote. Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec référence particulière aux zones subhumides et arides.* 499 pp. France: CIRAD, Editions Espaces, FAO, IRD, Montpellier, France.
- Dovel R.L., Vietor D.M. and Weaver R.W. 1993 – Effects of media N content and rhizobial strain on N<sub>2</sub> fixation and partitioning in *Leucaena* seedling. *J. Range Manag.*46:512-515.
- Downie J.A. 2005 - Legume Haemoglobins: Symbiotic Nitrogen Fixation Needs Bloody Nodules. *Current Biology*, 15, 196-198.
- Dreyfus B.L., and Y.R. Dommergues 1981 - Nodulation of Acacia species by fast- and slow-growing tropical strains of Rhizobium. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:97-99.
- Dreyfus B Garcia J.L and Gillis M. 1988 - Characterization of Azorhizobium caulinodans gen.nov.,sp.nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int.J.Syst.Bacteriol.*38,89-98.
- Drevon J.J., Deransari C., Irekti H., Payre H., Roy G. et Serraj R. 1995 - La salinité (NaCl) abaisse la conductance des nodosités de légumineuses à la diffusion de l'oxygène. In J.J.Drevon (ed), *Facteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le bassin Méditerranéen*, INRA Paris, Les Colloques n°77 :73-84.
- Dupuy N., Dreyfus B L. 1992 – Bradyrhizobium populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. *Appl. Environ, Microbiol.* 58:2415-2419.
- Eady R.R. 1986 – Enzymology in free-living diazotrophs. Dans *Nitrogen fixation (Molecular Biology)*. Broughton W.J. and Pühl A. (Eds.), Clarendon press, Oxford. pp. 1-49.
- Lakany M.H. 1987 - Use of Australian acacias in North Africa. In *Australian Acacias in Developing Countries. Proceedings of an international workshop held at Gympie, Australia, (ACIAR Proceedings No.16)*, ed. Turnbull, J.W., pp. 118-125.
- Elmerich C. 1997 - Nitrogénase: aspect biochimiques, moléculaires et génétiques. Dans *Assimilation de l'azote chez les plantes*. Morot-Gaudry J.F. Ed, I.N.R.A., Paris, pp 163-177.
- Farrand S.K., Van Berkum P.B and P Oger. 2003 - *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1681-1687.
- Fisher H.M. 1994 - Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. *Microbiol. Rev.*56: 352-386.
- Fox, J.E.D. 1995 - A review of the ecological characteristics of *Acacia saligna* (Labill.) H. Wendl. *Mulga Research Centre Journal* 12, 39-55
- Frank B. 1889 - Ueber die pilisymbiose der leguminosen, *Ber.Dent.Bot.Ges.* 7:332-346.



- Frank B. 1989 - Über die Pariseten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen *Botanische Zeitung*. 37:377–388, 393–400.
- Fred E B., Baldwin I.L and McCoy E. 1932-Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin studies in science, number 5. University of Wisconsin Press, Madison.
- Fred E B., Baldwin I L and McCoy E. 1932 - Root nodule Bacterie and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison.
- Frioni L., Malat S.D., Irigoyen I and Dodera. 1988 - Promiscuity for nodulation and effectivity in the N<sub>2</sub>-fixing legume tree *Acacia caven* in Uruguay. *Applied Soil Ecology*. 7:239-244.
- Fenton M., Jarvis B.D.W. 1994 - Expression of the symbiotic plasmid from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in *Sphingobacterium multivorum* *Canadian journal of microbiology*. 40(10). pp. 873-879.
- Galiana A., Chaumont J., Diem H.G and Dommergues Y.R. 1990 - Nitrogen-fixing potential of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* spp. *Biology and Fertility of Soils* 9: 261–267.
- Galiana A., N'Guessan-Kanga A., Gnahoua G.M., Balle P., Dupuy B., Domenach A.M. and Mallet B. 1996 - Nitrogen fixation in *Acacia mangium* plantations. *Bois et Forêts des Tropiques*, No. 250, 51–62.
- Ganry F and Y.R. Dommergues. 1995 - Arbres fixateurs d'azote : champ ouvert pour la recherche. *Agriculture et développement*, 7, 38-55.
- Geurts R et Franssen H. 1996 - Les légumineuses Alimentaires en Algérie : Situation actuelle et perspectives. ITGC Alger, 125p.
- Graham P.H. 2007 - *Ecology of the root-nodule bacteria of legumes*. In *Leguminous nitrogen-fixing symbioses*. M.J. Dilworth et al. (eds.), Springer, Dordrecht. 7:23-58.
- Grimes J.W. 1999 - Inflorescence morphology, heterochrony, and phylogeny in the Mimosoid tribes Ingeae and Acacieae (Leguminosae: Mimosoideae). *Bot. Rev.* 65, 317–347.
- Gu J., Wang E.T and Chen W.X. 2007 - Genetic diversity of rhizobia associated with *Desmodium* species grown in China. *Lett. Appl. Microbiol.* 44 :286–292.
- Gualtieri G. and Bisseling T. 2000 – The evolution of nodulation. *Plant Molecular Biology*. 42:181-194.
- Hacker J.P., McKendry I.G and Stull R.B 2001 - Modeled downward transport of Asian dust over Western North America during April 1998 - *J. Appl. Meteorol.* 40:1617–1628.
- Halliday J, Somasegaran P. 1983 - Nodulation, nitrogen fixation, and *Rhizobium* strain affinities in the genus *Leucaena*. In: *Leucaena research in the Asian Pacific region: proceedings of a workshop held in Singapore, 23–26 November, 1982*, International Development Research Center, Ottawa, pp 27–32
- Handley B.A., Hedges A.J. and J.E. Beringer. 1998 - Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 30, 241-249.

- Hardy R W F., Holsten R D., Jackson E K., Burns R C. 1968 – The acetylene ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation .PL. *Physiol*, 43:1185-1207.
- Hartwig U.A., Joseph C.M and Phillips D.A. 1991 - Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Pl Physiol* , 95 :797–803.
- Hatimi A., Bani-Aameur F and Oihabi A. 2001 - Caractérisation de souches de Rhizobiums autochtones des dunes : effet sur la croissance et la nutrition azotée d'*Acacia cyanophylla* Lindl. *Acta Bot. Gall.*148:191-199.
- Hirsch A.M., Lum, M.R., and Downie J.A. 2001 - What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* 127:1-9.
- Hirsch A M.1992 - Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122 :211-237.
- Holmes P.M. and Cowling R.M. 1997 - The effects of invasion by *Acacia saligna* on the guild structure and regeneration capabilities of South African fynbos shrublands. *Journal of Applied Ecology* 34: 317-332.
- ILDIS 2008 - International Legume Database and Information Service. <<http://www.ildis.org>>.
- Islam M.S., Kawasaki H., Muramatsu Y., Nakagawa Y and T Seki. 2008 - "Bradyrhizobium iriomotense sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:1416-1429.
- 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 - Family III Rhizobiaceae. Dans "Bergey's manual of systematic bacteriology" 9eme edition, vol.1A, krieg N.R. et Holt J.C.(Eds.).williams et Wilkins, Baltimore.pp:234-244.
- Jordan D.C. 1984 - Family III.Rhizobiaceae Conn 1938,in: Krieg N.R.,Holt J.C., (Eds.), *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* 321AL.Vol.1, The Williams and Wilkins Co., Baltimore,pp:234-236.
- Kaci Y. 1988 – Etude des bactéries fixatrices d'azote de la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* var *Waha* ).Thèse de Magister. ISN-USTHB.140p.
- Kape R., Parniske M. and Werner D. 1991 - Chemotaxis and nod gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids.*Appl. Environ. Microbiol.*57:316-319.
- Kim N.W, Piatyszek M.A, Prowse K.R, Harley C.B, West M.D, Ho P.L.C, Coviello G.M, Wright W.E, Weinrich S.L and Shay J.W. 1994 - Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (Wash DC)*. 266: 2011-2015.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120
- Koreish E.A., El-Halfawi M.H and Abd-El-Ghaffar S. 1997 - Nodulation and dinitrogen fixation by *Acacia saligna* seedlings as influenced by soil type and salinity. *Egypt. J. of Soil Sci.*37:437-450.

- Kouas S., Labidi N., Debez A and Chedly A. 2005 - Agron. Sustain. Dev. 25:389-393.
- Lafay B and Burdon J.J. 2001 - Small-subunit ribosomal RNA genotyping of rhizobia nodulating Australian *Acacia* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*67:396-402.
- Laguerre G., Allard M R., Revoy F and Amarger N. 1994 - Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified 16S rDNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(1):56-63.
- Lajudie F., Zakhia F. 2006 - La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques - application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL) *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa:Mar. 52(3):169-181(13 pp.)
- Leary J.K., Singleton P.W., Scowcroft P.G and D. Borthakur. 2006 - Symbiotic diversity in the cosmopolitan genus *Acacia*. *Symbiosis* 41:107-117.
- Lewis G ., Schrire B ., Mackinder B and Lack M. 2005 - legumes of the world. (Editor). Royal Botanical Gardens, Kew, Richmond, Surrey, U.K.
- Liu J., Wang E.T and Chen W.X. 2005 - Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. *Systematic and Applied Microbiology.* 28:465-477.
- Maire R. 1987 - *Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara)*, Volume XVI: *Dicotyledonae*. Lechevalier, Paris, 302 p.
- Mantanez A. 2000 – Overview and Case studies on Biological Nitrogen Fixation: Perspectives and Limitations. In FAO Report 2000. FAO, pp 1-11.
- Mansour S.R., Zayed A.M., Safwat M.S. 2003 - Nitrogen fixing efficiency of *Acacia saligna* trees inoculated with two *Bradyrhizobium* strains under field conditions. *International Journal of Forest Usufructs Management.* 4:22-27.
- Marbberley D.J. 1998 - The plant book, 2ème edition. Cambridge University Press, Cambridge, 612.
- Martinez-Romero E., Hernandez-Lucas I., Segovia L., et Pueppke S.G. 1995 – Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2775-2779.
- Maslin B R and Stirton C H. 1997 - Generic and infra generic classification in acacia (leguminosae :Mimosoideae) :a list of critical species on which to build a comparative data set.*Bulletin of the international group for study of Mimosoideae.* 20:22-44.
- Maslin B.R., Miller J.T and Seigler D.S. 2003 - Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Australian Systematic Botany* 16: 1–18.
- Mhamdi R., Mrabet M., Laguerre G, Tiwari R, Aouani M.E. 2005 - Colonisation of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium*-like strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 51: 105-111.
- Miller J.T. and Bayer R.J. 2000 - Molecular systematics of the Tribe Acacieae (Leguminosae: Mimosoideae). 1995. In: *Advances in Legume Systematics 9, Phylogeny*. Herendeen, P. and Burneau, A., eds. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp. 180–200.

- Miller J.T and Bayer R.J. 2001 - Molecular phylogenetics of *Acacia* (Fabaceae: Mimosoideae) based on the chloroplast *MATK* coding sequence and flanking *TRNK* intron spacer region. *American Journal of Botany* 88: 697–705.
- Miller J.T and Bayer R.J. 2003 - Molecular phylogenetics of *Acacia* subgenera *Acacia* and *Aculeiferum* (Fabaceae: Mimosoideae), based on the chloroplast *matK* coding sequence and flanking *trnK* intron spacer regions. *Australian Systematic Botany* 16: 27–33.
- Moulin L., Munive A., Dreyfus B and C Boivin-Masson. 2001 -.Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411:948-950.
- Mrabet M, Mnasri B, Ben Romdhane, Laguerre G, Aouani M.E, Mhamdi R. 2006 - *Agrobacterium* strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by *Rhizobium gallicum*. *FEMS Microbiology and Ecology*. Vol. 56, Issue2: 304-309.
- Newton W.E. 1993 – Nitrogenase: Distribution, composition, structure and function. Dans “New horizons in nitrogen fixation”. Palacios R., Mora J., Newton W.E. (Eds.). Kluwer Acad. Publish., Dordrecht, pp. 5-18.
- Ngom A., Nakagawa Y., Sawada H., Tsukahara J., Wakabayashi S., Uchiumi T., Nuntagif A., Kotepong S., Suzuki A, Higashi S and Abe M. - 2004. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the ochrobacterium clade isolated from root nodules of *acacia mangium*. *J.Gen.Appl.Microbiol.* 50(1):17-27.
- Nick G., de lajeudi P., Eardly B.D., Suomalainen S., Paulin L., Zhang X., Gillis M and Lindstrom K. 1999 - *Sinorhizobium arboris* sp.nov.and *Mesorhizobium kostiense* sp.nov.,isolated from leguminous trees in sudan and Kenya.*Int.J.Syst.Bacteriol.*49,1359-1368.
- Norris R.E. 1961 - Observations on phytoplankton organisms collected on the N.Z.O.I. Pacific cruise, September 1958. *New Zealand J. Sci,* 4. 88:162-1.
- Nour, S. M.; Fernadez, M. P.; Normand, P.; Cleyetmarel, J. C. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*cicer arietinum* L.). *International J. Syst. Bacteriol.* 44:511-522, 1994.
- Odee D W., Njoroge J., Machua J and Dart P. 1998 – Selective preference for nodulation and symbiotic nitrogen fixing potential of indigenous rhizobia with African and Australian acacias. In: Elmerich C; konderosi A and Newton W E.,Ed,Biological nitrogen fixation for the 21st century. Proceedings for the 11th international congress on nitrogen fixation. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 376-674.
- Oldryod G.E., Engstrom E.M and Long S.R. 2001 – Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant cell.* 13:1835-1849.
- Olivarares J., Herrera M.A., Bedmar E.J. 1988 - Woody legumes in arid and semi-arid zones In : beck DP, Mateon la (éds) Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture pp 65-72.Pordrecht.Maktinus Nijholl.
- Orchard A E and Wilson A J G. 2001a - Flora of Australia Volume 11A, Mimosaceae, *Acacia*, part 1.Melbourne, CSIRO.

- 2001b - Flora of Australia Volume 11B, Mimosaceae, Acacia, part 2. Melbourne, CSIRO.
- Orchaard A E and Maslin B R. 2003 - proposal to conserve the name *Acacia* (Leguminosae:mimosoideae) with a conserved type. *Taxon*. 52:362-363.
- Ott T., van Dongen J.T., Gunther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P. & Udvardi, M.K. - 2005 Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.*15, 531-535.
- Parniske M. 2000 - Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3: 320-328.
- Ozenda P. 1954- La flore et végétation du Sahara.
- Perret X., Staehelin C. and Broughton W.J. 2000 – Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and molecular biology review*.pp 180-201.
- Pesenko Y.I. 1982 - Principles and methods of quantitative analysis in faunistic investigations. Nauka, Moscow (en Russ). 287p.
- Phillips D.A and Tsai S.M. 1992 - Flavanoids as plant signals to rhizosphere microbes. In HA Stafford, RK Ibrahim, eds, *Phenolic Metabolism in Plants*. Plenum Press, New York, pp 201-231.
- Phillips D.A. 2000 - Biosynthesis and release of rhizobial nodulation gene inducers by legumes. In *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process* (Triplett E.W., ed.), pp.349–364,
- Poole P.S., Hynes M.F., Johnston A.W.B., Tiwari R.P., Reeve W.G and J.A. Downie. 2007 - *Physiology of root-Nodule Bacteria*. In *Leguminous nitrogen-fixing symbioses*. M.J. Dilworth *et al.* (eds.), Springer, Dordrecht. 7:241-292.
- Postgate J.R. 1982 - The fundamentals of nitrogen fixation Cambridge University Press, Cambridge, 252 p.
- Prévost D. and Antoun H. 2007 - Root Nodule Bacteria and Symbiotic Nitrogen Fixation., dans Gregorich E.G and Carter M.R. (dir.) - *Soil Sampling and Methods of Analysis*, 2nd Edition., CRC Press Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA, Chapitre 31.
- Quatrini P., Scaglione G., Cardinale M., Caradonna F., Puglia A.M. 2002 - *Bradyrhizobium* sp. nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.). *Journal of Applied Microbiology* 92 (1)
- Quezel P. et Santa L. 1962 - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS. 565p.
- Räsänen Leena. 2002 - Biotic and Abiotic Factors Influencing the Development of N<sub>2</sub>-Fixing Symbioses between Rhizobia and the Woody Legumes *Acacia* and *Prosopis*. *Dissertationes Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis* 27.
- Räsänen L.A. and Lindström K. 2003 - Effects of biotic and abiotic constraints on the symbiosis between rhizobia and the tropical leguminous trees *Acacia* and *Prosopis*. *Indian Journal of Experimental Biology*. 41:1142-1159.

- Reddell P. 1993 - Soil constraints to the growth of nitrogen-fixing trees in tropical environments. /ri Symbioses in nitrogen-fixing trees, SUBBA RAO N.S., RODRIGUEZ C., BARRUECO C. (Eds), p. 65-83. Oxford and IBH Publishing Co, New Delhi, India.
- Revellin C., Pinochet X., Beauclair P., Catroux G. 1996 – Influence of soil properties and soya bean cropping history on the Bradyrhizobium japonicum population in some French soils, European journal of soil. 47,pp 505-510.
- Ridge W.R. 1992 – A model of legume root hair growth and Rhizobium infection. Symbiosis 14:359-373.
- Rivas R., Velázquez E., Willems A., Vizcaíno N., Subba-Rao N.S., Mateos P.F., Gillis M., Dazzo F.B and E Martínez-Molina. 2002 - A New Species of Devosia That Forms a Unique Nitrogen-Fixing Root-Nodule Symbiosis with the Aquatic Legume Neptunia natans (L.f.) Druce. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5217–5222.
- Rivas R., Willems A., Palomo J.L., Garcia-Benavides P., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Gillis M and E Velazquez. 2004 - *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1271-1275.
- Robinson J and S.A Harris. 2000 - A plastid DNA phylogeny of the genus *Acacia* Miller (Acacieae, Leguminosae).Bot. J. Linn. Soc. 132, 195-222.
- Rodriguez-Navarro D.N., Buendia A.M., Camacho M., Lucas M.M. and C. Santamaría. 2000 - Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South-West Spain. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 1601-1613.
- Roughley R.J. 1987 - Acacias and their root-nodule bacteria. In Australian Acacias in Developing Countries (ACIAR Proceedings No.16). J.W. Turnbull (ed.), ACIAR, Canberra, 45-49.
- Sahki A., Bouchneb N., Sahki R. 2004 - Guide des principaux arbres et arbustes du sahara central (Ahaggar et Tassili).edi,INRF.141P.
- Sarr A., Lesueur D. 2007 - Influence of soil fertility on the rhizobial competitiveness for nodulation of *Acacia* Senegal and *Acacia nilotica* provenances in nursery and field conditions. *Microbiology and Biotechnology*, 23(5).
- Serraj R, Fleurat-Lessard P, Jaillard B, Drevon JJ. 1995 - Structural changes in the inner-cortex cells of soybean root nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxygen concentrations. *Plant Cell Environ* 18 :455–462.
- Siqueira O.J., Nair G.M., Hammerschmidt R and Safir R.G. 1991 – Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. *Critical Reviews in plant sciences* 10 (1): 63-121.
- Slattery J.F., Coventry D.R., Slattery W.J. 2001 - Rhizobial ecology as affected by the soil environment *Australian journal of experimental agriculture* .41 : pp. 289–298.
- Sneath P.H.A. 1974 - The history and future potential of numerical concepts in systematics: the contributions of H.G. Gyllenberg. *Binary - Computing in Microbiology* 7: 32-36.
- Somasegaran P and Hobben H.J. 1994 – Handbook for Rhizobia. Springer verlag, Berlin. pp 324.

- Sprent J I and Parsons R. 2000 – Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. *Field Crops Res.*65:183-196.
- Sprent J.I.2001-Nodulation in legumes .Dickerson (Eds).Royal botanical garden, kew, united kingdom.364p.
- Streit W.R., Joseph C.M. and Phillips D.A. 1996 – Biotin and other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. *Mol. Plant. Micr. Int.* 9:330-338.
- Stewart W.D.P., Fitzgerald G.P. and Burris R.H. 1967 - In situ studies on N<sub>2</sub> fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 58: 2071-2078.
- Sutherland J.M., D.W. Odee, G.M. Muluvi, S.G. McInroy and A. Patel, 2000.- Single and multi-strain rhizobial inoculation of African acacias in nursery conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 32: 323-333.
- Sun J.S., Simpson R.J and Sands R. 1992a - Nitrogenase activity and associated carbon budgets in seedlings of *Acacia mangium* measured with a flow-through system of the acetylene reduction assay. *Australian Journal of Plant Physiology.* 19: 97–107.
- 1992b - Nitrogenase activity of two genotypes of *Acacia mangium* as affected by phosphorus nutrition. *Plant and Soil.* 144: 51–58.
- 1992c - Genotypic variation in growth and nodulation by seedlings of *Acacia* species. *Forest Ecology and Management.* 55: 209–223.
- Susana R.E., João A C and Helena F. 2007 - Genetic Diversity of Rhizobia Associated with *Acacia longifolia* in Two Stages of Invasion of Coastal Sand Dunes *Appl Environ Microbiol.* August; 73(15): 5066–5070.
- 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.
- Thrall P.H., Slattery J.F., Broadhurst L.M and Bickford S. 2007 - Geographic patterns of symbiont abundance and adaptation in native Australian *Acacia*-rhizobia interactions. *J. Ecol.*95:1110-1122.
- Tiedeman J.A and D.E. Johnson 1992 - *Acacia cyanophylla* for forage and fuelwood in North Africa. *Agroforestry Systems* 17(2): 169-180.
- Tiedeman J.A and D.E. Johnson. 2004 - *Acacia cyanophylla* for forage and fuelwood in North Africa. *Agroforestry Systems.* 17: 169-180.
- Toro M; Azcon K; Herrera R. 1996 – Effects on yield and nutrition of mycorrhizal and nodulated *pueraria phaseoloides* exerted by P-Solubilizing rhizobacteria biology and fertility of soils. 21(1-2):23-29.
- Trinick M.J. 1980 - Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bact.* 49: 39-53.
- Triplett E.C. and Sadowski M.J. 1992 - Genetics of competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 46:399-428.

- Truchet G., Prome J.C. et Denarié J. 1993 – Symbioses bactéries - légumineuses :Un dialogue moléculaire.La recherche. 250:92-94.
- Turnbull J. 2004 - A name change for acacias? NFT News. Improvement and culture of nitrogen fixing trees 7:1-7.
- Valverde A., Velazquez E., Gutierrez C., Cervantes E., Ventosa A., and J.M Igual. 2003 - *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1979-1983.
- Van der Heijden M.G.A., Bardgett R.D and Straalen N.M.v. 2008 - The unseen majority. Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters.* 11:296-310.
- Van De Sande K. and Bisseling T. 1997 – Signalling in symbiotic root nodule formation. *Essays in biochemistry.* 32: 127-142.
- Velásquez E.P., Mateos F., Velasco N., Santos F., Burgos P.A., Villadas P., Toro N., Martínez-Molina E. 1999 - Symbiotic characteristics and selection of autochthonous strains of *Sinorhizobium meliloti* populations in different soils *Soil Biology and Biochemistry.* 31:1039–1047.
- Vercoe T.K. 1986 – Fodder potential of selected Australian tree species. In *Australian Acacias in Developing Countries, Proceedings of an international works hop held at the Forestry Training Center Gympie, Old, Australia, 4-7 August 1986* (J.W, ed),pp.95-100,ACIAR Proceedings no. 16,Australian Center for International Research, Canberra.
- Vincent J.M. 1970 - A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP handbook n°15. Blackwell Sci. Publ. Oxford.164p.
- Vincent J.M. 1981 - Genus *Rhizobium*. In *the Prokaryots*. Storm M. P., Stol P. H. Balowsa and Schelgel H. G. (Eds.), Springer, Verlag, Berlin, 1: 818-843.
- Viprey V., Perret X. et Broughton W.J. 2000 - Host plant invasion by *Rhizobia*. *Sub cell.Biochem*, 33:437-456. Dans “ *Bacterial invasion into Eucaryotic cells*”. Oelschlaeger A. et Hacker D.E. (Eds). Kluwer Academic and Plenum publishers. New york, pp: 213-285.
- Waterer J.G., Vessey J.K. and Raper C.D. 1992 - Stimulation of nodulation in field peas (*Pisum sativum*) by low concentration of ammonium in hydroponic culture.*Plant.Physiol.*86:215-220.
- Watson L and Dallwitz M.J. 2000 - The families of flowering plants: Description, illustrations and formation. Retrieval.
- Willems A. 2006 – The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and soil* 287:3-14.
- Woese C.R. 1987 - Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51 :221-271.
- Wolde-meskel E., Terefework Z., Lindström K and Frostegård Å. 2004 - *Rhizobia* nodulating African *Acacia* spp. and *Sesbania* sesban trees in southern Ethiopian soils are metabolically and genomically diverse. *Soil Biology and Biochemistry*36:2013-2025.
- Young J P W. 1993 – Molecular phylogeny of rhizobia and their relatives. In: Palacios R; Mora J and Newton W E, ed *New horizons in nitrogen fixation*. Dordrecht, the Netherlands, kluwer Scientific Publishers, 587-592.



- Young J M. 2003 - The genus name *Ensifer* Casida 1982 - Takes Priority over *Shinorhizobium*. Chen et al. 1988 and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 - is a later synonym of *Ensifer adhaerens*
- Zahran H.H. 1999 - *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *MMBR*.63:968-989.
- Zeze A., Mutch L.A and Youg J.P. 2001 - Direct amplification of NodD from Community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil. *Environ. Microbiol.*3:363-370.

# Annexes

## Annexe 1

### Composition du milieu YMA (Vincent 1970)

|   |            |
|---|------------|
| Mannitol.....                                 | 10         |
| g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....       | .....      |
| 0.5g MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O..... | .....      |
| 0.2g Extrait de levure.....                   | .....      |
| 0.4g NaCl.....                                | 0.1g Rouge |
| de Congo 1%.....                              | 10ml Eau   |
| distillée ..                                  | 1000ml     |

Le pH du milieu est ajusté à pH 7 avec HCl ou KOH 10N et sa stérilisation est assurée par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

## Annexe 2

### Composition du milieu TY (Tryptone Yeast Extract)

|                |            |
|----------------|------------|
| Tryptone.....  | 5g Extrait |
| de levure..... | 3g Eau     |
| distillée..... | 1000ml     |

Ajuster le pH à 7 avec KOH ou HCl N/10 - Stériliser à 120°C pendant 20mn et ajouter 6ml/l de CaCl<sub>2</sub> (1M) stérile juste avant l'utilisation.

## Annexe 3

### Composition du milieu de conservation de souches

|                |          |
|----------------|----------|
| Glycérol.....  | 600g Eau |
| distillée..... | 400ml    |

Ce milieu est stérilisé à 120°C pendant 20mn

## Annexe 4

### Composition du milieu Amarger

|  |        |
|--|--------|
| Mannitol.....  |        |
| 10g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....                  |        |
| 1g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                   |        |
| 1g FeCl <sub>3</sub> ,6H <sub>2</sub> O.....               |        |
| 0.01g MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....           |        |
| 0.2g CaCl <sub>2</sub> .....                               |        |
| 0.1g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ..... |        |
| 1g Agar.....   | 4g Eau |
| distillée.....   | 1000ml |

Ce milieu est stérilisé à 120°C pendant 20mn

Coloré avec solution de bleu de bromothymol 1ml par 1000ml.

## Annexe 5

### Souches de références utilisées en phénétique:

| Souches de références           | Code de la souche |
|---------------------------------|-------------------|
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | USDA 6            |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i>   | USDA 1002         |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i>   | USDA 1002         |
| <i>Mesorhizobium ciceri</i>     | USDA 3383         |
| <i>Mesorhizobium loti</i>       | USDA 3471         |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i>  | USDA 2370         |
| <i>Rhizobium gallicum</i>       | USDA 2918         |

## Annexe 6 :



