

Institut National Agronomique El-Harrach - Alger

Département Foresterie

Option : Biotechnologie et Biodiversité Végétales

MÉMOIRE Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister En Sciences Agronomiques

Caractérisation phénétique de souches de Rhizobium associées au groupe des Intertextae (Genre Medicago)

Présenté par :

BENDIFALLAH Nassim

Promoteur Mr ABDELGUERFI A. Maître de Conférences (INA) Co-promoteur Mr
AMRANI S. Chargé de Cours (FSB/USTHB)

Soutenu publiquement le 29 avril 2007

devant le jury composé de : Présidente Mme MEKLI CHE L. Maître de Conférences (INA)
Examineur Mme AID F. Professeur (FSB /USTHB) Examineur Mr KACI Y. Maître de
Conférences (FSB /USTHB)

Table des matières

..	1
Remerciements . .	3
Résumé .	5
Summary . .	7
Introduction . .	9
Synthèse Bibliographique . .	11
1.1. La fixation de l'azote .	11
1.2. La symbiose rhizobia-légumineuses .	13
1.2.1. Etablissement de la symbiose .	13
1.2.2. Importance agronomique de la symbiose Rhizobium-légumineuse .	14
1.2.3. Les rhizobia associés aux luzernes .	15
1.2.4. Classification des rhizobia .	16
2.1. Matériel et Méthodes . .	19
Origine de la collection étudiée . .	19
2.2. Caractérisation pédologique des sols : . .	20
2.3. Caractérisation des souches .	21
2.3.1. Préparation des milieux tests . .	21
2.3.2. Conservation des souches . .	22
2.3.3. Régénération des souches à partir de la collection conservée .	22
2.3.4. Détermination des caractéristiques des souches de <i>Rhizobium</i> . .	23
2.4. Analyses statistiques .	27
- La taxonomie numérique . .	27
- Indice de similitude . .	27
- ACP (Analyse en Composantes Principales) . .	28
- Logiciel utilisé .	28
Résultats et Discussion . .	29

3.1. Caractérisation pédologiques . .	29
3.2. Régénération des souches (Annexe 4) .	30
3.3. Détermination du caractère de souches et leur classification . .	30
3.3.1. Effet de la température sur la croissance des souches . .	30
3.3.2. Effet du pH sur la croissance des souches . .	31
3.3.3. Résistance à la salinité .	32
3.3.4. Résistance au stress hydrique . .	32
3.3.5. Métabolisation des hydrates de carbones .	33
3.3.6. Métabolisation des sources d'azote .	37
3.3.7. Agents antibactériens .	40
3.3.8. Résistance aux métaux lourds . .	44
3.3.8. Aptitude à solubiliser les phosphates . .	45
3.4. Analyse générale . .	45
Conclusion Générale .	49
Références Bibliographiques .	51
Annexes . .	57
Annexe 1 . .	57
Annexe 2 . .	58
Annexe 2 (suite) .	59
Annexe3 .	60
Annexe 4 . .	61

*Dédicaces 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 mes deux directeurs de thèses, Mr Abdelguerfi Aissa et Mr Amrani Said pour les connaissances et le savoir-faire qu'ils m'ont apportés qui sont et resteront précieux pour moi.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme Mekliche L. Maître de conférence à l'INA (Institut National Agronomique), pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

Je remercie également Mme Aid F., professeur à la FSB de l'USTHB qui me fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie aussi Mr Kaci Y., Maître de conférence à la FSB de l'USTHB, pour son aide et ses conseils et de me faire l'honneur d'examiner ce travail de thèse.

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

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

Le laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes de l'INRA de Toulouse, et spécialement au professeur Huguet T. pour son aide, ses conseils et sa disponibilité.

Le département des sciences du sol de l'INA (Institut National Agronomique).

Le département phytotechnie de l'INA (Institut National Agronomique).

Le laboratoire des sciences du sol de l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique), ainsi que Mme Abdelguerfi M. du Laboratoire d'Amélioration des Plantes.

A Mme Dekich N. de l'ITGC (Institut Technique des Grande Culture) pour m'avoir fait profiter de son expérience dans le domaine de la pédologie

Les membres du département foresterie en particulier le professeur Belatreche, pour son aide et son soutien.

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

Merci pour tout

Résumé

L'étude de 90 souches de *Rhizobium medicae* issues de plants de 4 espèces de luzerne du groupe des *Intertextae* a montré l'existence d'une grande diversité à différents niveaux d'analyse : sol et plante hôte d'origine mais également la provenance de cette dernière (indigène ou introduite).

L'analyse des caractéristiques phénotypiques de ces souches indique que celles piégées par *Medicago granadensis* et *M. muricoleptis* se différencient de celles issues de *M. ciliaris* et *M. intertexta* par :

Leurs relatifs faibles niveaux de tolérance aux différents stress

L'expression de voies de métabolisation différentes chez les deux groupes de souches, malgré leurs larges spectres d'utilisation des substrats carbonés et azotés, par une nature plus acidifiante des rejets cellulaires.

Une relative facilitée dans l'utilisation des substrats azotés simples et de certains acides aminés.

Les souches, présentent dans l'ensemble, des caractères de résistance aux stress physiochimiques et présentent un potentiel à solubiliser les phosphates organiques très intéressants.

Les résultats obtenus sont en accord avec les données biomoléculaires établies sur le même souche.

Mots clés: *Rhizobium medicae*, caractérisation phénétique, diversité, Taxonomie numérique, *Medicago* du groupe des *Intertextae*.

Summary

We performed a study on 90 Rhizobia strains associated with plants 2 indigenous (*Medicago ciliaris* & *M. intertexta*) and 2 introduced (*M. granadensis* & *M. muricoleptis*) species of inter group Medics.

The 90 strains examined showed a big diversity by respect to several traits:

-Soil provenance and characterisation

-Initial host plant and status of the host plant (indigenous or introduced).

Analysis of the phenetic patterns of the 90 strains showed that the strains associated with *Granadensis* and *Muricoleptis* can be distinguished from the other ones by:

-A lower tolerance level to salinity and drought stress.

-The expression of different metabolic pathways as expressed by higher proportion of acid reaction recorded with the majority of the carbohydrates and nitrogen sources tested.

The strains showed overall a good tolerance versus the physico-chemicals stress and are high phosphatases producers witch are two interesting traits.

Our results and analyses are consistent with the biomolecular recorded by other authors with the same strains.

Key words: *Rhizobium medicae*, phenetic characterisation, diversity, numeric taxonomy, *Medicago* of Intertextae group.

Introduction

La population mondiale actuelle est supposée doubler avant l'an 2050 (James, 1997). Par conséquent, le défi pour le futur repose sur la sécurité alimentaire de ces populations qui nécessite un doublement de la production alimentaire qui ne peut se faire que par le biais de l'augmentation de l'efficacité de la production agricole.

On constate des difficultés marquées de la production animale en Algérie, et ceci est dû essentiellement à un déficit dans la production fourragère et à l'exploitation non rationnelle des ressources pastorales. Les territoires réservés à ces spéculations appartiennent, en général, aux étages bioclimatiques semi-aride et aride, ce qui exige l'utilisation d'espèces adaptées, ayant une souplesse dans leur cycle de développement, permettant leur intégration dans les différents systèmes agro-pastoraux existants et potentiels, et possédant aussi une valeur alimentaire intéressante.

Les légumineuses fourragères sont une alternative intéressante, car en plus de leur potentiel productif, ce sont des plantes qui ont des propriétés améliorantes du sol tant sur le plan physique, chimique que microbiologique.

Pour cela, on a cherché à promouvoir, une nouvelle forme d'agriculture capable d'assurer des rendements soutenus dans le temps tout en étant plus respectueuse pour l'environnement. Cette forme d'agriculture est désignée sous le terme «d'agriculture intégrée» ou «d'agriculture durable»

L'un des éléments clés de l'agriculture durable est l'utilisation rationnelle des relations bénéfiques qui existent dans la nature entre les plantes et les microorganismes.

En effet, les plantes ne vivant pas seules, entretiennent des formes d'associations avec des microorganismes du sol ; parmi ces associations, la symbiose et en particulier celle établie entre les légumineuses et les *Rhizobiums*. L'utilisation de cette symbiose confère aux légumineuses la capacité de fixer l'azote moléculaire.

C'est pour cette raison que l'exploitation des propriétés de l'activité symbiotique tend à se généraliser dans le monde par le biais des pratiques suivantes :

La rotation légumineuses céréales en remplacement de la jachère ;

L'augmentation de la productivité et de la qualité nutritive des fourrages par les cultures mixtes légumineuses-graminées ;

L'utilisation de légumineuses à fort pouvoir fixateur d'azote comme engrais vert, dans certains pays, pour l'enrichissement du sol en azote et en matière organique ;

L'inoculation des cultures et des semences de légumineuses par des *Rhizobiums* hautement efficaces avec celles-ci.

Parmi les légumineuses à haute valeur fourragère, le genre *Medicago*, bien représenté en Algérie, constitue un patrimoine génétique extrêmement riche et diversifié qui mérite d'être valorisé.

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur l'identification, la caractérisation et la valorisation de ce groupe de plantes, mais le deuxième protagoniste associé à la relation symbiotique, le rhizobia, reste pratiquement méconnu en Algérie.

Abdelguerfi-Laouar (2005), après un travail de prospection et de piégeage dans différents sites, et la constitution d'une collection non négligeable de souches associées à des populations de *Medicago* de la section des *Intertextae*, a pu montrer que dans la limite de la collection étudiée, toutes les souches (sans exception) nodulant ce groupe de plantes, en Algérie, appartiennent à l'espèce *Sinorhizobium medicae*.

Afin de compléter les informations sur les souches qui ont fait l'objet de cette étude, il nous a été proposé de caractériser ces souches sur le plan phénotypique et d'évaluer leur diversité¹.

¹ Ce travail est mené dans le cadre de la coopération bilatérale franco-algérienne (Projet CMEP N°01-541/2001) et algéro-tunisienne (Projet INRAA-INRST).

Synthèse Bibliographique

1.1. La fixation de l'azote

Tout organisme vivant a besoin pour son développement d'une source d'azote, mais les formes exploitables de cet élément dans la biosphère sont des formes combinées minérales (NH_3 , NO_3 ...) ou organiques (AA, Urée...), ce qui constitue un facteur limitant pour leur développement, car relativement rare (Vitousec et Matson, 1993 ; Denarié et Joly, 1994 ; Holland *et al.*, 1999).

L'azote constitue 80% de la masse de l'atmosphère terrestre, mais sous sa forme moléculaire (N_2), il n'est utilisable que par un nombre très restreint de microorganismes, qui ont la capacité de réduire la forme moléculaire, prélevée dans l'atmosphère, en ammoniac, chaînon de départ de cet élément dans le circuit de métabolisation (Postgate, 1982 ; Luttge *et al.*, 1994).

Ces organismes sont appelés : organismes diazotrophes ou fixateurs d'azote, leur efficacité dépend directement de l'intimité de la symbiose qu'ils entretiennent avec d'autres organismes, animaux ou végétaux ; car, cette activité nécessite une dépense énergétique très importante (pour réduire une molécule d' N_2 , la bactérie doit utiliser 16ATP en plus de l'énergie nécessaire à ses autres fonctions) (Postgate, 1982 ; Streeter, 1993) qui leur est impossible d'assurer étant isolés. Ainsi, selon le degré de

rapprochement qu'ils ont atteint durant leur évolution, ils ont mis en place trois systèmes de fixation d'azote avec les plantes (Luttge *et al.*, 1994) (**Fig. 1**) :

Le système libre : ces bactéries n'entretiennent pas de lien direct avec les plantes, elles vivent librement et se nourrissent de débris végétaux ; ce système est le moins efficace car la compétition avec le reste de la microflore tellurique pour l'utilisation des ressources du milieu est rude. Ces organismes représentés essentiellement par les genres *Azotobacter*, *Clostridium* et *Klebsiella* (Hill, 1992), ne peuvent fixer plus de 10kg/h/an d'azote atmosphérique.

Le système associatif ou semi symbiotique : ces espèces du genre *Azospirillum* et *Acetobacter*, colonisent la rhizosphère, le rhizoplan voire même les tissus racinaires, profitant de leurs exsudats pour couvrir leurs besoins énergétiques (Hill, 1992). Cette deuxième catégorie de diazotrophes profite d'une meilleure couverture de leurs besoins énergétiques pour atteindre des niveaux de fixation de l'ordre de **50 à 100 kg N/ha/an**.

Le système symbiotique : dans ce cas de figure, le siège de la symbiose est un véritable organe, plus ou moins évolué (poches, nodules,...), qui permet des échanges intimes entre le macrosymbiote, qui est la plante, et le microsymbiote, la bactérie.

Ces bactéries sont subdivisées en trois groupes :

les Cyanobactéries, du genre *Anabaena* et *Nostoc*, associées à des fougères aquatiques (*Azola*) et à des gymnospermes (Cycadales) (Hill, 1992) ;

les Actinomycètes, du genre *Frankia*, associées à des plantes dites actinorhiziennes du genre *Casuarina* et *Alnus*.

les *Rhizobia*, du genre *Rhizobium*, associés aux plantes de la famille des légumineuses. la symbiose *Rhizobium*-légumineuses serait à elle seule responsable de la fixation de 180 millions de tonnes d'azote par an ; Broughton et Perret (1999) la considèrent comme le système symbiotique le plus évolué, car chacun des acteurs de cette association a développé une voie de métabolisation capable de capter une substance inorganique présente dans l'atmosphère, et de la transformer en éléments assimilables, subvenant à des besoins complémentaires :

la bactérie, par la voie diazotrophe, assure la couverture mutuelle des besoins en matières azotées ;

et la plante, par la photosynthèse, assure la couverture des besoins énergétiques.

C'est le système le plus intéressant car en plus du niveau de fixation qui est très élevé, il concerne un groupe de plantes très important pour l'homme, les légumineuses.


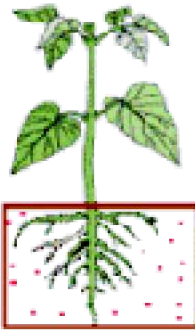
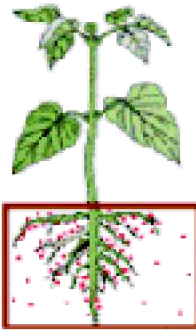
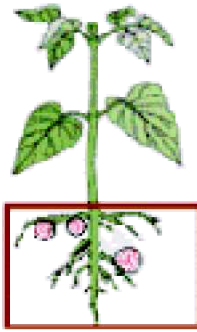
Système fixateur	Fixation libre	Fixation associative	Fixation symbiotique
N_2  NH_3^+			
Localisation	Sol	Rhizosphère	Nodule
Organismes	<i>Klebsiella...</i>	<i>Azospirillum...</i>	<i>Rhizobium...</i>
Energie	Résidus végétaux	Exsudats racinaires	Photosynthétats
Azote fixé	10-50	50-100	100-400

Fig. 1 : Les systèmes de fixation d'azote Bactérie-plantes (Luttge et al., 2002)

1.2. La symbiose rhizobia-légumineuses

C'est la relation entre les légumineuses et les rhizobia qui se traduit par une infection de la plante hôte (la légumineuse) par la bactérie (le *Rhizobium*), ce qui induit la formation d'un **nodule**, qui est le siège de la symbiose.

1.2.1. Etablissement de la symbiose

La symbiose se traduit par la formation d'un organe, siège des interactions entre la bactérie et la plante hôte, cet organe spécifique est appelé nodule.

Les *Rhizobiums* se trouvent naturellement à l'état libre dans la rhizosphère, l'établissement de la symbiose entre les deux partenaires passe par une phase de rapprochement de reconnaissance et d'échange de signaux chimiques spécifiques,

La plante éxude différentes substances nutritives, notamment des flavonoïdes, stimulant la croissance des bactéries qui répondent par une attraction vers le système racinaire de la légumineuse, c'est le chimiotactisme.

Les bactéries stimulées produisent des lipo-oligosaccharidiques (LCO) appelés **Facteur Nod** (Fisher, 1994) ; ces substances sont spécifiques, et résultent de l'expression d'une batterie de gènes dits gènes *nod*, ils se subdivisent en trois groupes :

Les gènes **nod communs** : Ce sont les gènes *nod a, b et c*, communs chez tous les *Rhizobiums* (Truchet et al., 1993) ; ils sont responsables de la formation du squelette

N-acétyl glucosamine du Facteur NOD (Bladerngroen *et al.*, 1998) ;

Les gènes **nod spécifiques** : gènes qui codent pour la formation des lipo-oligosaccharidiques (Van de Sande et Bisseling, 1998) dont la structure détermine le spectre de l'hôte à infecter, donc de la compatibilité entre les deux protagonistes (deuxième niveau de spécificité) (Triplett et Sadowsky, 1992) ;

Les gènes **nod régulateurs** : ces gènes codent pour une protéine, le facteur *nod d*, responsable de la régulation des autres gènes *nod* (Van de Sande et Bisseling, 1998), élément constitutif de la cellule bactérienne, il joue le rôle de récepteur de flavonoïdes, dont la compatibilité confirme le premier niveau de spécificité,

La formation du nodule passe par plusieurs phases

La colonisation de la surface du poil absorbant et l'échange de signaux, ce sont des facteurs chimiques spécifiques à chaque espèce, et dont dépend la spécificité symbiotique des deux protagonistes, pour la plante, ce sont les flavonoïdes, tandis que pour le *Rhizobium*, ce sont les facteurs Nod ;

L'infection du système racinaire par les bactéries au niveau de la courbure formée par le poil absorbant à son extrémité appelée « crosse de berger », à ce niveau là, des enzymes hydrolytiques végétales fragilisent la paroi pour faciliter la pénétration, un filament infectieux progresse vers le bas de la cellule ;

Le facteur Nod induit la différenciation de quelques cellules corticales et les stimule ; elles se divisent activement et donnent naissance au primordium nodulaire (Geurts et Franssen, 1996) qui reçoit les bactéroïdes à acheminer par le cordon infectieux ; les bactéries pénètrent les cellules végétales par endocytose (Verma, 1992 ; Oke et Long, 1999 ; Cermola *et al.*, 2000), un cloisonnement se forme autour des bactéries dérivant des parois cellulaires de la plante, cette structure est appelée « symbiosome », lieu, après maturation du nodule, où s'effectue la symbiose.

1.2.2. Importance agronomique de la symbiose Rhizobium-légumineuse

En plus de la fixation d'azote, les rhizobia présentent d'autres caractères intéressants sur le plan agronomique :

- solubilisation du phosphore inorganique (phosphore des sols majoritairement sous forme insoluble non utilisable par la plante) ; le phosphore est, avec l'azote, le facteur qui limite le plus la production des agrosystèmes ;
- minéralisation du phosphore organique ; Turn over du phosphore ;
- chélation du fer ;
- production de phytohormones ;
- amélioration de la texture du sol par l'exsudation de polysaccharides.
- Toutes ces caractéristiques des rhizobia font qu'ils soient les plus étudiés parmi les bactéries du sol.

1.2.3. Les rhizobia associés aux luzernes

Les rhizobia sont classiquement définis comme étant des bactéries symbiotiques, capables d'envahir les tissus racinaires, formant des nodules chez les légumineuses, où elles entreprennent une fixation biologique de l'azote (Manvika *et al.*, 2003) ; ce sont des Eubacteries appartenant à la classe des alpha-protéobactéries (Zakhia et De Lajudie, 2001) à Gram négatif, ce trouvant à l'état libre dans le sol sous forme de bâtonnet court à bout arrondi, aérobie stricte, chimiotrophes et hétérotrophes (vincent 1970 ;1981 ; jordan,1984 ; elkan 1992 ; somasegaran et hobben, 1994 ; Zakhia et De Lajudie, 2001).

Les luzernes: le genre *Medicago*

Les plantes comme le haricot, le petit pois, la fève, le pois chiche, la lentille, la luzerne, les acacias, le caroubier, pour ne citer que les plus familières, font partie de la famille des légumineuses. Cette famille constitue l'un des groupes de plantes les plus importants pour l'homme. Les légumineuses sont utilisées pour produire des graines, du fourrage ou de l'engrais vert. Elles synthétisent également une large gamme de produits naturels comme des arômes, des principes actifs médicamenteux, des poisons, des colorants, des tannins, des gommages...etc.

Les légumineuses sont une composante importante de tous les biotopes terrestres, sur tous les continents, excepté l'Antarctique. Leur principale caractéristique est leur fruit appelé légume ou gousse.

Avec plus de 18.000 espèces réparties sur 750 genres (Polhill et Raven, 1981), ce qui représente presque 1/12 des plantes à fleurs connues, la famille des légumineuses représente l'une des plus grandes familles des plantes à fleurs.

La famille des légumineuses est généralement subdivisée en 3 sous-familles :

Papilionoideae ,

Caesalpinioideae ,

Mimosoideae

Ces sous-familles sont parfois considérées comme des familles séparées: *Papilionaceae*, *Caesalpinaceae* et *Mimosaceae*.

Les quatre espèces hôtes associées à nos souches appartiennent au genre ***Medicago*** , il est représenté par 37 espèces algériennes et/ou méditerranéennes (Quezel et Santa, 1962)

Ces quatre espèces sont :

- *Medicago intertexta*,
- *Medicago ciliaris*,
- *Medicago muricoleptis*,
- *Medicago granadensis*.

A l'origine le terme générique de *Rhizobium* désignait toute bactérie capable de former

des nodules fixant l'azote avec au moins une légumineuse.

Progressivement la diversité des bactéries impliquées a amené à distinguer chez ces bactéries symbiotiques, des genres différents *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*... tous appartenant au groupe des alpha-proteobactéries. On a convenu alors d'appeler ces bactéries sous le terme global de rhizobia.

Ces dernières années on a montré que des bactéries d'autres groupes que les Alphaprotéobactéries sont elles aussi capables de noduler certaines légumineuses ; il s'agit de :

- Burkholderia
- Methylobacterium
- Ralstonia
- Ensifer
- (Brucella...)

Cette diversité laisse indiquer que la capacité de noduler et de fixer l'azote est apparue au cours de l'évolution chez plusieurs groupes bactériens.

Dans le cas qui nous intéresse, bactéries nodulant les luzernes, les bactéries recensées à ce jour font partie du genre *Sinorhizobium* qui est défini et qui comporte aujourd'hui 12 espèces à savoir :

- *S. abri*
- *S. americanus*
- *S. arboris*
- *S. fredii*
- *S. indiaense*
- *S. kostiense*
- *S. kummerowiae*
- *S. meliloti*
- *S. medicae*
- *S. morelense*
- *S. sahelense*
- *S. terangae*

1.2.4. Classification des rhizobia

Mise à part leur capacité à établir une symbiose avec les légumineuses, aucun caractère cultural, morphologique, physiologique ou biochimique, ne peut distinguer les rhizobia des autres bactéries du sol.

La classification des rhizobia a longtemps été basée sur leur spécificité symbiotique (Jordan, 1984 ; Zakhia et de Lajudie, 2001 ; Manvika *et al.*, 2003). Jordan (1984) a d'abord défini des groupes d'inoculation croisée subdivisée en deux genres ayant des caractéristiques physiologiques et biochimiques distincts (Elkan 1992 ; Manvika *et al.*, 2003) :

- Les *Rhizobium*, qui sont les espèces à croissance rapide, dont le temps de régénération est inférieur à 5 heures, sont acidifiantes, et généralement associées aux légumineuses des régions tempérées (Romero, 2000).

- Les *b radirhizobium* incluant une seule espèce, *B. japonicum*, spécifique au soja (*Glycine max*), qui est une espèce à croissance lente (temps de régénération supérieur à 5 heures), et qui contrairement au premier groupe, induit une basification du milieu.

Mais la taxonomie basée uniquement sur l'inoculation croisée et le profil phénotypique seuls, ne reflète pas la phylogénie des groupes, car on trouve un grand nombre d'exception (Zakhia et De Lajudie, 2001 ; Manvika *et al.*, 2003) ; à titre d'exemple le soja (*G. max*), d'où ont été isolés en même temps des rhizobia à croissance rapide et à croissance lente (Scholla et Elkan, 1984). De plus des légumineuses des régions tempérées, tel que *Coronilla* et *Lupinus* (Allen, 1981) sont infectées par des rhizobia à croissance lente, et on trouve des exceptions dans le sens inverse (De Lajudie *et al.*, 1994 ; George *et al.*, 1994).

L'utilisation des techniques moléculaires ces vingt dernières années, telle la comparaison des séquences des gènes du 16S ARNr et l'hybridation ADN/ADN, a permis l'émergence de nouvelles espèces, et des changements considérables dans la classification (**Tab. 1**).

chaque technique utilisée en taxonomie, y compris la caractérisation de type phénotypique et biochimique, a son propre pouvoir discriminant ; leur fiabilité dépend de différents facteurs tels que les variables étudiées, les conditions particulières d'expérimentation, nombre et type de souches étudiées...etc. ; l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires, avec différents niveaux de discrimination, est qualifiée d'approche polyphasique. Le résultat est un consensus, avec un minimum de contradiction (Zakhia et De Lajudie, 2001).

Les travaux de Young *et al.* (1991), Yanagi et Yamasato (1993) et Willems et Collins (1993) basés sur l'étude des séquences 16S rARN ont eu comme résultat l'émergence d'un nouveau genre *Azorhizobium*, et le genre *Rhizobium* a été subdivisé en deux nouveaux genres : *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997) et *Sinorhizobium* (De Lajudie *et al.*, 1994), mais il n'existe pas de réelles différences phénotypiques justifiant la séparation des *Allorhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*.

2.1. Matériel et Méthodes

Origine de la collection étudiée

Les souches traitées dans le cadre de cette thèse, proviennent de la collection constituée par Abdelguerfi-Laouar (2005).

Ces souches ont été isolées à partir de nodules de plants de populations appartenant à la section des *Intertextae* (*Medicago ciliaris* ; *M. intertexta* ; *M. muricoleptis* ; *M. granadensis*) et identifiées en tant que *s inorhizobium medicae*.

M. muricoleptis et *M. granadensis* sont deux luzerne fournis par l'Australie ; des populations appartenant à ces deux espèces, ont été utilisées pour piéger des souches au niveau de la station expérimentale de l'INA. C'est pour cela que le préfixe AUS en plus du code de la population, est ajouté après le numéro du site de piégeage.

L'autre partie de la collection, a été extraite à partir de population de *M. ciliaris* et *M. intertexta* collectées lors de campagne de prospection.

La prospection a concerné 43 sites en plus du site de piégeage, le site 44 (INA) ; des échantillons de sol ont été prélevés au niveau de la couche arable (20 premier cm) de chaque site prospecté, pour être analysés et pour un éventuel piégeage *ex situ*, pour les populations chez lesquelles on n'aurait pas trouvé de nodules.

Les souches concernées par notre étude proviennent de 13 sites consignés au tableau 2:

Tab. 2 : sites d'origine des souches étudiées

Code du site	Wilaya	Année de prospection	Altitude	Etage bioclimatique
20	Bejaia	2003	250	Sub-humide
21	Bejaia	2003	50	Sub-humide
22	Bejaia	2003	900	Sub-humide
23	Jijel	2003	50	Sub-humide
24	Jijel	2003	40	Sub-humide
26	Jijel	2003	5	Sub-humide
27	Mila	2003	300	Semi-aride
34	Sétif	2003	1100	Semi-aride
35	Sétif	2003	950	Semi-aride
37	Sétif	2003	820	Semi-aride
40	Bouira	2003	600	Semi-aride
42	Alger	2003	28	Sub –humide
44	Alger (INA)	2003	60	Sub –humide

2.2. Caractérisation pédologique des sols :

Les sols des 44 sites ont subi une série d'analyse physique et chimique.

Les échantillons de sol sont d'abord séchés à l'air libre, puis broyés et tamisés à 2mm. Les analyses physiques, physico-chimiques et chimiques ont été réalisées selon les protocoles en vigueur au niveau des laboratoires du département pédologie de l'INA et de l'INRAA et correspondent à ceux préconisés par Duchaufour (1970) et Aubert (1978).

Les analyses effectuées sur ces sols sont :

- Granulométrie
- pH
- Conductivité électrique
- Calcaire total
- Matière organique
- Azote total
- Phosphore
- Bases échangeables
- Capacité d'échange cationique

2.3. Caractérisation des souches

2.3.1. Préparation des milieux tests

Les tests de caractérisation ont été menés en microgalerie (Fig.2), les milieux test ont été préparés sur la base d'un milieu YEMB (yest extract-mannitol) sur lequel nous avons apporté les modifications suivantes :

Pour les milieux de métabolisation des substrats carbonés, le mannitol a été remplacé par différentes sources de carbone, à la même proportion (10g par litre) ;

Pour les milieux de métabolisation des substrats azotés, l'extrait de levure a été remplacé par différentes sources d'azote ;

Pour les tests de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds, les substances testées ont été rajoutées au milieu YEMB, après stérilisation par microfiltration à 0.25μ , aux concentrations données par le tableau 3 ;

Pour évaluer la résistance des souches aux stress, différentes concentrations de PEG 6000 (stress hydrique), NaCl (stress salin) et niveau de pH ont été testées (Tab. 4).

Tab. 3 : Les modalités de préparation des agents antibactériens testés sur les souches

N°		[] milieux (μ g/ml)	[] sol° stocks (mg/ml)	solvants	Q stock/L (m
1	Chloramphénicol	100	10	éthanol ou méthanol	10
2	Tétracycline hydrochloride	100	10	éthanol (70%)	10
3	Pénicilline	100	10		10
4	Erythromycine	100	10		10
5	Spiramycine	100	10		10
6	Polymixine	100	10		10
7	Bacitracine	100	10		10
8	Novobiocine	100	10		10
9	Ampicilline	100	10		10
10	Oxacilline	100	10		10
1	MgCl ₂	100	10		10
2	ZnSO ₄	100	10		10
3	MoO ₃	500	50		10
4	CuSO ₄	100	10		10

Tab. 4 : Les différentes concentrations de NaCl, PEG 6000 et de pH testés sur les souches

N°	NaCl	PEG6000	pH
1	NaCl 0M	PEG 0M	pH5
2	NaCl 0,5M	PEG 0,05M	pH6
3	NaCl 1M	PEG 0,075M	pH7
4	NaCl 1,5M	PEG 0,1M	pH8

En ce qui concerne les modalités de préparation, la modification apportée consiste en :

Une préfiltration à 0.45µM pour éliminer les impuretés ;

Une stérilisation par microfiltration à 0,25µm, en conditions stériles, sauf pour certaines substances comme le PEG6000, l'amidon et la cellulose ou l'autoclavage était obligatoire, et ce à cause de la consistance de ces éléments.

Afin de sélectionner les souches capables de solubiliser les phosphates organiques en libérant des enzymes phosphatases, nous avons utilisé un milieu YMA semi-solide additionné d'une solution à 1% de phénolphtaléine di-phosphate stérilisée par microfiltration.

Lorsque le test projeté le permet, un indicateur de pH, le bleu de bromothymol (virage à pH6 et pH7,6) est ajouté au milieu. 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.

2.3.2. Conservation des souches

Nous avons utilisé pour cela des cryotubes stériles d'une contenance de 3ml.

Dans le tube ouvert en condition stérile,

1,2ml d'une culture de rhizobia obtenue en milieu TY liquide ;

0,6ml de glycérol 60% stérile.

Les tubes sont fermés, renversés pour homogénéiser le milieu, et stockés à -80°C.

2.3.3. Régénération des souches à partir de la collection conservée

Les souches à caractériser ont été repiquées à partir d'une collection conservée en gélose profonde pendant une période de deux années. (Fig.2)

Les souches ont été remises en culture sur milieu TY (Fig.3).

Pour la caractérisation, nous n'avons pris que trois souches par site, choisies arbitrairement, soit quatre vingt dix souches au total. En plus de nos souches, nous avons utilisé 8 souches de référence gracieusement mises à notre disposition par le laboratoire de biologie du sol (USTHB) (Tab. 5)

tab. 5 : Liste des souches de références

USDA 6	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	USDA 1037	<i>Sinorhizobium medicae</i>
USDA 76	<i>Bradyrhizobium Elkanii</i>	USDA 3622	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>
USDA 205	<i>Sinorhizobium Fredii</i>	USDA 4892	<i>Azorhizobium caulinodans</i>
USDA 1002	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA 10001	<i>Mesorhizobium unamorphae</i>

2.3.4. Détermination des caractéristiques des souches de *Rhizobium*

La technique utilisée pour établir le profil phénotypique est basée sur la méthodologie préconisée par l'American Society for Microbiology (Smibert et Krieg, 1984), elle permet d'obtenir des profils fiables et reproductibles, en utilisant des témoins non inoculés avec 3 répétitions.

Nous nous sommes basé sur les travaux de Smibert et Krieg (1984), Holmes *et al.* (1986), Novikova (1994) et Lindstrom (1995), pour le mode opératoire, le choix des tests et des concentrations des différents substrats carbonés, sources d'azote et agents anti-bactérien.

Les tests retenus ont été réalisés en microgaleries développées par nos soins au laboratoire de biologie du sol (Fig. 4). Le système mis au point consiste en l'utilisation de plaques de microtitration à 96 puits. Nous plaçons dans chacun des puits 0,2ml de milieu test.

Nous utilisons pour l'ensemencement des puits, des cures-dents stériles, pour apporter, relativement la même quantité d'inoculum.

La lecture se fait après 24 heures, de manière visuelle en notant le virage du bleu de bromothymol vers le jaune (acidification) ou le bleu (alcalinisation) et/ou en observant le trouble du milieu résultant de la croissance des bactéries. (Fig. 5)

Les galeries que nous avons utilisées s'apparentent aux galeries commerciales renfermant des milieux lyophilisés telles API ou BIOLOG mais présentant le désavantage de ne pas se conserver durant de longues périodes. Les microgaleries, une fois prêtes, doivent être utilisées assez rapidement.



Fig.2 : Conservation des souches en gélose profonde

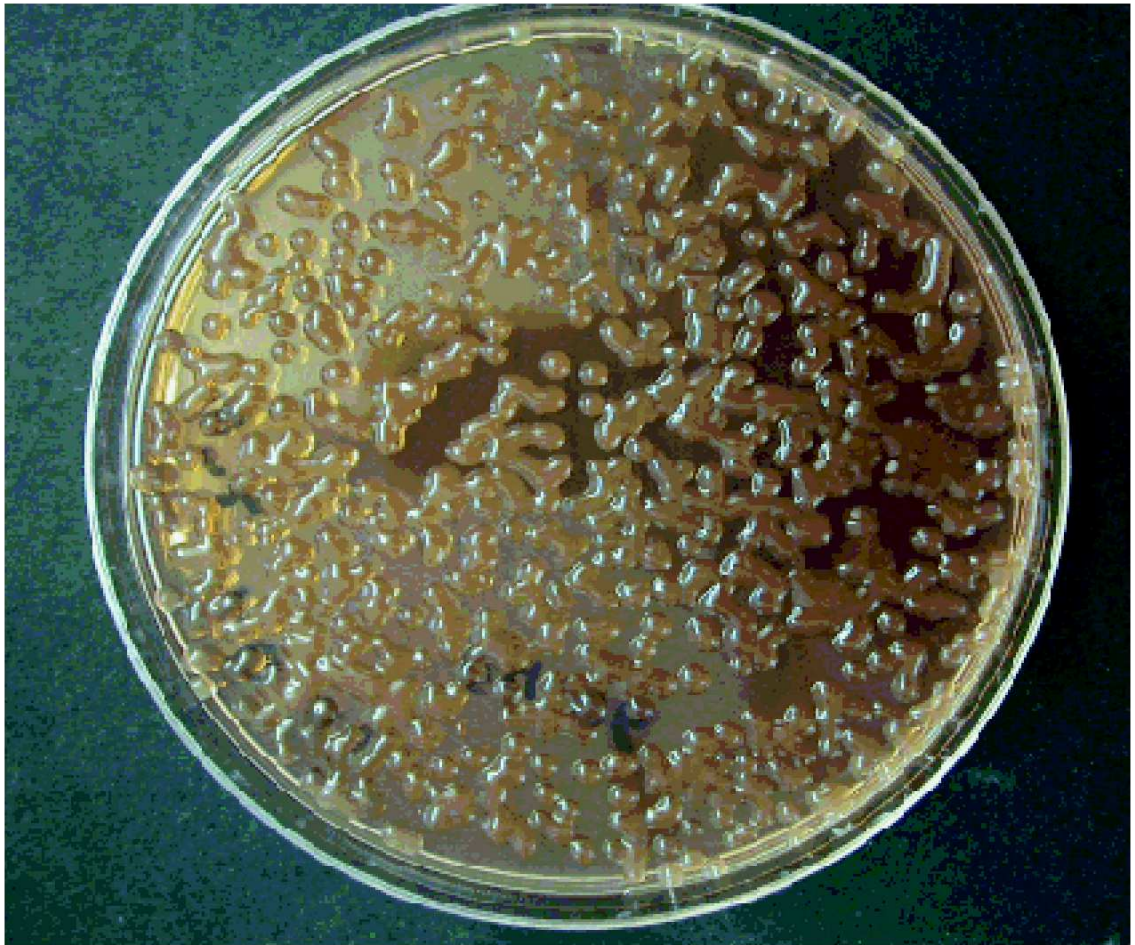


Fig.3 : Culture sur milieu Y.M.A.-RC pour détecter les contaminants

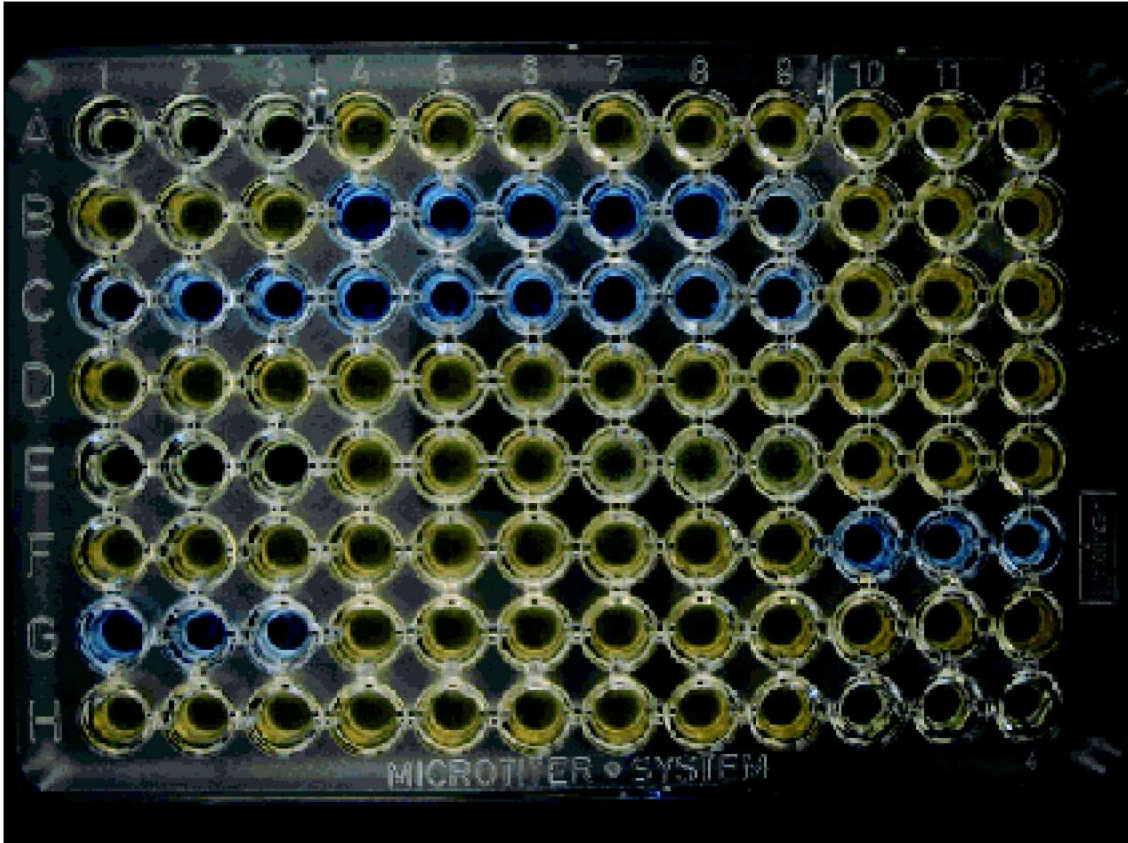
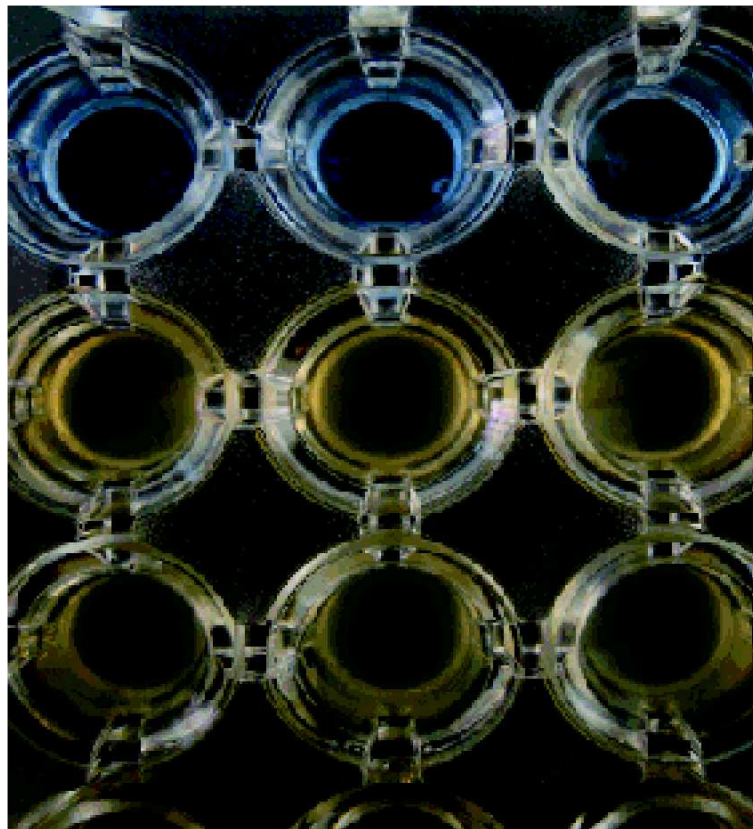


Fig 4: Microgalerieensemencée



Basification du milieu

Acidification du milieu

Réaction positive mais neutre

Fig 5: Réaction des souches vis à vis du milieu

2.4. Analyses statistiques

- 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 ; plus le nombre de caractères est important, plus les relations entre individus sont claires, c'est une méthode de classification tenant compte des relations phénétiques entre les organismes étudiés (Sneath, 1974 ; Pesenko, 1982).

Lindstrom (1995), Sneath, (1995) et Gest (1999) considèrent qu'avec une centaine de caractères significatifs et non redondants, on peut obtenir une image d'une résolution supérieure à celle obtenue par les techniques de biologie moléculaire restreintes à l'étude partiel du génome.

- 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 et appelé « indice de similitude ». Le plus couramment utilisé en biologie est l'indice de Jaccard.

Formule jaccard : $JJI = A / (A + B + C)$

JJI = coefficient de jaccard

A,B,C... = valeur de l'otus chez chaque individu (0 ou 1)

Le dendrogramme n'est qu'une représentation graphique de cette matrice (Annex 2), il permet une visualisation simple pour une interprétation aisée des résultats obtenus.

- ACP (Analyse en Composantes Principales)

Son but est d'obtenir une représentation en forme de nuage des individus dans un espace de dimension réduite. La dispersion du nuage est déterminée par les axes qui prennent en compte la contribution de chaque variable. Ces axes sont les axes factoriels qui permettent de représenter au mieux les points du nuage.

- 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.

Résultats et Discussion

3.1. Caractérisation pédologiques

Celons les normes « AFNOR », les sols 20, 21, 22, 23, 26, 27, 34, 35, 37, 40, 44 sont moyennement alcalins alors que les sols 24 et 42 sont fortement alcalins avec un pH de 8.67 et 8.58 respectivement (Annexe 3).

Les sols enregistrent des valeurs de calcaire total très différentes. Les sols 21, 23, 24 et 44 sont des sols très peu calcaires avec des valeurs variant de 1.1 à 3.5%, les sols 20, 34 et 42 sont moyennement calcaires avec des taux variant de 5.9 à 12.6 %. Les sols très fortement calcaires sont représentés par les sols 22, 26, 35, 37 et 40 dont les valeurs varient de 16.3 à 36.1%.

Tous les sols explorés montrent de faibles teneurs en azote total puisque celles-ci ne varient qu'entre 0.08 et 0.28%.

Ces sols sont, par ailleurs, faiblement affectés par la salinité puisqu'ils montrent des conductivités électriques faibles à très faibles (0.58 à 0.15 msimens.cm⁻²)

Les sols enregistrent des valeurs très faibles en phosphore assimilable variant entre 0.178 et 0.709 ppm.

Certains sols explorés (35, 34, 22, 21) se sont révélés relativement riches en matière

organique, d'autres moyennement riches (24, 26, 27, 37, 40, 42, 44) ; seuls les sols 20 et 23 se caractérisent par un très faible taux de matière organique (1.4%) (Annexe 3).

3.2. Régénération des souches (Annexe 4)

Sur les 304 souches de la collection conservées en gélose profonde, pendant deux ans, 18 ne se sont pas développées, et 12 d'entre-elles ont été contaminées nécessitant une purification par repiquages successifs sur milieux YMA-RG. Le YMA est un milieu spécifique au *Rhizobium* car le mannitol est un polyol dont l'utilisation est peu courante, sauf pour ce groupe bactérien ; en plus, le rouge Congo, est un colorant qui n'est pratiquement pas absorbé par les *Rhizobiums*, contrairement à la plupart des bactéries. Ces souches ont été exclues du test en attendant de subir ultérieurement des tests de nodulation qui restent le test qui permet, sans conteste, de confirmer que ce sont bien des *Rhizobiums* (Annexe 4)

Le taux de réussite de la technique est de 94.1%, ce qui nous permet de confirmer deux points :

La concordance des résultats avec les données bibliographiques (Jordan, 1994), et selon lesquelles, les *Rhizobium* sont des aérophiles stricts, mais qui peuvent se contenter, si nécessaire, d'une pression partielle d'air, donc ce sont des bactéries **microaérophiles** ;

Sur le plan pratique, la technique de conservation des souches en gélose profonde ou piqure centrale, peut être considérée comme relativement fiable, et dont le taux de perte peut être minimisé par l'augmentation du nombre de répétitions ; c'est donc une solution alternative à la cryoconservation et surtout, qui ne coûte pas cher, car la conservation se fait à température ambiante, et n'exige aucune structure de stockage particulière.

3.3. Détermination du caractère de souches et leur classification

3.3.1. Effet de la température sur la croissance des souches

La plupart des souches testées, qu'elles soient issues de la prospection ou du piégeage, se sont révélées capables de croître à 30°C (Tab. 6) ce qui est en accord avec les données de la littérature, qui considère que la fourchette entre 20 et 30°C est relativement correcte pour les rhizobia (Lindstrom et Lehtomaki, 1988 ; De Lajudie *et al.* 1994 ; Chen *et al.*, 2001 ; Maâtallah *et al.*, 2002a ; Maâtallah *et al.*, 2002b ; Kishinevsky *et al.*, 2003).

Tab. 6 : Comparaison de la croissance des souches à 25 et 30°C

	T°C 25°C	T°C 30°C	Pourcentage	T°C 25°C	T°C 30°C
<i>intertexta</i>	15	13	<i>intertexta</i>	100	87
<i>ciliaris</i>	21	20	<i>ciliaris</i>	100	95
prospection	36	33	prospection	100	92
<i>granadensis</i>	30	15	<i>granadensis</i>	100	83
<i>muricoleptis</i>	24	6	<i>muricoleptis</i>	100	100
piégeage	54	21	piégeage	100	88
TOTAL	90	54	TOTAL	100	90
<i>S fredii</i>	1	1			
<i>S meliloti</i>	1	1			
<i>S medicae</i>	1	1			

3.3.2. Effet du pH sur la croissance des souches

En ce qui concerne la tolérance à l'acidité et à l'alcalinisation du milieu, la majorité des souches ont pu croître normalement dans une plage de pH allant de 5 à 8. Seules quelques souches (7/92) n'ont pas pu tolérer pH 5. Frioni *et al.* (2001) ont mentionné des souches qui tolèrent un pH de 4.4 ce qui est en contradiction avec les travaux de Sajnaga *et al.*(2001) ; Ulrich *et al.* (2000), Chen *et al.* (2001),Maâtallah *et al.* (2002a ; 2001b), Kishinevsky *et al.* (2003) qui considèrent comme limite le pH de 5 à 5,5.

Tab. 7 : Comparaison de la croissance des souches à différents niveaux de pH

Croissance	PH5	PH6	PH7	PH8	Pourcentage	PH5	PH6	PH7	PH8
<i>M intertexta</i>	14	15	15	15	<i>M intertexta</i>	93	100	100	100
<i>M ciliaris</i>	20	21	21	21	<i>M ciliaris</i>	95	100	100	100
prospection	34	36	36	36	prospection	94	100	100	100
<i>M granadensis</i>	30	30	30	30	<i>M granadensis</i>	100	100	100	100
<i>M muricoleptis</i>	19	24	24	24	<i>M muricoleptis</i>	79	100	100	100
piégeage	49	54	54	54	piégeage	91	100	100	100
TOTAL	83	90	90	90	TOTAL	92	100	100	100
<i>S fredii</i>	1	1	1	1					
<i>S meliloti</i>	1	1	1	1					
<i>S medicae</i>	1	1	1	1					

Avoir des souches qui ont un comportement intéressant vis à vis du pH, est un avantage, pour la mise en place d'inoculant pour les sols acides ; Vargas et Graham (1989) ont mis en évidence la corrélation qui existe entre le niveau de tolérance des rhizobia au pH acide et leur capacités à noduler en sols acides.

3.3.3. Résistance à la salinité

Les souches étudiées ont révélé un comportement assez intéressant par rapport au stress salin. Plus de 57% d'entre-elles se sont développées à 0,5M de NaCl (51 souches/90), un niveau de salinité considéré comme relativement élevé (Sajnaga *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2002 ; Maâtallah *et al.*, 2002a et 2002b ; Hungria *et al.*, 2001 ; Frioni *et al.*, 2001 ; Kishinevsky *et al.*, 2003 ; Safronova *et al.*, 2004). Parmi ces dernières, 22 confirment cette tendance et se sont révélées capables de croître en présence de 1M de NaCl et dont 12 capables de maintenir leurs capacités prolifératives à 1,5 M NaCl (Tab. 8). Les 51 souches issues des piégeages réalisées sur le sol de l'INA avec des plants de *M. granadensis* et *M. merucoleptis* semblent relativement moins tolérantes que les souches issues des prospections. En effet, seules 7 souches parmi elles (14%) se sont révélées capables de tolérer 1M de NaCl contre 20 souches (55%) parmi celles issues de la prospection. Ceci peut être attribué à l'origine des souches, car la majorité des souches prospection proviennent d'étage bioclimatique semi-aride donc souvent soumises à des pressions de sélection par rapport au stress hydrique, et donc salin par concentration des sels dans la matrice, contrairement aux souches issues de la station INA où le climat est plus clément.

La salinisation du sol est un facteur limitant en Algérie ; trouver des souches tolérantes à ce phénomène est un facteur à prendre en considération chez nous, pour les légumineuses. Le stress salin interfère dans l'établissement de la symbiose en affectant le processus d'infection (Singleton *et al.*, 1982) ; les légumineuses et le processus de nodulation sont sensibles au stress osmotique.

Tab. 8 : Effet de la salinité sur la croissance des souches

Croissance	NaCl 0M	NaCl 0,5M	NaCl 1M	NaCl 1,5M	Pourcentage	NaCl 0M	NaCl 0,5M	NaCl 1M	NaCl 1,5M
<i>M intertexta</i>	15	13	8	5	<i>M intertexta</i>	100	87	53	33
<i>M ciliaris</i>	21	18	11	1	<i>M ciliaris</i>	100	86	52	4,8
prospection	36	31	19	6	prospection	100	86	53	17
<i>M granadensis</i>	30	14	2	4	<i>M granadensis</i>	100	47	6,7	13
<i>M muricoleptis</i>	24	6	1	2	<i>M muricoleptis</i>	100	25	4,2	8,3
piégeage	54	20	3	6	piégeage	100	37	5,6	11
TOTAL	90	51	22	12	TOTAL	100	57	24	13
<i>S fredii</i>	1	0	0	0					
<i>S meliloti</i>	1	0	0	0					
<i>S medicae</i>	1	0	0	0					

3.3.4. Résistance au stress hydrique

Près de 28% (25/90) des souches examinées ont pu croître à 0.05% de PEG6000. Les résultats obtenus ne montrent pas dans ce cas de différence de comportement des

souches piégeage et des souches prospection vis à vis de la contrainte hydrique (Tab. 9).

La comparaison des niveaux de tolérance des souches à la salinité (NaCl) et au déficit hydrique (PEG6000) indique que ces deux caractères ne sont pas corrélés et ce en accord avec les données de la littérature.

Le phénogramme (Fig. 6) montre l'individualité des souches DZ44, AUS95.1 et DZ44, AUS97.1.4., car elles se positionnent sur un cluster **(A)** à 0,7 de similarité des autres souches analysées ; le reste des souches se répartissent sur deux phénons, le **(B)** constitué essentiellement des souches de *M. intertexta* et *M. ciliaris*, mais comportant une branche très hétérogène à 0.8 de similarité, et le phénon **(C)** constitué, à trois souches près, de souches de *M. granadensis* et *M. muricoleptis*.

3.3.5. Métabolisation des hydrates de carbonés

Les souches testées, comme reconnues chez les rhizobia par différents auteurs (Stowers et Eaglesham, 1984 ; Sajnaga et al 2001 ; Buendia-Claveria et al., 1989 ; De Lajudie et al., 1994; Novikova et al., 1994 ; Rodriguez-Navarro et al., 1996 ; Chen et al 1988 ; Chen et al., 2001 ; Chen et al 2002 ; Maâtallah et al., 2002a, 2002b ; Hungria et al., 2001 ; Frioni et al., 2001 ; Kishinevsky et al., 2003 ; Safronova et al., 2004), utilisent une large gamme de substrats carbonés, incluant des polyols, des mono, di et polysaccharides. Pratiquement tous les substrats énergétiques, à quelques souches près, sont utilisés par nos rhizobia.

L'utilisation des tests microplaques avec un milieu liquide a permis de montrer la variabilité de la collection, en mettant en évidence la multitude des voies de métabolisation, par la nature alcaline, neutre ou basique, des rejets cellulaires, pour un grand nombre d'éléments, et individuellement parlant.

3.3.5.1. Mono et Disaccharides

Pratiquement, tous les substrats simples sont métabolisés par nos souches, exception faite du Mésoérythritol qui n'a été métabolisé que par environ la moitié (52%) des souches ; des souches issues de la prospection ce sont montrées moins performantes, car 25% d'entre elles ont pu croître en utilisant cette source de carbone, contre 70% pour les souches issues du piégeage.

Ce qu'on peut déduire en ce qui concerne le comportement de ces souches, c'est qu'en général, elles ont plus une tendance acidifiante qu'alcalinisante lorsqu'il s'agit des monosaccharides, ceci dit, cette dernière voie n'est pas à négliger, exemple du xylose et le galactose où 40% des souches sont alcalinisantes, de même pour le mannose qui est métabolisé par une forte proportion de souches de même nature (33%).

Lorsqu'il s'agit de disaccharides, le penchant est inverse, les souches adoptent plus une voie métabolique à tendance alcalinisante qu'acidifiante.

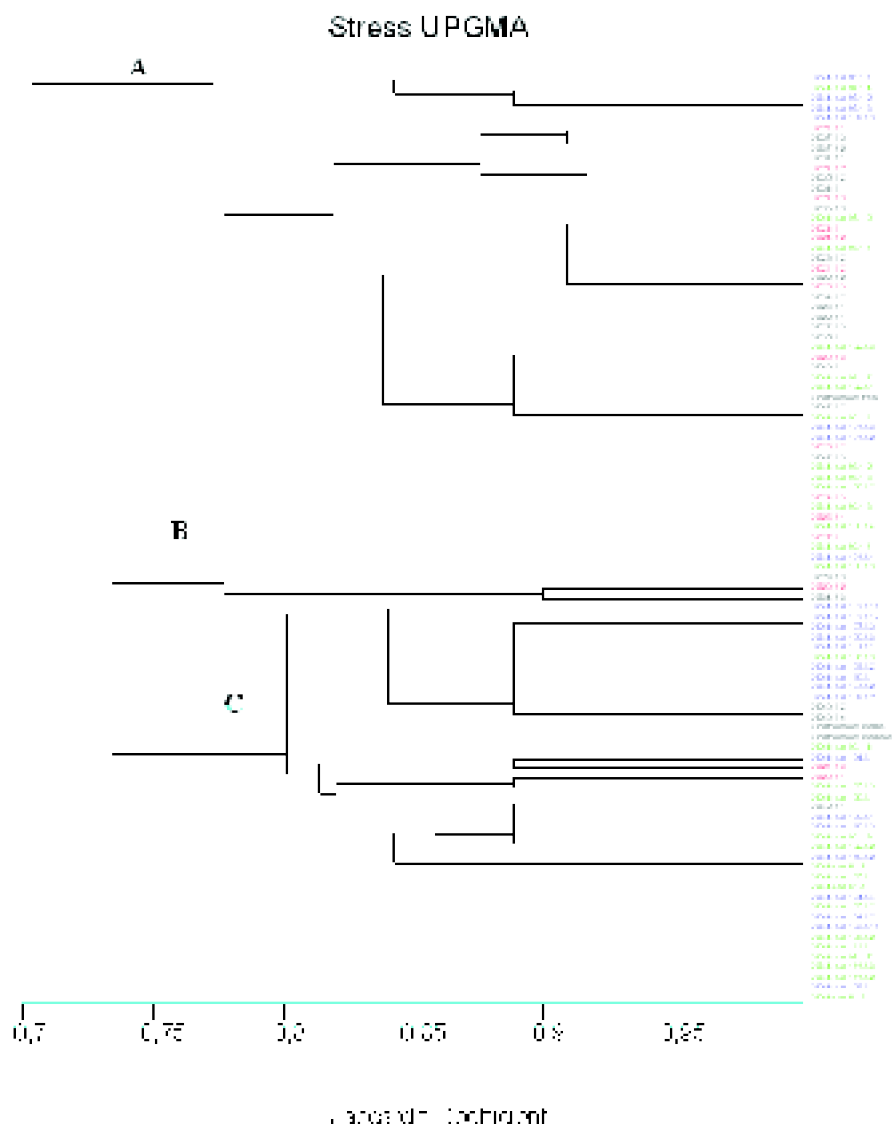


Fig. 6 : Phénogramme basé sur le comportement des souches vis à vis du stress hydrique et salin

3.3.5.2. Polysaccharides

De même pour les polysaccharides, la plupart des souches les utilisent comme source de carbone, le mélicitose est relativement moins utilisé que les autres (73% des souches l'utilisent) mais les souches piégeage ont tendance à être plus performantes que les souches prospectées. La tendance reste toujours, comme pour les disaccharides, vers une exsudation de nature alcaline, exemple de la cellulose ou 2 souches seulement sur les 90 testées ont acidifié leur substrat.

3.3.5.3. ACP hydrate de Carbone

Le plan 1-2 de l'ACP (Fig. 7), dont le pouvoir de discrimination est de 51%, montre

nettement l'homogénéité des souches issues de piégeage. Celles-ci forment un groupe compact, il s'oppose aux souches appartenant à *M. intertexta* et *M. ciliaris* par rapport à l'axe 2, qui est déterminé par les caractères : mésoérythriol, inositol acidifiant et alcalinisant, rhamnose alcalinisant et fructose acidifiant et alcalinisant. En effet, le comportement des souches est différent vis à vis de ces substrats, suivant qu'il appartient au groupe piégeage ou issue de prospection, exemple du mésoérythriol, qui est relativement bien utilisé par les souches piégeage, tandis que la plupart des souches prospection ne peuvent pas croître en sa présence. De même pour la nature des rejets cellulaires lors de l'utilisation de l'inositol, ils sont en ce qui concerne *M. muricoleptis* et *M. granadensis*, à trois souches près acidifiantes, alors que pour *M. intertexta* et *M. ciliaris* la tendance est plus vers une alcalinisation du milieu (61% des souches).

Le dendrogramme se subdivise en deux branches à un coefficient de similarité égale à 0.68, la branche **(A)**, constituée de souches indifféremment des quatre espèces étudiées, et de la branche **B** subdivisée en deux phénons (Fig. 8) :

-Le phénon **B1** constitué uniquement de souches appartenant à *M. intertexta* et *M. ciliaris*, alors que le phénon **B2** est constitué exclusivement de souches de *M. muricoleptis* et *M. granadensis*

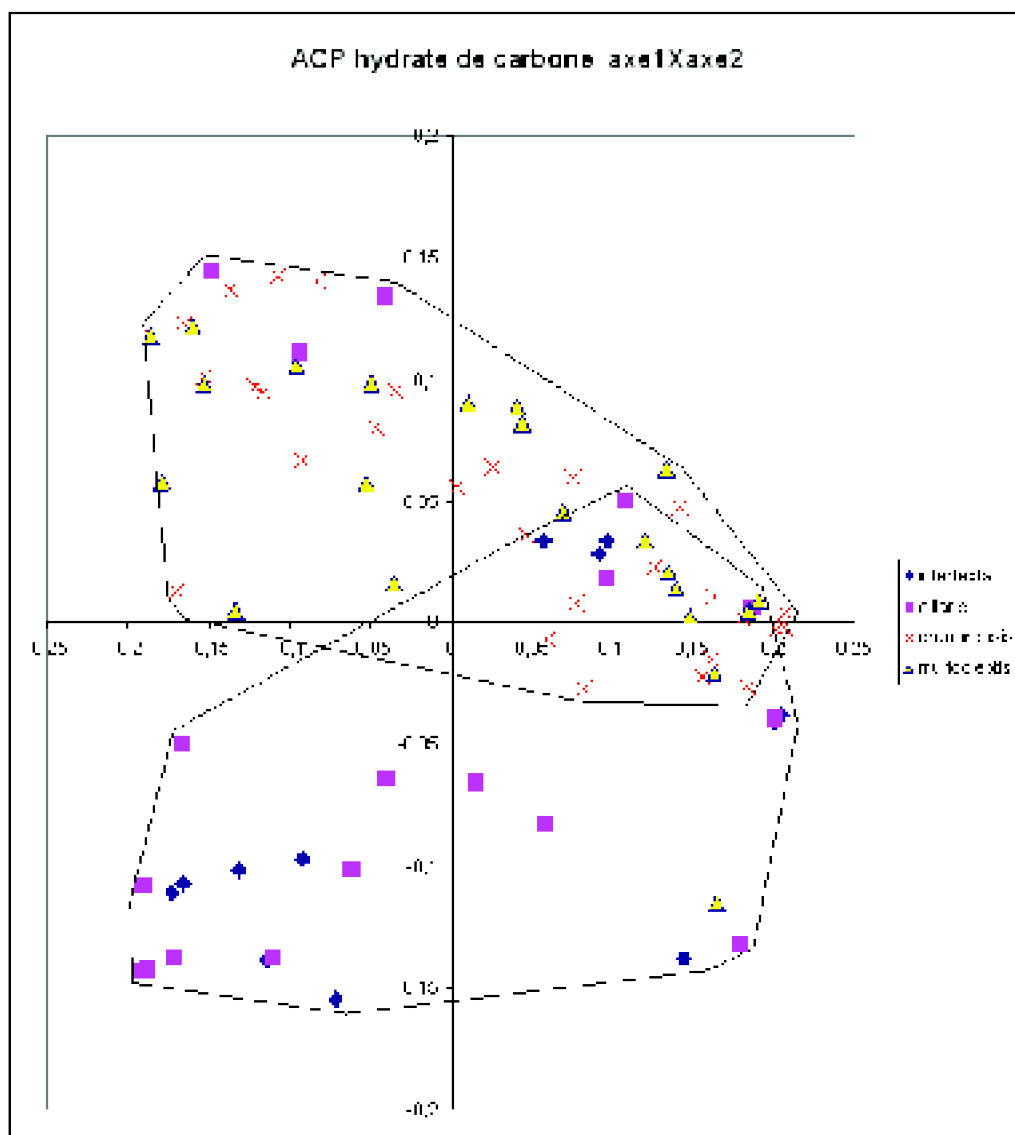


Fig. 7 : axe1 X axe2 de l'ACP basée sur le comportement des souches par rapport à la métabolisation des hydrates de carbone

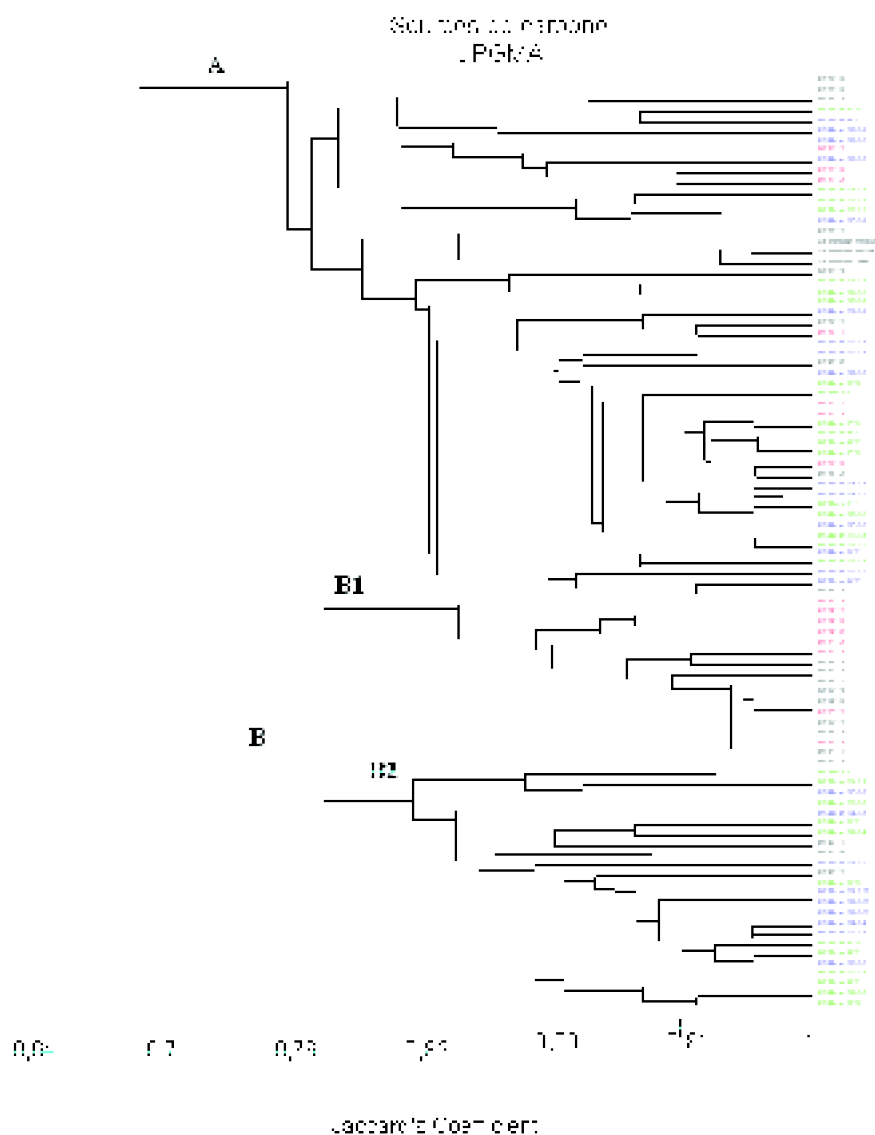


Fig. 8 : Phénogramme basé sur le comportement des souches vis-à-vis de la métabolisation des hydrates de carbone

3.3.6. Métabolisation des sources d'azote

Pratiquement, tous les substrats azotés testés sont métabolisés par nos souches (Tab. 10), le taux d'utilisation ne diffère pas des tests faits par Chen *et al.* (2001), Kishinevsky *et al.* (2003) et Safronova *et al.* (2004), que la source soit de nature minérale ou organique.

Tab. 10 : Métabolisation des sources d'azote par les souches testées

Caractérisation phénétique de souches de *Rhizobium* associées au groupe des Intertextae (Genre *Medicago*)

Pourcentage	Proline	Glycine	Ornithine	Acétyl glutamique	Phénylalanine	Histidine	Choline	Acétyl aspartique	Lysine	NH ₄	KNO ₂	Uréa	KNO ₃	NH ₄ NO ₃
prospection	83	56	97	83	100	97	78	72	72	83	83	89	89	97
<i>M. intertexta</i>	73	47	100	73	100	93	67	53	60	80	80	87	93	93
<i>M. ciliaris</i>	90	62	95	90	100	100	86	86	81	86	86	90	86	100
piégeage	81	91	83	87	100	85	67	100	89	94	85	74	67	93
<i>M. granadensis</i>	90	97	83	87	100	87	77	100	83	93	77	73	73	93
<i>M. muricoleptis</i>	71	83	83	88	100	83	54	100	96	96	96	75	58	92
TOTAL	82	77	89	86	100	90	71	89	82	90	84	80	76	94
<i>S. fredii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>S. meliloti</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>S. medicae</i>	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

3.3.6.1. Sources d'azote Organiques

Pour l'ensemble des souches, le taux d'utilisation de ces substrats varie de 71 à 100%, l'acide aminé (AA) qui est utilisé par toutes les souches sans exception, est le phénylalanine, et la source la moins utilisée est la choline.

Les souches issues de prospection semblent avoir des difficultés à utiliser certains AA, exemple de la glycine qui est utilisée par 77% des souches, mais 44% de souches prospection ne l'utilisent pas contre 9% seulement des souches issues de piégeage. De même pour l'Ac aspartique qui est relativement mal utilisé par ces souches, on constate que toutes les souches de *M. granadensis* et *M. muricoleptis* le métabolisent, alors que le taux d'utilisation de ce substrat pour les deux autres espèces (*M. ciliaris*, *M. intertexta*), est de 72%.

Au sein même de ce dernier groupe, *M. intertexta* semble avoir plus de difficulté à croître en présence de substrats azotés simples.

En effet, sauf pour l'ornithine, l'histidine et la phénylalanine, *M. intertexta* a le taux de métabolisation le plus faible des quatre espèces.

3.3.6.2. Sources d'azote minérales

Les sources d'azote minérales sont bien utilisées par nos souches. 76 à 94% des souches les emploient; les souches issues de piégeage semblent avoir plus de difficulté à métaboliser l'urée et le KNO₂ car ils ne sont utilisés que par 74% et 65% d'entre elles respectivement, et les souches de *M. granadensis* moins que *M. muricoleptis*.

3.3.6.3. ACP Source d'azote

L'ACP confirme les résultats obtenus ci-dessus ; le plan 1-2 (Fig. 9), qui fournit 38% de l'information, oppose les souches associées au groupe *M. ciliaris* *M. intertexta* aux autres souches, extrait de *M. granadensis* et *M. muricoleptis*, les deux groupes forment des nuages assez homogènes mais relativement éparés. C'est l'axe 2 qui nous permet de

mettre en évidence les différences entre les deux groupes de souches, qui ont un comportement différent par rapport aux caractères qui y contribuent ; ces caractères sont : la capacité à utiliser la glycine, l'ornitine, l'Ac glutamique, l'Ac aspartique, l'urée et le KNO_2 .

L'axe 1 représente la capacité des souches à métaboliser la proline, l'Ac glutamique, l'histidine, la choline, la lysine, l'urée, le KNO_2 et le NH_4NO_3 ; ce sont ces caractères qui, au sein des deux groupes, induisent une variabilité importante, non seulement au niveau inter groupes mais aussi entre les souches elles mêmes.

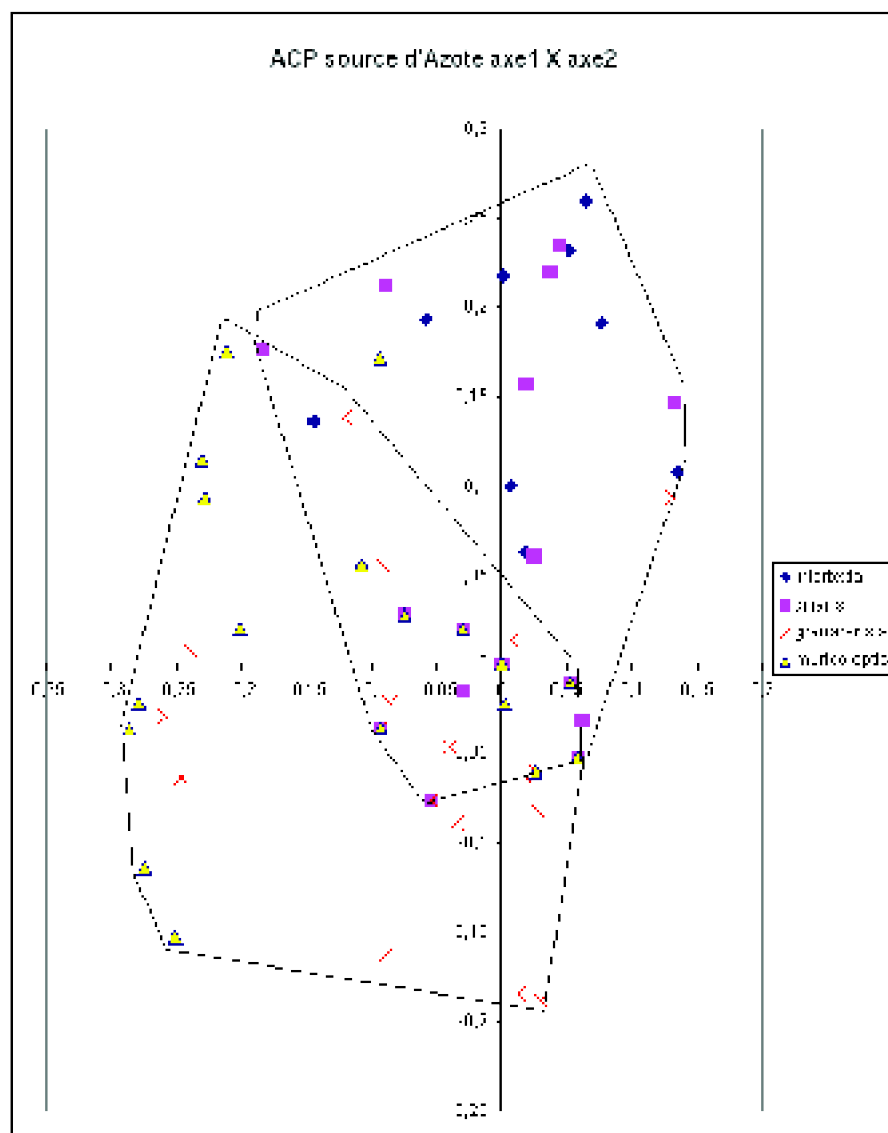


Fig. 9 : axe1 X axe2 de l'ACP basée sur le comportement des souches vis à vis de la métabolisation des sources d'azote

La souche DZ 21.1.1 confirme son individualité par rapport aux autres souches en se distinguant à 48% de similitude, le reste des souches se répartissent en deux groupes, le groupe (A) constitué exclusivement de souches issues de piégeage, et le cluster (B), qui se compose de la majorité des souches étudiées, et qui montre différents niveaux de

variabilité, le phénon est en escalier, les souches DZ20.1. et DZ21.1.1 et 3 figurent parmi les souches les plus hétérogènes, à partir du sous cluster (C) (à 82% de similitude), qui inclu nos souches de référence, on retrouve des phénons qui ont le même comportement par rapports aux caractères étudiés, et indifféremment que les souches soient issues de prospection ou de piégeage.

3.3.7. Agents antibactériens

3.3.7.1. Antibiotiques

Tab 11 : Effet des Agents antibactériens sur la croissance des souches (%)

Agent antibactérien	Chloramphénicol	Ampicilline	Rifomycine	Novobiocine	Tétracycline	Erythromycine	Baytrac	Énéricilline	Oxalidone	Spyramine	Sulfaméthoxazole	Kanamycine	Zinc	SE 4	MgCl ₂
<i>M. intertexta</i>	40	60	47	27	60	67	47	47	60	60	60	47	93	100	
<i>M. ciliaris</i>	43	76	76	43	71	86	71	62	90	100	100	95	95	100	
prospection	42	69	64	36	67	78	61	56	78	83	83	75	94	100	
<i>M. granadensis</i>	77	77	73	77	87	80	97	80	73	100	100	90	97	100	
<i>M. muricoleptis</i>	33	42	63	63	83	79	83	83	58	100	100	100	67	100	
piégeage	57	61	69	70	85	80	91	81	67	100	100	94	83	100	
TOTAL	51	64	67	57	78	79	79	71	71	93	93	87	88	100	
<i>S. fredii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>S. meliloti</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>S. medicae</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

Les souches étudiées montrent une assez bonne résistance aux antibiotiques, le moins toléré étant le chloramphénicol. Le pourcentage de souches qui se développent en sa présence est de 51%, mais parmi les souches étudiées, celles piégées par *M. granadensis* montrent un meilleur niveau de résistance qui est de 77%, alors que pour les 3 autres espèces, il ne dépasse pas 43% (Tab. 11).

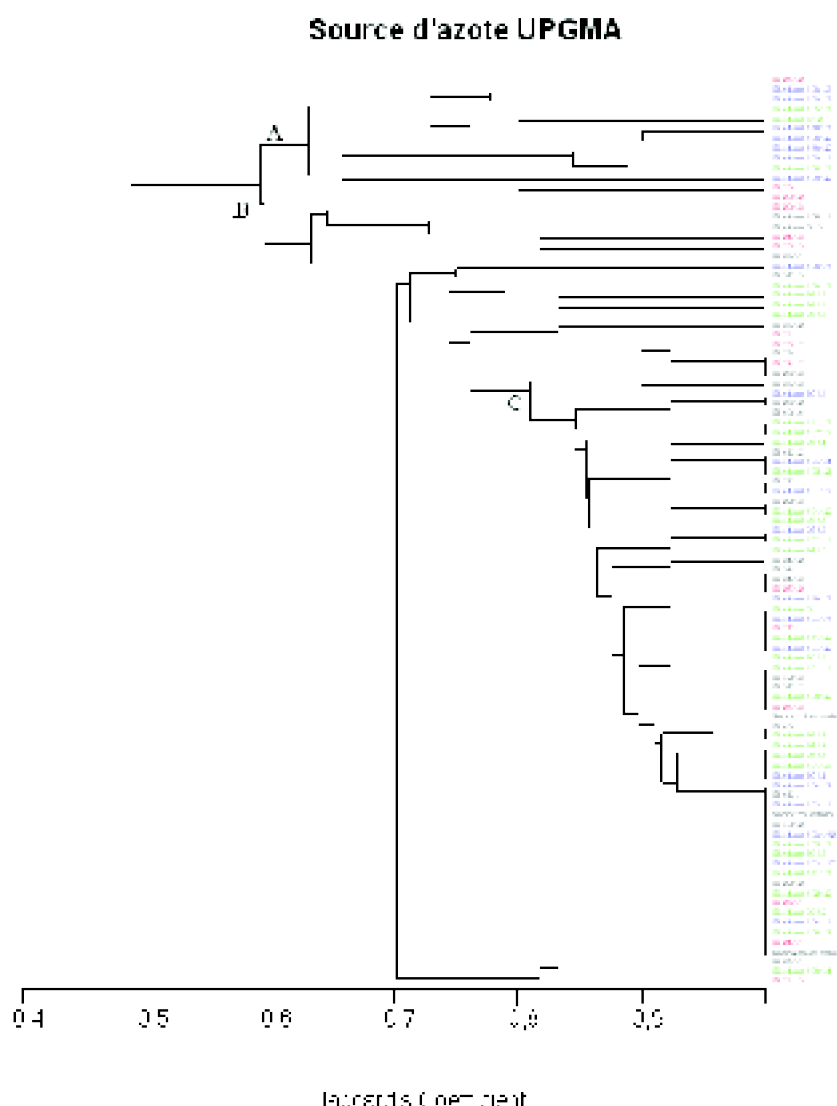


Fig. 10 : Phénogramme basé sur le comportement des souches vis à vis de la métabolisation des sources d'azote

Par contre les deux antibiotiques avec lesquels la plupart des souches s'accommodent sont la Spiramycine et les sulfamides (93%) ; le profil montre une corrélation parfaite entre ces deux agents, les mêmes souches sont résistantes aux deux antibiotiques.

La comparaison des deux groupes de souches, prospection et piégeage, donne un avantage à ce dernier, sauf pour l'ampicilline et l'oxaciline où les souches de prospection ont un léger avantage ; les souches piégeage se comportent mieux.

L'exemple de la novobiocine, où 70% de souches de piégeage se sont développées en sa présence alors que pour les souches de prospection 64% d'entre elles ont été inhibées ; au sein de ce groupe même, les souches de *M. ciliaris* montrent une plus grande résistance que celles de *M. intertexta*, par rapport à tous les antibiotiques testés.

La majorité des auteurs considèrent que l'antibiogramme est, en ce qui concerne les

caractères phénotypiques, l'outil le plus fin pour la caractérisation des souches bactériennes (Sajnaga et al 2001 ; 1989; Novikova *et al.*, 1994; Xavier *et al.* 1998 ; Chen *et al.* 1988 ; Chen *et al.* 2001 ; Chen *et al.* 2002 ;Castro *et al.* 2000 ;Maâtallah *et al.* 2002a ; Maâtallah *et al.* 2002b ; Hungria *et al.*,2001; Frioni *et al.*,2001; Safronova *et al.*, 2004), ceci est dû à leur potentiel intrinsèque à synthétiser ces éléments dits complexes.

3.3.7.2. ACP Antibiotiques

L'antibiogramme suggère une variabilité importante, autant inter qu'intra spécifique ; l'ACP confirme cette tendance, le plan 1-2 qui somme 47% **sur 56% du pouvoir discriminant des trois axes**, montre une désagrégation des groupes de souches, certes celles extraites de *M. granadensis* et *M. muricoleptis* restent regroupées, mais elles se disloquent par rapport aux autres types de caractères étudiés, et ne montrent pas de distinction nette, par rapport aux souches des autres espèces.

Le phénogramme montre aussi la tendance de distinguer des souches isolées des populations du site 21 de *M. intertexta* (Fig. 12), considérées comme particulières par Abdelguerfi-Laouar (2005), celles-ci se positionnent sur un cluster de deuxième niveau à 0.1 de similarité ; les souches de la population 20 montrent une plus grande diversité, car deux d'entre elles se situent sur un cluster de 1^{er} niveau à 0.05 de similarité, par rapport aux autres souches.

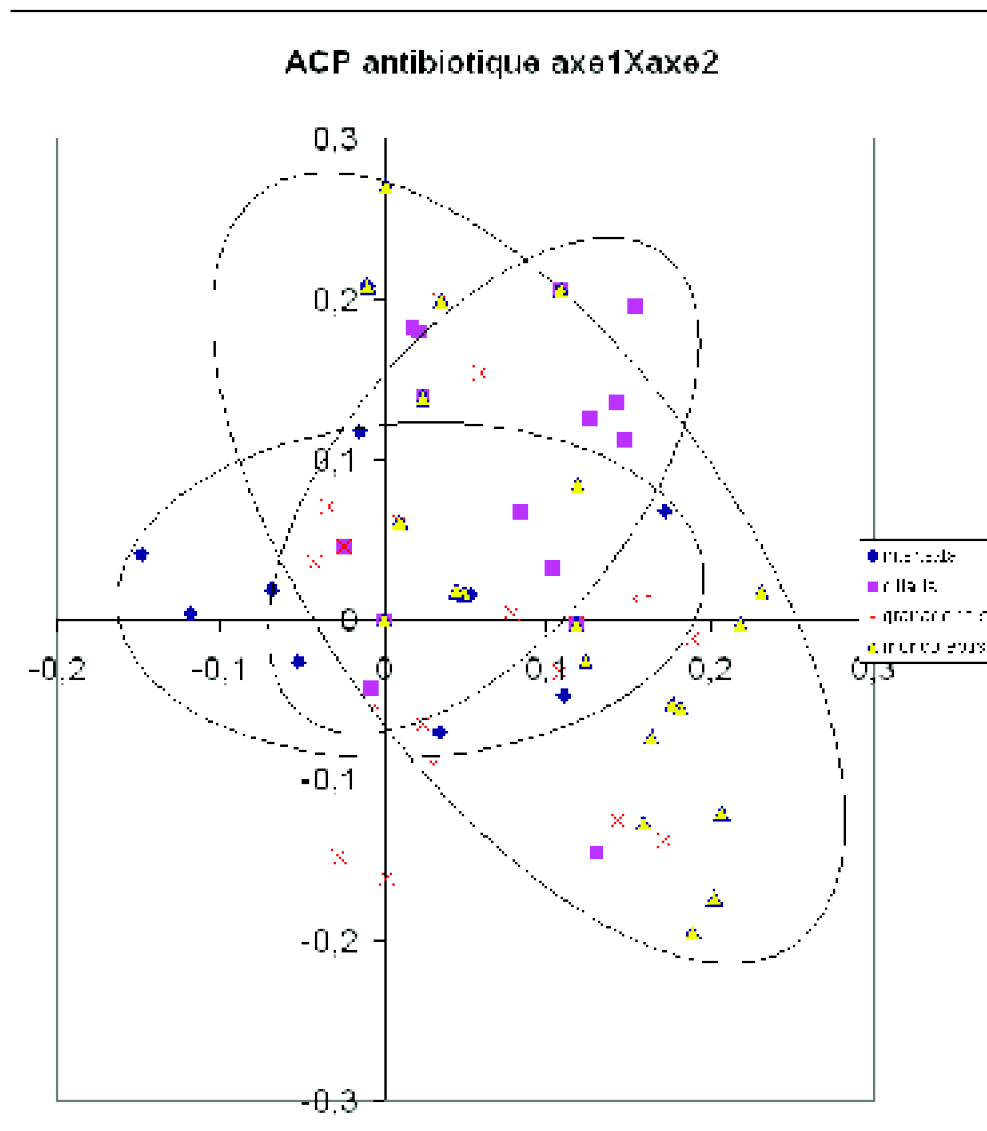


Fig. 11 : axe1 X axe2 de l'ACP basée sur le comportement des souches vis à vis des antibiotiques

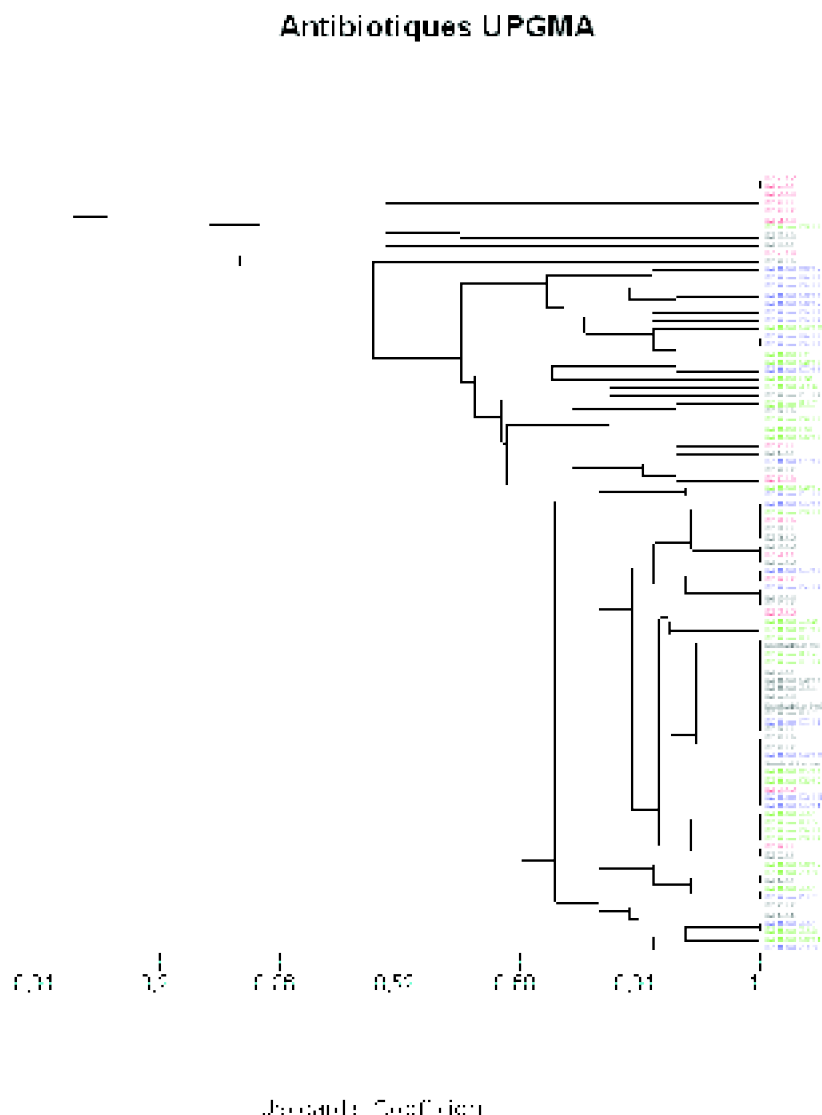


Fig. 12 : Phénogramme basé sur le comportement des souches vis à vis des antibiotiques

3.3.8. Résistance aux métaux lourds

Nos souches se sont bien comportées en présence des 4 éléments testés, à savoir le $ZnSO_4$, $MgCl_2$, $CuSO_4$, MoO_3 puisqu'elles ont toutes pu, à quelques souches près, se développer, aucune souche n'a eu de difficulté pour croître sur un milieu contenant du $MgCl_2$.

Les souches issues de *M. muriculoptis* sont les souches les moins tolérantes aux métaux lourds, car seulement 67% des souches ont pu résister au $ZnSO_4$, et 71% au $CuSO_4$, alors que pour les autres souches, plus de 80% des souches les tolèrent.

Pour le molybdène, ce sont les souches issues de *M. intertexta* qui s'en accommodent le moins.

Ces taux restent tout de même élevés par rapport aux données de la littérature

(Buendia-Claveria *et al.*, 1989 ; De Lajudie *et al.*, 1994 ; Novikova *et al.*; 1994 ; Rodriguez-Navarro *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 1988, 2002 ; Maâtallah *et al.*, 2002a, 2002b)

3.3.8. Aptitude à solubiliser les phosphates

L'activité phosphatasique est une caractéristique très appréciable chez les rhizobia et constitue un nouveau critère de sélection à intérêt agronomique, très recherché, en plus de la fixation azotée. Contrairement à Sajnaga *et al.* (2001) qui trouve qu'une faible proportion des souches isolées de *Sarothamnus scoparius* ont une activité phosphatasique, la majorité de nos souches possèdent cette faculté (Tab. 12).

Tab. 12 : Aptitude à solubiliser les phosphates des souches tester

	TOTAL	Local	<i>intertexta</i>	<i>ciliaris</i>	endémique	<i>granadensis</i>	<i>muricoleptis</i>	% TOTAL	% local	% <i>intertexta</i>	% <i>ciliaris</i>	% endémique	% <i>granadensis</i>	% <i>muricoleptis</i>
PHOSPHATASE	79	34	15	19	45	25	20	88	94	100	90	83	83	83

Toutes les souches extraites de *M. intertexta* ont cette capacité, et 90% des souches de *M. ciliaris* sont phosphatases positives.

Chez *M. granadensis* et *M. muricoleptis* le nombre de souches intéressantes est relativement moins important que chez le premier groupe, mais tout aussi appréciable, car 83% d'entre elles possèdent cette caractéristique.

Il n'a malheureusement pas été possible de comparer cette prévalence avec celles rapportées par d'autres auteurs car si on s'entend pour considérer les Rhizobia comme les BSP parmi les plus intéressantes, nous n'avons pas trouvé de documentation relative à la prévalence de l'activité phosphatasique chez ce groupe bactérien.

Cette prévalence élevée de l'activité phosphatasique chez les souches mises à notre disposition laisse indiquer que les Rhizobia, en raison de leur importance dans la rhizosphère des légumineuses et des non-légumineuses joueraient un rôle important dans la minéralisation du phosphore. C'est pour cette raison que de nombreuses équipes envisagent leur utilisation en tant qu'inoculant pour améliorer la nutrition en phosphore des plantes cultivées et réduire le recours aux engrais phosphatés dispendieux et polluants. Dans le cas précis des légumineuses, cette inoculation pourra avoir deux bénéfices, en ce sens que la souche inoculée améliorerait en même temps la nutrition azotée par fixation d'azote et la nutrition phosphore par la minéralisation des phosphates organiques. Ceci est d'autant plus intéressant que le phosphore est l'élément nutritif qui limite le plus l'ampleur de la fixation d'azote par les légumineuses (Hoffmann, 1968 ; Deng *et al.*, 1998).

3.4. Analyse générale

L'étude comparative des souches traitées, par rapport à toutes les variables en même temps, montre la très grande diversité des caractères étudiés. Ils ne permettent pas de disloquer les souches de références, mais leur hiérarchie reste semblable aux études faites par Chen *et al.*(2000), Zakhia *et al.*(2001), Young *et al.* (2001) et Abou Ndiaye(2002), utilisant différentes méthodes telle que l'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE), l'étude du gène 16S ARN et l'hybridation ADN-ADN.

A une distance de 0,62, le dendrogramme nous permet de séparer 2 groupes distincts (Fig. 13) :

- Le premier cluster se compose de six souches provenant des populations de *M. intertexta* de site 21 et 20, ces souches sont très proches de par leurs caractères et étage bioclimatique. Les souches DZ20.1, 2 et 3 ont été extraites à partir d'une population considérée par Abdelguerfi-Laouar (2005) comme particulière, à cause de ces caractéristiques symbiotiques différentes, car parmi toutes celles de la section de *Intertextae* testées par Abdelguerfi-Laouar (2005), elles seules étaient capable de noduler et de fixer l'azote, en présence de *M. meliloti* ;

- Le second cluster, qui est constitué par la plupart des souches étudiées, et qui englobe le phénon constitué par les souches de références, nous montre la grande variabilité qui existe entre elles, n'empêche qu'à des distances de similitudes relativement moyennes (entre 0.68 et 0,80) on retrouve des agglomérations de souches, dont le caractère distinctif direct est la plante hôte d'origine.

Le groupe **A**, qui se sépare du **B** à 0,65 de similitude, est constitué de trois souches hétérogènes. Le groupe **B** est formé par plusieurs phénons : le phénon **B1** qui, à trois souches près, est constitué de souches isolées de *M. muriculoptis*, se sépare du **B2** à 0.68 de similitude, ce dernier nous donne des sous-clusters plus ou moins homogènes ; le **D1** et le **E2** sont essentiellement des souches issues de *M. granadensis*, ce dernier phénon regroupe les souches de références étudiées, en plus du groupe **C** qui inclu autant de souches de *M. intertexta* que de *M. ciliaris*.

La vue globale du phénogramme nous montre que :

- La spécificité symbiotique de ce groupe de souches ne réside pas qu'au niveau de la section des *Intertextae* (Provove 1994; Bena *et al.*, 1998), **mais au niveau** spécifique.

- Il sous entend aussi le rapprochement qui existe entre ces quatre espèces deux à deux *M. intertexta* et *M. ciliaris* d'un côté et *M. muriculoptis* et *M. granadensis*.

Le plan 1-2 de l'ACP qui fournit 30% de l'information (Fig. 14) confirme les résultats obtenus ci dessus, par rapport à l'axe 1 (20% sur 39% du pouvoir discriminant des trois axes) la variabilité intra spécifique s'exprime par une dispersion de toutes les souches sur un intervalle de dissimilitude de près de 50%.

Mais par rapport a l'axe 2, les groupes d'espèces sont apparents, les deux groupes de souches de *M intertexta* (A) et *ciliaris* (B) sont proches mais distincts, ceci dit, ils proviennent de sites et d'étages bioclimatiques différents, contrairement aux souches de *M. muricoleptis* et *granadensis*, qui ont été toutes piégées sur le site de la station INA, ce qui se traduit par une plus grande compacité du nuage de points, et une homogénéité des

souches des deux espèces.

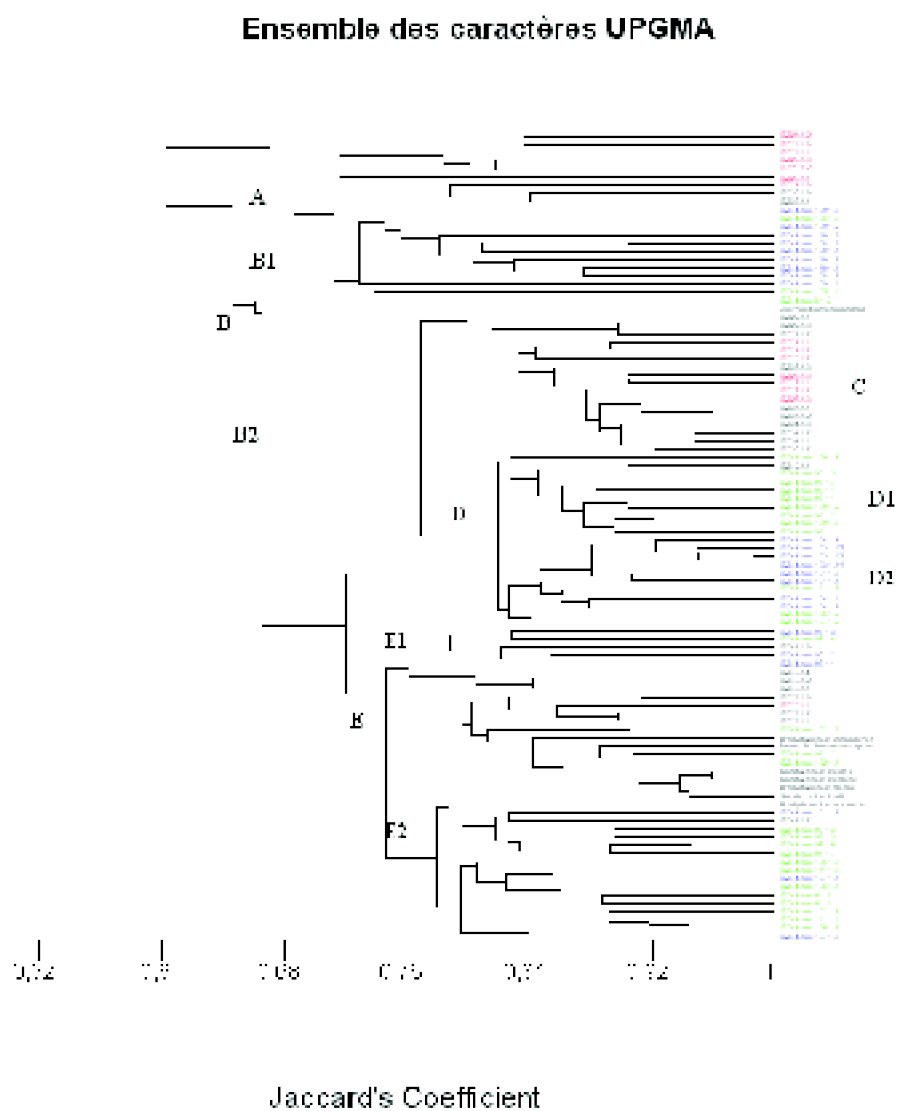


Fig. 13 : Phénogramme représentant la distribution des souches associées aux *Medicago* du groupe des *Intertextae* en tenant compte de l'ensemble des caractères étudiés

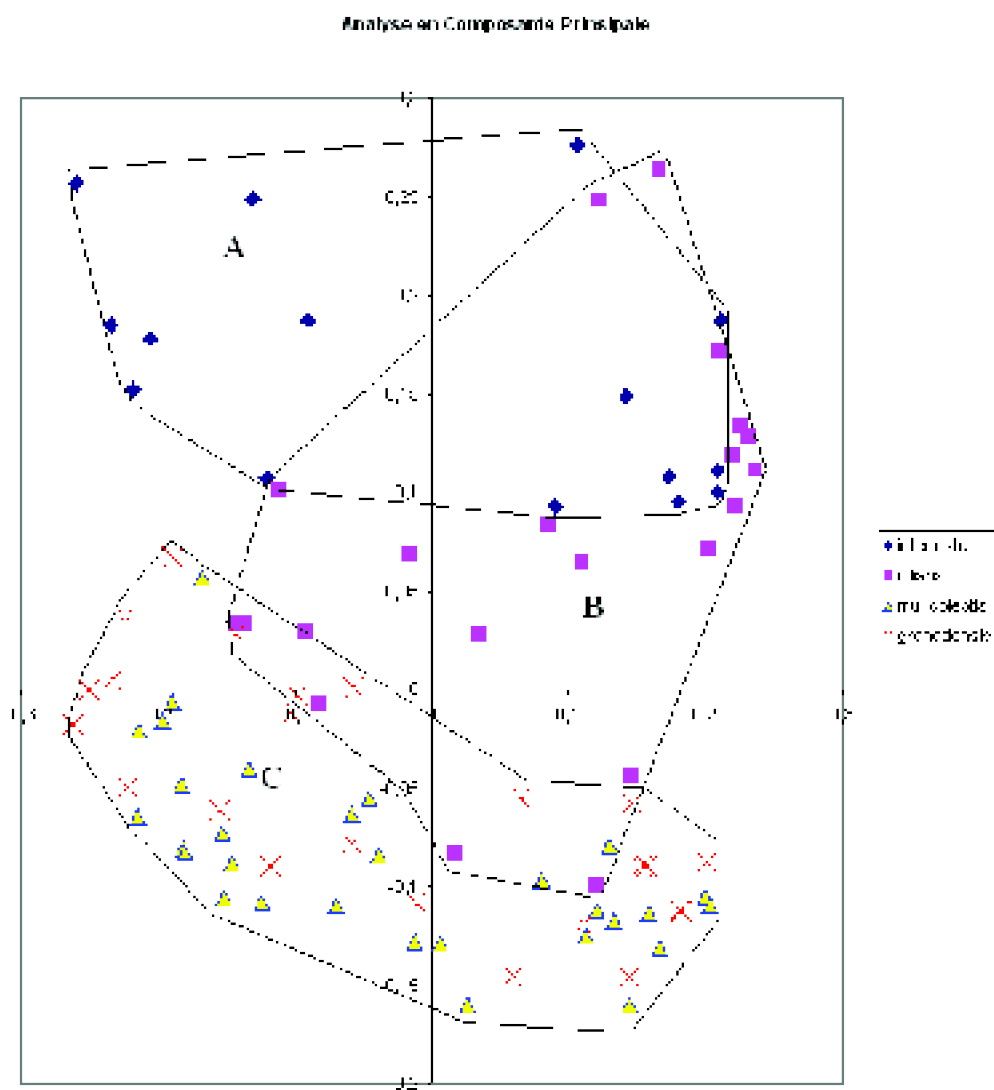


Fig. 14 : axe1 X axe2 de l'ACP réalisée sur l'ensemble des caractères étudiés.

Conclusion Générale

L'étude menée a montré la grande diversité qui existe entre les souches de rhizobia associées au *Medicago* de la section des *Intertextae* à différents niveaux de variabilité, au niveau de l'analyse de leur sol, de la plante hôte et du groupe de plantes hôtes (populations locales ou espèces étrangères).

Les sols d'origine ont, pour la plupart, un taux de matière organique relativement bon, mais faiblement fourni en azote et en phosphore, avec un taux de calcaire variable, et une faible salinité.

La méthode de conservation en gélose profonde s'est révélée très efficace, 94.1% des souches se sont développées, après un stockage de deux ans à température ambiante ; tenant compte de son coût relativement faible et de sa simplicité, elle constitue une alternative aux autres techniques onéreuses, mais nullement plus efficaces, et surtout ne nécessitant pas de structures de stockage particulières ; on peut minimiser les pertes en augmentant le nombre de répétitions.

Les souches piégées par *M. granadensis* et *M. muricoleptis* se différencient nettement des souches issues de *M. ciliaris* et *M. intertexta* par rapport à différents caractères :

- Les souches issues de prospection semblent plus tolérantes à la salinité et aux différents stress en général, tel que le stress thermique et hydrique, mais ces paramètres ne semblent pas être corrélés entre eux, et leurs différences semblent le plus liées à l'étage bioclimatique dont proviennent la plupart des souches de prospection (semi aride)

- La différence entre les deux groupes apparaît aussi au niveau de l'utilisation des différents éléments carbonés et azotés, car même si les souches ne trouvent pas de difficultés à métaboliser la majorité de ces substrats, la différence par rapport à la nature des rejets cellulaires, acides ou alcalins, expriment des voies de métabolisation différentes, qui ont plus tendance à être acidifiantes pour les souches de piégeage, alors que pour les souches de prospection la voie alcaline est plus fréquente.

Les souches issues de *M. muricoleptis* et *granadensis* ont plus de potentiel à utiliser différents substrats azotés tel que la glycine et l'A_C aspartique que celles des deux autres espèces, mais en plus les souches de *M. intertexta* ont de grandes difficultés à utiliser un grand nombre de substrats simples.

Les agents antibactériens sont considérés comme un moyen efficace d'étude de la diversité des souches bactériennes, par rapport à ces facteurs, on a constaté une grande variabilité autant au niveau inter qu'intra spécifique.

Les souches testées ont montré une grande diversité exprimant un potentiel adaptatif intéressant.

Certes, les modèles de comparaison expérimentaux et bibliographiques utilisés proviennent de différentes espèces cultivées et non de populations spontanées, comme c'est le cas de nos souches, mais elles présentent, dans l'ensemble, des caractères de résistance aux stress physiochimiques nettement supérieurs. Leur grande capacité à solubiliser les phosphates organiques est un atout supplémentaire chez les légumineuses, pour leur choix dans le cadre du développement d'inoculant à double intérêt agronomique.

Références Bibliographiques

- Abdelguerfi-Laouar M. (2005)** : Diversité Eco-Génétique des Fabacées et de leurs Symbiotes : Cas de la Section des *Intertextae* du Genre *Medicago* L. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, INA Alger, 1-186 et Annexes.
- Abou Ndiaye A., Ndao Sylla S., Gueye M., De Lajudie P. et Ndoye I. (2002)** : Utilisation de la technique d'électrophorèse de protéines sur gel de polyacrilamide-SDS (SDS-PAGE): pour l'étude de la diversité des Rhizobium d'*Acacia tortilis* (Forsk.)Hayne Subsp. *raddiana* (SAVI): Brenan; *African Journal of Science and Technology (AJST): Science and Engineering Series* Vol. 3, N°1 :33-43.
- Allen O.N. et Allen E.K. (1981)** : *The Leguminosae. A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation*, Univ. of Wisconsin Press.
- Aubert G. (1978)**: Méthode d'analyse des sols. CRDP Marseille, 191p.
- Bena G., Propseri J-M., Lejeune B. et Olivieri I. (1998)**: Evolution of annual species of the genus *Medicago* : A molecular phylogenetic approach. *Mol. Phylo. and Evol.*, 9 (3): 552-55.
- Bladergroen G.V. et Spaink H.P. (1998)**: Genes and signal molecules involved in the *Rhizobia-leguminosea* Symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4:353-359.
- Broughton W.J. et Perret X. (1999)**: Genealogy of legume. *Rhizobium* symbioses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:305-311.
- Buendía-Clavería A. M., Chamber M. et Ruiz-Sainz J. E. (1989)**: A comparative study

- of the physiological characteristics, plasmid content and symbiotic properties of different *Rhizobium fredii* in European soils. *Syst. Appl. Bacteriol.* **17**: 155–160.
- Castro S., Carrera I. et Martýnez-Drets G. (2000):** Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains using melanin production as a marker. *Journal of Microbiological Methods* **41**:173–177.
- Cermola M., Fedorova E., Tat R., Riccio A., Favre R. et Patriarca E.J. (2000):** Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli* *Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**:733–741.
- Chen L.S., Hungria M., Figueredo A., Villani H., et Michajluk J. (2002):** Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. *Biology and Fertility of Soils* **35**:448-457.
- Chen LS., Figueredo A., Pedrosa F.O., Hungria M. (2000):** Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. *Appl. Environ. Microbiol* **66**:5099–5103.
- Chen W.X., Yan G.H. et Li J.L. (1988):**Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium gen. nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**:392–397.
- Chen W.M., Laevens S., Lee T.M., Coenye T., De Vos P., Mergeay M. et Vandamme P. (2001):** *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient , *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51** :1729–1735.
- 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.
- Dénarié J., et Cullimore J. (1993):** Lipo-oligosaccharide nodulation factors: A new class of signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* **74** :951-954.
- Deng S.P., Summers M., Kahn M.L., McDermott T.R. (1998):** Cloning and characterization of a *Rhizobium meliloti* non-specific acid phosphatase. *Arch. Microbiol.* **170**: 18–26.
- D uchaufour P. (1970):** Précis de pédologie. Paris, Masson & Cie, 481 p.
- E Ikan G.H. (1992):** Taxonomy of the *Rhizobia*. *Can. J. Microbiol.* **38**:446-450.
- Fischer, H.M. (1994):** Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. *Microbiological Reviews.* **58**: 352-386.
- Froni L., Rodriguez A., Meerhoff M. (2001):**Differentiation of rhizobia isolated from native legume trees in Uruguay. *Applied Soil Ecology* **16** :275–282.
- George M.L.C., Young J.P.W. et Borthakur D. (1994):** Genetic characterization of *Rhizobium* sp. strain TAL1145 that nodulates tree legumes. *Can J Microbiol* **40**: 208–215.
- George M.L.C., Young J.P.W. et Borthakur D. (1994):** Genetic characterization of *Rhizobium* sp. strain TAL1145 that nodulates tree legumes. *Can J Microbiol* **40**:208–215.

- Gest H. (1999):** Bacterial classification and taxonomy : A “ primer” for the new millenium. *Microbiol. Today*, **26**:70-72.
- Geurts R. et Franssen H. (1996):**Signal transduction in *Rhizobium* induced nodule formation. *Plant Physiol.* **112**:447-453.
- Hill S. (1992):** Physiology of fixation in free-living heterotrophs. Dans: “ **Biological nitrogen fixation** ”. Stacey G., Burris R.H. et Evans H.J. (Eds.): Chapman et Hall, New York, pp. 169-257.
- Hoffmann G. (1968):** Phosphatases in the enzyme system of cultivated soils (in Germany): and possibilities of determining their activity. *Z. Pflanzenernähr.Dung. Bodenkd* **118**:153–160.
- Holmes B., Pinning C.A. et Dawson C.A. (1986):** A probability matrix for the identification of Gram-negative, aerobic, non-fermentative bacteria that grow on nutrient agar. *J. Gen. Microbiol.* **132** :1827-1842.
- Hungria M., Chueire M.D.O., Coca R.G., Megias M. (2001):** Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil ; *Soil Biology & Biochemistry* **33** :1349-1361.
- James C. (1997):** Progressing Public-Private Sector Partnerships in International Agricultural Research and Development. *ISAAA Briefs No. 4. ISAAA: Ithaca, NY.* 31p.
- Jarvis B.D.W., Van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M., Fernandez M.P., Cleyet-Marel J.C. et Gillis M. (1997):** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 895-898.
- Jordan D.C. (1984):** Family III *Rhizobiaceae* . Dans “ **Bergey’s manual of systematic bacteriology** ” 9ème édition, , Krieg N.R. et Holt J.C. (Eds.). Williams et Wilkins, Baltimore. vol. **1**: 234-244.
- Jordan P.M. (1994):** Highlights in haem biosynthesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **4**: 902-911.
- Kishinevsky B.D., Nandasena K.G., Yates R.J., Nemas C. et Howieson J.G. (2003):** Phenotypic and genetic diversity among rhizobia isolated from three *Hedysarum* species: *H. spinosissimum*, *H. coronarium* and *H. flexuosum*. *Plant and Soil* **251**: 143–153.
- Lindstrom K. (1995):** Numerical taxonomy as a tool for the classification of root-nodule bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:623-634.
- Lindström K. et Lehtomäki S. (1988):** Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*): compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiology Letters* **50** :277–287.
- Lindström K., Van Berkum P., Gillis M., Martine E., Novikova N. et Jarvis B. (1995):**in *Proc. 10th Int. Cong. Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications* (eds Tikhonovich, I. A. et al.): Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp:365–370.
- Lüttge U., Kluge M. et Bauer G. (2002) :** Botanique : Traité fondamental ; Edit. Lavoisier TEC & DOC ; 604p.
- Maâtalla J., Berraho E. B, Sanjuán J. et Lluch C. (2002 a):** Phenotypic

- characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*): growing in Moroccan soils ; *Agronomie* **22** :321–329.
- Maâtalla J., Berraho E. B., Muñoz S., Sanjuán J. et Lluch C. (2002 b)** : Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *J. Appl. Microbiol.* **93**:531-540.
- Manvika Sahgal et Johri B.N. (2003)**: The changing face of rhizobial systematics; *Current Science*, Vol. 84, N°1.
- Novikova N.I. (1994)**: Numerical taxonomy of *Rhizobium* strains from legumes of the temperate zone. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:734-737.
- Oke V. et Long S.R. (1999)**: Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:641-651.
- Pesenko Y.I. (1982)**: Principles and methods of quantitative analysis in faunistic investigations. Nauka, Moscow (en Russ). 287p.
- Polhill R.M. et Raven P.H. (eds): (1981)**: Advances in Legume. Systematics. Royal Botanic Gardens, Kew.
- P ostgate J.R. (1982)**: The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge University Press. 252 p.
- Provorov N.A. (1994)**: The interdependence between taxonomy of legumes and specificity of their interaction with rhizobia in relation to evolution of the symbiosis. *Symbiosis* **24**:183–200.
- Quezel P. et Santa L. (1962)**: Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS. 565p.
- Rodríguez-Navarro D.N., Ruiz-Sainz J.E., Buendía-Clavería A.M., Antamaría C., Balatti P.A., Krishnan H.B. et Pueppke S.G. (1996)**: Characterization of fast-growing rhizobia from nodulated soybean [*Glycine max* (L.): Merr.] in Vietnam. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**: 240-248.
- Safronova V.I., Piluzza G., Belimov A.A., et Bullitta S. (2004)**: Phenotypic and genotypic analysis of rhizobia isolated from pasture legumes native of Sardinia and Asinara Island. *Antonie Van Leeuwenhoek . International Journal of General and Molecular Microbiology* , **85**:115-127.
- Sajnaga E. et Malek W. (2001)**: Numerical Taxonomy of *Sarothamnus scoparius* Rhizobia; *Curr. T Microbiol.* Vol. 42: 26–31.
- Scholla M.H. et Elkan G.H. (1984)**: *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:484-486.
- Singleton P.W., El Swaify S.A. et Bohlool B.B. (1982)**: Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl. Environ. Microbiol.* **44** :884–890.
- S mibert R.M. et K rieg N.R. (1984)**: General characterization. Dans “Manual of methods for general bacteriology”, Gerhard P. (Ed.): American Society of Microbiology, Washington DC. pp: 409-443.
- 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.
- Sneath P.H.A. (1995)**: Thirty Years of Numerical Taxonomy. *Syst. Biol.* **44**:281-298.

-
- Somasegaran P. et Hoben H.J. (1994):** Handbook for rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium technology. Springer-Verlag, New York.: p 399.
- Stowers M.D., et Eaglesham A.R. (1984):** Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing *Rhizobium japonicum*. *Plant Soil* **77**:3-14.
- Streeter J. (1993):** Translocation – a key factor limiting the efficiency of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiol. Plantarum*, **87**: 616–623.
- Triplett E.W., Sadowsky M.J. (1992):** Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* **46** : 399-428.
- Truchet G., Promé J.C., et Dénarié J. (1993):** Symbioses bactéries-Légumineuses: un dialogue moléculaire. *La Recherche* **250** :92-94.
- Ulrich A. et Irmtraut Zaspel I. (2000):** Phylogenetic diversity of rhizobial strains nodulating *Robinia pseudoacacia* L. ; *Microbiology*. **146**: 2997–3005.
- Van De Sande K. et Bisseling T. (1997):** Signaling in symbiotic root nodule formation. *Essays Biochem.* **32**:127-142.
- Vargas, A.A.T. et Graham P.H. (1989):** Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. *Plant Soil* **117**:195-200.
- Verma D.P.S. (1992):** Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* **4**: 373-382.
- 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*. Dans: “ The prokaryotes ” Starr M.P., Stolp H., Balows A. et Schlege H.G. (Eds.): SpringerVerlag, New York. pp. 97-128.
- Vitousek P.M. et Matson P.A. (1993):** Agriculture, the global nitrogen cycle, and trace gas flux. Dans “**Biogeochemistry of Global Change, Radiatively Active Trace Gases** ”. New York: Chapman et Hall.
- Wang E.T. et Martinez-Romero E. (2000):** *Sesbania herbacea*-*Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. *Microbiol. Ecol.* **40**:25-32.
- Willems A. et Collins M.D. (1993):** Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:305–313.
- Xavier G.R., Martins L.M.V., Neves M. C.P. et Rumjanek N.G. (1998):** Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. *Biol Fertil Soils* **27** :386–392.
- Yanagi M. et Yamasato K. (1993):** Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* **107** :115–120.
- Young J.P., Downer H.L. et Eardly B.D. (1991):** Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173** (7):2271–2277.
- Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A. et Sawada H. (2001):** A revision of *Rhizobium* Frank (1889): with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn. 1942 and
-

Allorhizobium undicola De Lajudie et al. 1998 as new combinations: **Rhizobium radiobacter**, **R. rhizogenes**, **R. rubi**, **R. undicola** and **R. vitis**. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51 :89–103.

Zakhia F. et De Lajudie P. (2001): Taxonomy of rhizobia. *Agronomie* **21**: 569–576.

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture

Pour la culture et la conservation à court terme des souches de *Rhizobium*, nous avons utilisé le milieu Tryptone Yeast Extract dont la composition est la suivante :

<i>Tryptone</i>	5g
<i>Extrait de levure</i>	3g
<i>Eau distillée</i>	1000ml

Ajuster le pH à 7 avec KOH ou HCl N/10 - Stériliser à 120°C pendant 20mn

Avant utilisation rajouter 6ml/l de CaCl₂ (1M) stérile.

En plus du milieu TY, nous avons utilisé le milieu **Yeast Extract Mannitol** (YEM) (Vincent, 1970) qui est un milieu spécifique aux rhizobia.

Composition du milieu YEM

<i>Mannitol</i>	10g
<i>K₂HPO₄</i>	0.5g
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	0.2g
<i>Extrait de levure</i>	0.4g
<i>NaCl</i>	0.1g
<i>Eau distillée</i>	100ml

Ajuster le pH à 7 avec KOH ou HCl N/10 -Stériliser à 120°C pendant 20mn.

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" les versions solides par "Milieu YEMA", dans ce dernier cas le suffixe -CR (YEMA-CR) indiquera que le milieu est coloré par le rouge Congo.

Milieu de conservation

Le milieu utiliser pour la conservation des souches est le suivant :

<i>Glycérol</i>	600g
<i>Eau distillée</i>	100ml

Ce milieu est stérilisé à 120°C pendant 20mn

Annexe 2

The image shows a highly complex and dense grid table. The table consists of numerous columns and rows, with a grid of small dots or cells. A prominent vertical purple bar is located in the lower-middle section of the grid. Several vertical red dashed lines are also present, running through the grid. The overall appearance is that of a technical drawing or a highly detailed data table, possibly representing a coordinate system or a specific data layout. The text is very small and difficult to read, but the structure is clearly defined by the grid lines and the highlighted elements.

Annexe 2 (suite)

The table is extremely blurry and illegible. It appears to have multiple columns and rows, possibly representing a phylogenetic tree or a list of taxa with associated data. The text within the table is completely unreadable due to the low resolution and high contrast of the scan.

Annexe3

Epl	pH	CaCO ₃ (%)	C (%)	NO ₃ (%)	N (%)	K(mg/100g ss)	Ca(mg/cm ² , cm ²)	P (ppm)
1	8.63	0.0	13	2.0	0.05	1.1	0.20	0.020
2	8.68	21.1	24	4.1	0.08	0.9	0.25	0.025
3	8.71	14.1	18	3.7	0.03	0.7	0.31	0.314
4	8.4	0.0	13	2.0	0.05	1.0	0.22	0.024
5	8.28	13.0	18	3.7	0.10	1.3	0.45	0.238
6	8.04	10.7	23	3.7	0.13	1.7	0.52	0.188
7	8.28	14.2	24	4.1	0.13	1.4	0.40	0.148
8	8.28	13.9	27	4.8	0.13	1.0	0.41	0.220
9	8.23	8.5	21	3.7	0.10	1.6	1.10	0.781
10	8.32	10.0	21	3.7	0.09	1.3	0.40	0.417
11	8.27	22.4	16	3.7	0.04	2.1	0.65	0.448
12	8.2	17.4	13	3.3	0.11	1.4	0.28	0.218
13	8.15	0.0	16	2.7	0.09	1.5	0.40	0.244
14	7.73	18.5	45	7.8	0.17	0.7	0.27	0.253
15	7.81	4.4	37	6.4	0.14	0.9	0.35	0.412
16	8.43	14.8	21	3.7	0.09	0.8	0.30	0.313
17	7.63	8.7	29	5.0	0.10	0.4	0.20	0.258
18	7.31	10.7	24	4.1	0.13	0.5	1.38	0.178
19	8.27	6.1	0.0	1.4	0.05	0.9	0.10	0.214
20	8.33	3.0	0.0	1.4	0.05	0.4	0.10	0.207
21	8.11	1.5	33	7.3	0.27	0.4	0.21	0.255
22	8.47	16.2	37	6.4	0.16	0.4	0.20	0.370
23	7.02	3.1	0.0	1.4	0.05	0.2	0.20	0.020
24	8.07	2.0	27	4.6	0.20	0.5	0.10	0.461
25	7.12	1.3	29	5.0	0.17	0.3	0.20	0.270
26	8.44	21.3	27	4.6	0.09	0.7	0.20	0.178
27	7.93	17.2	24	4.1	0.19	0.9	0.40	0.401
28	8.07	10.7	25	5.0	0.13	1.6	0.27	0.260
29	7.33	32.4	21	3.7	0.11	1.2	1.37	0.378
30	7.06	3.0	4.0	6.9	0.22	1.7	0.40	0.383
31	7.77	20.2	27	4.6	0.23	1.3	0.20	0.111
32	7.77	2.0	0.3	14.7	0.64	1.1	0.01	0.290
33	7.37	3.0	35	6.0	0.23	1.0	0.30	0.240
34	7.00	7.4	12	5.5	0.27	0.8	0.42	0.455
35	7.32	20.2	31	3.7	0.23	0.5	0.20	0.217
36	8.13	28.3	19.7	18.4	0.22	0.9	0.28	0.212
37	8.33	23.0	16	2.7	0.17	1.2	0.27	0.290
38	7.08	22.1	0.7	17.4	0.66	1.7	0.34	0.431
39	7.56	43.4	21	3.7	0.10	0.6	0.20	0.537
40	7.33	38.1	21	3.7	0.13	1.1	0.20	0.283
41	8.10	4.1	13	2.3	0.03	0.1	0.27	0.197
42	8.28	12.8	11	1.8	0.10	0.3	0.20	0.340
43	8.26	25.7	0.5	0.9	0.14	0.6	0.20	0.211
44	8.41	2.5	24	4.1	0.12	0.9	0.20	0.277

	N	C
Zone Prouve	-	4.1
Prouve	0.3 - 0.12	1 - 2
Moyen	0.12 - 0.08	2 - 4
Rishe	0.10 - 0.01	4.4
Zone rishe	4.00	-

Annexe 4

Caractérisation phénétique de souches de Rhizobium associées au groupe des Intertextae (Genre Medicago)

Répléation des souches			nombre de colonies regroupées (test de confirmation) par site																	manuscrite			
N°	Souche	date	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		18	19	20
1	DZ 20.1.de1a10	21/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
2	UZ 21.1.de1a10	22/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
3	DZ 22.1.de1a11	22/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	1/11
4	UZ 23.1.de1a10	22/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
5	DZ 24.1.de1a10	22/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	1/12
6	UZ 25.1.de1a10	22/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
7	DZ 27.1.de1a10	22/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	4/10
8	UZ 31.1.de1a10	25/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
9	DZ 32.1.de1a10	25/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
10	UZ 37.1.de1a10	25/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
11	DZ 40.1.de1a10	25/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
12	UZ 42.1.de1a10	25/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
13	DZ 44.aus 80.1.de1a10	25/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
14	DZ 44.aus 80.1.de1a10	25/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
15	DZ 44.aus 87.1.de1a10	25/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
16	DZ 44.aus 88.1.de1a10	27/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
17	DZ 44.aus 90.1.de1a10	27/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
18	DZ 44.aus 100.1.de1a10	27/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
19	DZ 44.aus 101.1.de1a10	27/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
20	DZ 44.aus 102.1.de1a10	27/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
21	DZ 44.aus 105.1.de1a10	27/8/04	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	10/10-25
22	DZ 44.aus 104.1.de1a10	28/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
23	DZ 44.aus 105.1.de1a10	27/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
24	DZ 44.aus 106.1.de1a10	28/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
25	UZ 44.aus 107.1.de1a10	27/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
26	DZ 44.aus 108.1.de1a10	28/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
27	UZ 44.aus 109.1.de1a10	27/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	1/10
28	DZ 44.aus 110.1.de1a10	28/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
29	UZ 44.aus 111.1.de1a10	28/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
30	DZ 44.aus 0.1.de1a10	28/8/04	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0
Total	299 -1							382	2295								5.5						17/259

- ✓ 1^{er} repiquage positif
- ✗ 2nd repiquage du variant
- ✗ la souche n'a pas poussé
- ✓ colonies contaminées
- ✓ possible contamination
- ✗ contamination