

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار- عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR- ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUEE



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

EN MICROBIOLOGIE

Option : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

THEME

Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées *Medicago littoralis* Rhode et *Melilotus indicus* (L.) All. présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla)

Présentée par : M^{elle} BABA ARBI Souad

Directeur de la thèse : M. CHEKIREB Djamel

Professeur Université d'Annaba

Membres de Jury :

Présidente : M^{me} GACEMI-KIRANE Djamilia

Professeur Université d'Annaba

Examineurs : M^{me} AOUN Leila

Professeur Université d'El-Taref

M. MERAD Tarek

Maître de Conférences Université d'Annaba

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Mes remerciements sont d'abord au "**DJEU**" le tout puissant, je le remercie pour toute l'aide et le courage qu'il m'a donné, pour sa présence continue qui m'a aidé à surmonter toutes les difficultés et l'endurance qu'il m'a fourni pour terminer ce travail.

J'adresse mon profond remerciement à Monsieur **CHEKIREB Djamel**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar Annaba, pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de diriger ce travail, pour ses recommandations et ses discussions perspicaces, aussi pour les orientations qui ont beaucoup enrichi mon travail et pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires au bon déroulement de cette recherche, ainsi pour sa compétence et sa gentillesse.

Mes très spéciaux remerciements reviennent à Madame **OUARTSI Akila**, Maître de Conférences à l'Université Badji Mokhtar Annaba, pour les conseils et les remarques critiques qui m'ont été bénéfiques pour la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier également Madame **QUATRINI Paola**, Professeur à l'Université de Palermo, Italie, qui m'a apporté des appuis dans la caractérisation génétique.

Mon appréciation et ma gratitude vont à Madame **GACEMI-KIRANE Djamila**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar Annaba, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Ma gratitude va aussi à Madame **AOUN Leila**, Professeur à l'Université d'El-Taref, pour avoir accepté de juger ce travail.

Ma gratitude va à Monsieur **MERAD Tarek**, Maître de Conférences à l'Université Badji Mokhtar Annaba, d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie également toutes mes amies pour leur soutien et leurs mots encourageants et pour leur amitié sincère.

Je remercie également les techniciennes du département de Biochimie : Adra et Sakina, ainsi que toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Finalemant, mon plus grand merci revient à mes parents et mes frères pour m'avoir permis d'en arriver là et pour leur soutien.

Résumé

Ce travail a été réalisé dans le but d'étudier la diversité des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées (*Melilotus indicus* (L.) All. et *Medicago littoralis* Rhode) des oasis de la région de Touggourt au sud-est algérien.

Nous avons purifié un total de 40 symbiotes isolées à partir des deux légumineuses étudiées (25 isolats de *Melilotus indicus* et 15 de *Medicago littoralis*).

L'étude des caractères phénotypiques montre que tous les isolats sont des rhizobia à croissance rapide, la majorité de ces isolats acidifient le milieu de culture et ne poussent pas sur milieu GPA.

Les isolats de *Melilotus* ont montré une forte aptitude à noduler leur plantes hôtes, par contre le nombre des nodules formés par les isolats de *Medicago* a été très faible.

L'étude de la tolérance aux différents stress abiotiques a montré que nos isolats peuvent supporter une gamme de pH entre 4.5 et 9, des températures jusqu'à 45°C, des fortes concentrations de NaCl (plus de 3 %) et des concentrations de PEG jusqu'à 25 %.

La totalité des isolats sont capables d'utiliser une large gamme de substrats, ils sont sensibles aux antibiotiques Kanamycine ; tétracycline et la rifampicine mais montrent une forte résistance à la néomycine ; l'érythromycine et l'acide nalidixique.

On se basant sur les caractères phénotypiques et symbiotiques, nous avons sélectionné six souches (MD05 ; MD09 et MD12 de la série de *Medicago* et ML08 ; ML17 et ML22 de la série de *Melilotus*) pour la caractérisation génotypique afin de déterminer leur position taxonomique.

L'analyse phylogénétique des souches sélectionnées basée sur le séquençage des gènes de l'ARNr 16S a montré l'affiliation de ces souches à *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *meliloti*.

Mots clés: Rhizobia, *Melilotus*, *Medicago*, sol oasien, phénotype, génotype.

Abstract

This work was conducted to study the diversity of rhizobia associated with spontaneous legumes (*Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All.) of Touggourt's oases in southeast Algeria.

A total of forty rhizobial isolates were isolated from the two legumes (25 isolates of *Melilotus indicus* and 15 isolates of *Medicago littoralis*).

The phenotypic characterization showed that all of isolates were fast-growing rhizobia; the majority of these isolates acidifies the culture medium and don't grow on GPA medium.

Melilotus isolates showed a high ability to nodulate their host plants against the low number of nodules formed by the isolates of *Medicago*.

The study of the tolerance to abiotic stress showed that our isolates tolerated a pH range between 4.5 and 9, temperatures to 45°C, high concentrations of NaCl (more to 3 %) and PEG concentrations to 25 %.

All isolates utilized a wide range of carbon sources, they were sensitive to the antibiotics kanamycin, tetracycline and rifampicin but showed resistance to neomycin and erythromycin.

On the basis of the phenotypic and symbiotic characters, we selected six strains (MD05, MD09, and MD12 from *Medicago* series, ML08, ML17 and ML22 from *Melilotus* series) for the genotypic characterization to determine their taxonomic position.

Phylogenetic analysis of the selected strains based on 16S ribosomal RNA gene showed that these strains were affiliated to the *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *meliloti*.

Keywords: Rhizobia, *Medicago*, *Melilotus*, oasis soil, phenotype, genotype.

ملخص

أجري هذا العمل لدراسة تنوع الريزوبيا المرتبطة مع البقوليات *Melilotus indicus* (L.) All و *Medicago littoralis* Rhode المحلية لوحدات منطقة تقرت جنوب شرق الجزائر.

لقد قمنا بتنقية ما مجموعه 40 عزلة من كلا البقوليات موضوع الدراسة : 25 عزلة من *Melilotus indicus* و 15 من *Medicago littoralis*.

أظهرت دراسة الصفات المظهرية أن جميع العزلات تنتمي الى مجموعة الريزوبيا سريعة النمو ، والغالبية من هذه العزلات يسبب خفض pH وسط النمو كما لا تنمو على الوسط GPA.

أظهرت عزلات ال *Melilotus* قدرة كبيرة على تشكيل العقد الجذرية لدى نباتاتها الاصلية على عكس عدد العقد المشكلة عن طريق عزلات ال *Medicago* و الذي كان ضعيفا جدا.

كما أظهرت دراسة قدرة احتمال تأثير عوامل الاجهاد اللاحيوية أن هذه العزلات قادرة على احتمال درجات من pH بين 4.5 و 9, حرارة تصل إلى 45 درجة مئوية، وتركيزات عالية من كلوريد الصوديوم (أكثر من 3 ٪)، و أيضا تركيزات من ال PEG ما يصل إلى 25 ٪.

جميع العزلات قادرة على استخدام مجموعة واسعة من المواد الكربونية، وهي حساسة للمضادات الحيوية كاناميسين. التتراسيكلين والريفامبيسين لكنها تظهر مقاومة عالية للنيومايسين. الاريثروميسين وحمض الناليديكسيك.

اعتمادا على الخصائص المظهرية والتكافلية، قمنا بانتقاء ستة سلالات: (MD05 ، MD09 و MD12 من مجموعة ال *Medicago* و ML08، ML17 و ML22 من مجموعة ال *Melilotus*) من أجل دراسة الصفات الوراثية بهدف تحديد موقعهم التصنيفي.

أظهر تحليل النشوء والتطور للسلالات المختارة على أساس التسلسل الجيني لل ARNr 16S أن هذه السلالات تنتمي الى *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*.

الكلمات المفتاحية: الريزوبيا، *Melilotus*، *Medicago*، تربة الواحات، النمط الظاهري، النمط الوراثي.

Liste des abréviations

FeMo	Protéine Fer-Molybdène.
Vert/ha	Matière verte/hectare (masse végétale)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture).
CPS	Capsular Polysaccharide.
LPS	Lipopolysaccharide.
EPS	Exopolysaccharide.
<i>nod, nol, noe</i>	Gènes impliqués dans le processus de nodulation.
Nod	Produit du gène de nodulation (facteur Nod).
<i>nif, fix</i>	Gènes impliqués dans le processus de fixation d'azote atmosphérique.
Nif, Fix	Les produits des gènes <i>nif</i> et <i>fix</i> .
End	Protéines des nodosités fixatrices d'azote.
RC	Rouge Congo.
BBT	Bleu de bromothymol.
BCP	Bromocresol purple.
PEG 4000	polyéthylène glycol à masse molaire moyenne de 4000 g/mol
v/v	Volume/volume.
p/v	Poids/volume.
ACP	Analyse en Composantes Principales.
CAH	Classification Ascendante Hiérarchique.
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Average.
PCR	Polymerase chain reaction.
NCBI	National Center for Biotechnology Information.
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool.

Liste des figures

Figure 1 : Cycle d'azote pour les écosystèmes terrestres.....	17
Figure 2 : Arbre phylogénétique basés sur les séquences de l'ADNr 16S des rhizobia appartenant aux sous classes α -, β - et γ - <i>Proteobacteria</i>	22
Figure 3 : Structure des flavonoïdes.....	29
Figure 4 : Structure et synthèse du squelette de base des facteurs Nod.....	31
Figure 5 : Mécanismes de nodulation chez les rhizobia.....	32
Figure 6 : Libération des rhizobia dans le cytosol de la cellule hôte.....	33
Figure 7 : Structure des nodules chez les légumineuses.....	35
Figure 8 : Mécanismes biochimiques impliqués dans la fixation d'azote.....	36
Figure 9 : Les composants de la nitrogénase.....	37
Figure 10 : Vallée de l'Oued Righ et site d'échantillonnage.....	40
Figure 11 : <i>Medicago littoralis</i> Rhode.....	64
Figure 12 : Gousses de <i>Medicago littoralis</i>	64
Figure 13 : Feuilles et fleurs de <i>Medicago littoralis</i>	64
Figure 14 : Système racinaire et nodules de <i>Medicago littoralis</i>	64
Figure 15 : <i>Melilotus indicus</i> (L.) All.	65
Figure 16 : Feuilles et fleurs de <i>Melilotus indicus</i>	65
Figure 17 : Gousses de <i>Melilotus indicus</i>	65
Figure 18 : Système racinaire et nodules de <i>Melilotus indicus</i>	65
Figure 19 : Croissance des isolats sur milieu YEMA additionné de BBT.....	70
Figure 20 : Croissance des isolats sur gélose à l'acétamide.....	73
Figure 21 : Photos des essais de nodulation en pots des plantes de <i>Medicago littoralis</i>	75
Figure 22 : Photos des nodules formés sur les racines de <i>Medicago littoralis</i>	75
Figure 23 : Photos des essais de nodulation en pots des plantes de <i>Melilotus indicus</i>	76
Figure 24 : Photos des nodules formés sur les racines de <i>Melilotus indicus</i>	76
Figure 25 : Nombre moyen des nodules formés par les isolats (série MD) en fonction du poids de la partie aérienne	77

Figure 26 : Nombre moyen des nodules formés par les isolats (série ML) en fonction du poids de la partie aérienne.....	78
Figure 27 : Infectivité et production de matière végétale des plantes de <i>Medicago ciliaris</i> inoculées par les isolats de <i>Melilotus indicus</i>	81
Figure 28 : Tolérance des isolats aux températures élevées.....	82
Figure 29 : Tolérance des isolats à la salinité.....	83
Figure 30a : ACP représente la relation entre la tolérance des isolats aux différentes concentrations de NaCl et la croissance à la température 28°C.....	85
Figure 30b : ACP représente la relation entre la tolérance des isolats aux différentes concentrations de NaCl et la croissance à la température 37°C.....	85
Figure 30c : ACP représente la relation entre la tolérance des isolats aux différentes concentrations de NaCl et la croissance à la température 40°C.....	86
Figure 30d : ACP représente la relation entre la tolérance des isolats aux différentes concentrations de NaCl et la croissance à la température 45°C.....	86
Figure 31 : Tolérance de nos isolats aux différentes valeurs de pH.....	88
Figure 32 : Croissance des isolats sur YEMA ajusté aux différents pH.....	89
Figure 33 : Tolérance des isolats en présence de différentes concentrations de PEG 4000.....	90
Figure 34 : Croissance des isolats sur YEMA en présence de différentes concentrations de PEG 4000.....	90
Figure 35 : Photos des résultats du test de 3-cétolactose.....	91
Figure 36 : Croissance des isolats en présence des disques d'ATB.....	92
Figure 37 : Croissance des isolats en présence des ATB (additionnées au milieu YEMA)	92
Figure 38 : Résistance intrinsèque des isolats aux antibiotiques testés.....	93
Figure 39 : Dendrogramme d'UPGMA basé sur les caractères phénotypiques montre les relations entre les isolats de <i>Medicago</i> et de <i>Melilotus</i>	103
Figure 40 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ARNr 16S par la méthode de <i>Maximum likelihood</i> montrant la relation entre nos isolats (ML08, ML17, ML22, MD05, MD09 et MD12) et les souches types des autres rhizobia.....	107

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractères physico-chimiques des eaux souterraines de la région d'Ouargla.....	7
Tableau 2 : Les espèces rhizobiennes symbiotiques des genres <i>Medicago</i> et <i>Melilotus</i>	23
Tableau 3 : Les espèces du genre <i>Ensifer</i>	24
Tableau 4 : Composition de la solution du Rouge Congo.....	44
Tableau 5 : Milieu de Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA)	44
Tableau 6 : Composition de la solution de Rigaud et Puppo (1975)	46
Tableau 7 : Composition de la solution stockée de Bleu de Bromothymol.....	50
Tableau 8 : Composition du milieu de Glucose Peptone Agar (GPA)	51
Tableau 9 : Solution de Bleu de Bromothymol (BCP)	51
Tableau 10 : Composition des solutions stockées des ATB.....	54
Tableau 11 : Composition du milieu Glucose nutritif Agar (GNA)	55
Tableau 12 : Composition du milieu gélose au lactose.....	56
Tableau 13 : Composition du réactif de Benedict.....	56
Tableau 14 : Composition du milieu Tryptone Yeast Agar (TYEA)	57
Tableau 15 : Composition de la solution de CaCl ₂ à 1M.....	57
Tableau 16 : Composition de milieu de culture pour API 50 CH.....	60
Tableau 17 : Les promoteurs de l'amplification et de séquençage.....	62
Tableau 18 : Nombre d'isolats obtenus à partir des nodules racinaires des légumineuses utilisées	66
Tableau 19 : Temps de croissance des souches isolées.....	67
Tableau 20 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats	68
Tableau 21 : Tests d'absorption de RC ; acidification/alcalinisation (BBT) et croissance sur milieu GPA.....	71
Tableau 22 : Croissance des isolats sur le milieu gélose l'acétamide.....	73
Tableau 23 : Résultats des tests conventionnels sur galeries API 20 NE	94

Tableau 24 : Résultats des tests d'assimilation sur API 20 NE.....	96
Tableau 25 : Résultats des tests d'assimilation sur API 50 CH.....	97
Tableau 26 : Résultats des tests d'assimilation sur API 50 CH des souches de références.....	101
Tableau 27 : Codes d'accès des séquences de l'ADNr 16S sur GenBank.....	105
Tableau 28 : Analyse des résultats du séquençage partiel des gènes d'ARNr 16S des isolats.....	106

Sommaire

Etude bibliographique

Introduction.....	1
Chapitre I : Aperçu sur l'écosystème des oasis sahariennes.....	4
1. Nature et caractères physiques, chimiques et biologiques des sols des palmeraies sahariennes.....	4
1.1. Caractères physiques.....	4
1.2. Caractères chimiques.....	5
1.3. Caractères biologiques.....	6
2. Aperçu sur l'environnement oasien.....	8
2.1. Définition de l'oasis.....	8
2.2. Particularité du microclimat oasienne.....	8
3. La flore des palmeraies sahariennes.....	9
4. Aperçu sur la culture dans les oasis.....	9
4.1. Arboriculture fruitière.....	9
4.2. Les principales espèces fourragères.....	10
Chapitre II : Les légumineuses.....	11
1. Généralités.....	11
1.1. Importance des légumineuses.....	11
1.2. Taxonomie	13
2. Le genre <i>Medicago</i>	13
2.1. Généralités.....	13
2.2. L'espèce <i>Medicago littoralis</i> Rhode	14
3. Le genre <i>Melilotus</i>	15
3.1. Généralités.....	15
3.2. L'espèce <i>Melilotus indicus</i> (L.) All.....	15
Chapitre III : Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique.....	17
1. Généralités.....	17
1.1. Les microorganismes fixateurs d'azote.....	17
2. La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique.....	18
2.1. Rhizobia	18

2.1.1. Caractères généraux des rhizobia.....	19
2.1.2. Taxonomie des rhizobia.....	20
2.2. Les rhizobia dans l'environnement aride.....	25
2.2.1. La sécheresse.....	25
2.2.2. La salinité.....	25
2.2.3. La température.....	27
2.3. Mécanisme de la symbiose légumineuse-rhizobia et la fixation d'azote.....	28
2.3.1. Spécificité d'hôte.....	28
2.3.2. Modulateurs de la symbiose.....	28
2.3.3. Etapes du processus de nodulation	31
2.3.4. Forme des nodules.....	34
2.3.5. Mécanisme moléculaire de fixation d'azote atmosphérique.....	35
2.3.6. L'activité fixatrice d'azote dans l'environnement aride.....	39

Etude expérimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes.....	40
1. Présentation de la région d'étude.....	40
1.1. Nature du sol.....	41
1.2. Site d'échantillonnage.....	42
2. Matériel utilisés.....	42
2.1. Matériel biologiques.....	42
2.2. Milieux de culture.....	42
2.3. Matériel.....	42
2.3.1. Principaux appareils.....	42
2.3.2. Colorants réactifs et autres.....	42
3. Méthodes.....	43
3.1. Collecte et conservation des nodules.....	43
3.2. Isolement des bactéries à partir des nodules.....	43
3.2.1. Stérilisation de la surface des nodules.....	43
3.2.2. Ecrasement des nodules et ensemencement des bactéries.....	43
3.3. Examen microscopique des isolats : coloration à la Fuschine.....	44
3.4. Purification des isolats.....	45
3.5. Conservation des souches.....	45

3.6. Essais de nodulation.....	45
3.6.1. Préparation des pots.....	46
3.6.2. Préparation du substrat.....	46
3.6.3. Préparation de la solution d'arrosage.....	46
3.6.4. Germination des graines.....	47
3.6.5. Semis et inoculation.....	47
3.6.6. Vérification de la nodulation.....	48
3.6.7. Mesure du poids sec de la partie végétative.....	48
3.7. Tests d'identification préliminaire.....	48
3.7.1. Coloration différentielle de Gram.....	48
3.7.2. Recherche de la catalase.....	49
3.7.3. Test d'absorption du colorant Rouge Congo sur milieu YEMA	49
3.7.4. Test d'acidification/alcalinisation du milieu.....	50
3.7.5. Test croissance sur milieu Glucose Peptone Agar (GPA).....	51
3.7.6. Test de la croissance sur gélose à l'acétamide.....	52
3.8. Caractérisation phénotypique.....	52
3.8.1. Test de tolérance aux températures élevées et aux différentes concentrations de NaCl.....	52
3.8.2. Test de tolérance aux différents pH.....	53
3.8.3. Test de tolérance au stress hydrique.....	53
3.8.4. Test de résistance intrinsèque aux antibiotiques.....	54
3.8.5. Test de distinction <i>Rhizobia/Agrobacterium</i>	55
3.8.6. Caractérisation biochimique et auxanotrophique.....	56
3.8.7. Analyses statistiques.....	61
3.9. Séquençage et analyse phylogénétique des gènes de l'ARNr 16S.....	61
Chapitre V : Résultats et discussions.....	63
1. Objectif de l'étude.....	63
2. Les légumineuses sahariennes étudiées.....	63
2.1. Récolte des plants des légumineuses.....	63
2.2. Les légumineuses spontanées étudiées.....	63
2.2.1. L'espèce <i>Medicago littoralis</i> Rhode.....	64
2.2.2. L'espèce <i>Melilotus indicus</i> (L.) All.....	65
3. Les isolats des nodules racinaires.....	66

4. Caractérisation culturelle et morphologique des isolats.....	66
4.1. Temps de croissance.....	66
4.2. Observation macroscopique et microscopique des isolats.....	67
4.3. Tests d'absorption de rouge Congo (RC) et d'acidification ou alcalinisation du milieu.....	70
4.4. Croissance des isolats sur milieu GPA et gélose à l'acétamide.....	72
4.5. Résultat de la coloration de Gram	74
5. Caractérisation symbiotique.....	74
5.1. Essais de nodulation	74
5.2. La nodulation croisée	80
6. Etude de la tolérance des isolats aux différents stress.....	81
6.1. La tolérance à la température.....	81
6.2. La tolérance à la salinité.....	82
6.3. Analyse en composantes principales (ACP) : Relation entre la tolérance à la salinité et aux températures élevées.....	84
6.4. La tolérance aux pH acides ou alcalins.....	88
6.5. La tolérance au stress hydrique.....	90
7. Test de distinction <i>Agrobacterium/Rhizobia</i>	91
8. Etude de la résistance ou sensibilité des isolats aux antibiotiques.....	92
9. Caractérisation biochimique et assimilation des hydrates de carbone.....	94
9.1. Recherche de la catalase.....	94
9.2. Assimilation des hydrates de carbone (API 20 NE et API 50 CH).....	94
10. Caractérisation phylogénétique des isolats : Séquençage et analyse phylogénétique du gène de l'ARNr 16S.....	105
Conclusion générale et perspectives.....	111
Références bibliographiques.....	114
Annexes.....	128

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Introduction

Le Sahara algérien occupe approximativement 80 % de la superficie du pays. Cette région étendue est caractérisée par la présence des régions particulières « les oasis » qui constituent des unités environnementales très différentes de leurs alentours (Le Houérou 1975 ; Riou 1990, Chouaki et al. 2006).

La région de l'Oued Righ fait partie du Sahara septentrional-est, elle appartient au climat hyper aride. Le sol est généralement granuleux léger, ce sol est caractérisé par une forte salinité causée dans la majorité des cas par l'eau d'irrigation chargée en sels.

La composition chimique de ces sols est très variable ; mais en général les sols légers sont pauvres en azote, en phosphate et en potasse (Toutain 1974 ; Le Houérou 1975 ; Koull et al. 2013).

Les oasis présentent des unités caractérisées par une forte diversité biologique (palmiers, grenadiers, figuiers et plantes fourragères etc...) (Riou 1990, Chouaki et al. 2006). Parmi ces oasis, celles de la vallée d'Oued Righ sont les plus connues.

Les légumineuses constituent l'une des trois familles prédominantes dans les unités de production oasienne, elles sont présentes comme des cultures maraîchères (principalement la fève) ou fourragères.

La luzerne (*Medicago sativa*) constitue la principale plante fourragère, elle occupe environ 80 % de la surface destinée aux cultures fourragères et le tiers de la surface totale irriguée (Janati 1990; Abdelguerfi et al. 1996; Chaabena et Abdelguerfi 2007; Chouaki et al. 2008; Chafi and Bensoltane 2009; Chaabena et Abdelguerfi 2001).

Les légumineuses sont présentes aussi comme des plantes sauvages (*Melilotus indicus*, *Medicago littoralis*, *Retama retam*) et des arbres (l'*Acacia*) (Quèzel and Santa 1962; Abdelguerfi et al. 1996; Chouaki et al. 2006; Chaabena et Abdelguerfi 2007).

Dans les régions arides, la faible fertilité du sol limite souvent la productivité des plantes (Toutain 1974; Le Houérou 1975; Djennane 1990; Zahran 1999; Priefer et al. 2001). L'azote constitue un élément indispensable pour le développement et la productivité des plantes dans le

sol généralement pauvre en matière organique de ces régions (Fitouri Dhane et al. 2012; Palma et al. 2013).

La fixation biologique de l'azote atmosphérique (Biological Nitrogen Fixation : BNF) constitue une source durable d'azote pour les systèmes agricoles. La BNF dans les régions arides est réalisée principalement par quelques bactéries hétérotrophes, bactéries associées, cyanobactéries, plantes actinorhiziennes (Zahran 1999; Rejili et al. 2012).

La relation symbiotique rhizobia-légumineuse constitue le mécanisme le plus important de fixation biologique d'azote (Zahran 1999; Zahran 2001).

Les bactéries de la rhizosphère qui exercent un effet bénéfique sur le développement des plantes sont définies comme rhizobactéries améliorant la croissance des plantes et appelées PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Saharan et Nehra 2011 ; Adesemoye et Egamberdieva 2013).

Les rhizobia sont classées comme des PGPR et la symbiose rhizobia-légumineuse présente l'une des mécanismes d'interaction plante-PGPR (Saharan et Nehra 2011 ; Adesemoye et Egamberdieva 2013).

En Algérie, de nombreuses études sur la symbiose rhizobia-légumineuses sont réalisées (Boulila et al. 2009 ; Merabet et al. 2006 ; Chafi et Bensoltane 2009 ; Amrani et al. 2010 ; Boukhatem et al. 2012 ; Riah et al. 2014 ; Ahnia et al. 2014 ; Torche et al. 2014 et autres), ces études ont concerné les rhizobia des différentes régions du pays (régions de nord, semi-aride et aride) mais aucune étude précise n'est réalisée sur les rhizobia des légumineuses des oasis.

L'objectif de ce travail est l'isolement, l'identification et la caractérisation des rhizobia symbiotiques de deux légumineuses indigènes; *Medicago littoralis* Rhode et *Melilotus indicus* (L.) All. des oasis de Touggourt.

Une caractérisation phénotypique des isolats obtenus a été menée pour évaluer leurs propriétés symbiotiques, leur capacité à tolérer les conditions de stress : les températures élevées, la salinité, la sécheresse, la variation de pH, et leur résistance aux antibiotiques. L'identification génétique de six isolats est réalisée par l'analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16S.

Ce contexte s'articule autour de deux grandes parties :

- D'abord, une première partie est constituée de trois chapitres qui présentent des aperçus sur l'écosystème de la région d'étude, les légumineuses utilisées et des généralités sur le processus de la symbiose rhizobia-légumineuse.
- Ensuite, une deuxième partie construite par deux chapitres ; un chapitre décrit les matériels et les méthodes utilisés pour l'isolement, l'identification et la caractérisation des rhizobia symbiotiques des légumineuses étudiées. Le deuxième chapitre concerne la présentation et la discussion des résultats obtenus.
- Enfin, les conclusions tirées de ce travail et les perspectives pour les prochaines études.

CHAPITRE I

Chapitre I : Aperçu sur l'écosystème des oasis sahariennes

1. Nature et caractères physiques, chimiques et biologiques des sols des oasis

Le Sahara algérien est constitué d'immenses étendues de sol impropre à l'agriculture et de nombreuses oasis dont les sols agricoles sont constitués de couches sédimentaires superficielles dont la fertilité et le pouvoir de rétention en éléments fertilisants et en eau sont faibles (Djennane 1990).

La superficie totale de toutes les oasis sahariennes ne représente sur le globe, pour celles qui sont plantées en palmiers dattiers, que près d'un million d'hectares (moins de 1 % de la superficie du Sahara) (Battesti 1998).

1.1. Caractères physiques des sols oasiens

On rencontre différents types de sol dans les oasis sahariennes et sahéliennes qui vont du sol léger au sol assez compact (Toutain 1974).

- a. **Les sols légers** ; sont les sols sableux et graveleux des palmeraies sahariennes du Souf et de l'Oued Righ en Algérie et de certaines vallées phœnicicoles de l'Anti-Atlas au Maroc et des palmeraies sahéliennes de l'Aïr du Niger (Toutain 1974).
- b. **Les sols assez compacts** ; sont des sols alluviaux plus ou moins argileux et limoneux des terrasses bordant les Oueds des palmeraies de Oued Biskra en Algérie, Oued Drâa au Maroc et Oued Ziz entre l'Algérie et le Maroc et des zones d'épandage de crues (Guir en Algérie, Zous-Fana entre l'Algérie et le Maroc et Tafilalet au Maroc (Toutain 1974).

Dans de nombreuses régions ces sols sont marqués par la présence de sels due essentiellement à l'utilisation d'eaux d'irrigation chargées. On observe ces phénomènes dans les oasis de l'Oued Righ en Algérie, de Tafilalet au Maroc et du Djérid tunisien (Toutain 1974).

1.1.1. La structure d'un sol oasien

Dans la majorité des profils, on distingue morphologiquement trois séries d'horizons dans les sols des oasis :

1.1.1.1. **Horizon de surface** ; généralement d'une trentaine de centimètres correspondant à l'horizon de travail du sol. Il est le plus souvent meuble et humifère. Les racines de la strate inférieure (cultures annuelles) y sont exclusivement localisées (El Fekih et Pouget 1969).

1.1.1.2. **Horizons moyens** ; caractérisés en premier lieu par une densité maximale de l'enracinement du palmier dattier. La strate moyenne (arbres fruitiers) exploite la partie supérieure de ces horizons (El Fekih et Pouget 1969). Les sols de cet horizon sont peu humifères et affectés par l'hydromorphie, pseudogley, amas et faible encroûtement gypseux.

1.1.1.3. **Horizons de profondeur** ; l'enracinement du palmier-dattier est totalement absent ou de faible densité et en mauvais état en raison de la présence de la nappe qui détermine une hydromorphie d'intensité variable (El Fekih et Pouget 1969).

Les sols des oasis sont tous plus ou moins marqués par l'action de l'homme qui a modifié le profil naturel initial (Dubost 2002). On observe des modifications :

- a. *De texture et de structure* dues aux labours au cours des siècles. En effet le retournement a homogénéisé les profils sur 40 cm et parfois plus. En plus dans certaines oasis du littoral on a coutume d'incorporer aux sols lourds du sable afin d'alléger la texture de surface (Dubost 2002).
- b. *De teneurs en matières organiques* ; dues aux amendements organiques et il en résulte au bout de plusieurs siècles une teneur élevée en matière organique (Dubost 2002).
- c. *D'hydromorphie* due à l'irrigation fréquente qui tasse le sol et fait remonter la nappe (Dubost 2002).

Les sols des oasis, par leur teneur en sels solubles, devraient tous être classés dans les sols halomorphes. Mais ce caractère est trop variable pour être conservé dans une classification des sols. En effet la salinité du sol oasien est surtout fonction du mode d'irrigation et des méthodes culturales employées (Cointepas et al. 1966).

1.2. Caractères chimiques

La composition chimique de ces sols est très variable, les sols légers sont généralement pauvres en azote, en phosphate et en potasse (Toutain 1974).

Les sols moyens lourds (sols argileux, argilo-sableux, limoneux et argilo-limoneux) sont en général pauvres en azote et insuffisamment pourvus en phosphate assimilable. En revanche, la potasse est présente à peu près partout en quantité non négligeable (Toutain 1974).

Le calcium et le magnésium sont assez répandus ainsi que le sodium. Les microéléments sont bien représentés dans ces types de sol (Toutain 1974).

La couverture pédologique dans les oasis de la vallée de l'Oued-Righ (Touggourt) présente une grande hétérogénéité, elle est composée essentiellement des sols minéraux bruts, des sols peu évolués, des sols halomorphes et des sols hydromorphes (Toutain 1974 ; Bessedik et al. 2000).

La fraction minérale de ces sols est constituée dans la majorité des cas de sable. Toutefois, certaines zones de superficie relativement faible présentent une texture argileuse. La fraction organique est très faible, elle est en général inférieure à 1 %.

Le pH est légèrement alcalin (7,5 à 8,8), le calcaire et le gypse sont présents en quantité limitée dans tous les sols (Toutain 1974 ; Bessedik et al. 2000).

L'action conjuguée d'un climat caractérisé par une évapotranspiration intense et la présence d'une nappe peu profonde fait que la plupart des sols ont subi le phénomène de salinisation secondaire dûe à une irrigation par de l'eau chargée en sels.

1.3. Caractères biologiques

1.3.1. Relation sol-eau

En zone aride et subaride l'élément essentiel pour la mise en valeur agricole est l'eau, facteur limitant le plus important de la production végétale (Floret et al. 1982 ; Dubost 2002 ; Remini 2006 ; Escadafal 2007).

L'évapotranspiration dans les oasis sahariennes est de l'ordre de 1700 à 2100 mm ce qui nécessite des doses d'irrigation importantes sur le complexe végétal «palmiers dattiers et cultures sous-jacentes» (Floret et al. 1982), sachant que la principale ressource d'eau est constituée par les eaux souterraines qui présentent l'un des plus vastes réservoirs hydrauliques du monde (Tabouche et Achour 2004 ; Remini 2006).

Les conditions lithologiques, hydrodynamiques et hydrochimiques sont variées, notamment dans la région d'Ouargla, et confèrent de ce fait un intérêt particulier à ces nappes. Par ailleurs, diverses études montrent que les eaux de cette région sont caractérisées par une minéralisation totale excessive (Tableau 1), le plus souvent associée à une dureté élevée et des concentrations élevées en fluorures (Tabouche et Achour 2004).

Tableau 1 : Caractères physico-chimiques des eaux souterraines de la région d'Ouargla

Localité	Nappe	CE (ms/cm)	pH	T (°F)	Ca ²⁺ (mg/l)	Mg ²⁺ (mg/l)	Na ⁺ (mg/l)	K ⁺ (mg/l)	HCO ₃ ⁻ (mg/l)	Cl ⁻ (mg/l)	SO ₄ ²⁻ (mg/l)	F ⁻ (mg/l)
Touggourt	Miopliocène	5.09	8.24	268	796	166	455	30	146	1744	900	2.70
		7.78	8.30	346	768	373	775	35	155	3224	2310	3.01
	Albien	2.16	8.31	120	320	97	145	33	159	699	760	0.70
		2.81	8.11	158	380	152	215	34	134	924	800	0.70
Ouargla	Phréatique	6.71	7.73	286	707	264	2472	100	196	2249	2556	0.51
		4.46	8.20	188	363	235	591	21	198	1874	2302	1.07
	Miopliocène	3.63	7.069	136	364	109	438	22	90	830	650	1.72
		3.10	8.40	130	280	145	516	21	74	790	650	1.47
	Sénonien	2.54	8.33	97	285	62	233	14	122	382	650	1.37
		1.90	7.58	102	245	99	233	14	124	360	620	1.68
	Albien	2.50	8.06	103	196	131	178	22	165	400	580	0.63
		2.83	7.80	110	230	127	-	-	63	-	-	0.56

1.3.2. Matière organique

En général, les sols des oasis sont définis comme physiquement divers, mais présentant un caractère commun, celui d'être pauvre en humus (Toutain 1974). Cet humus se localise dans l'horizon de surface avec une teneur comprise entre 0.5 et 1% (El Fekih et Pouget 1969).

1.3.3. L'activité microbienne dans les sols oasiens

Dans les sols oasiens les microorganismes participent à la décomposition de la matière organique (fumier) d'autant plus vite que le sol est humide et que la température est élevée ; ceci explique la rapidité de consommation du fumier dans ces sols, et la faiblesse de son arrière-action d'une année sur l'autre (Solsans et al. 2009).

La survie et l'activité des microorganismes dans le sol sont relativement limitées dans la plupart des oasis sahariennes où l'on pratique une culture extensive sous palmiers et dans lesquelles les sols sont insuffisamment pourvus en matière organique (Toutain 1974).

2. Aperçu sur l'environnement oasien

2.1. Définition de l'oasis

L'oasis est un mot grec qui dérive de l'égyptien et qui correspond, dans le désert, à une petite région où la présence de l'eau permet la culture (Mtimet et Belemlih 2009).

Les oasis sont nombreuses au Sahara, mais la superficie totale de toutes les oasis sahariennes n'atteint dans les estimations les plus optimistes que le chiffre de 8000 à 9000 km², soit environ un millionième de la superficie du Sahara dans son ensemble. Elles représentent sur le globe, pour celles qui sont plantées en palmiers dattiers, près d'un million d'hectares (Battesti 1998).

2.2. Particularités du microclimat oasien

L'espace environnant des oasis est caractérisé par des températures élevées qui peuvent dépasser, les 40°C à l'ombre en été, une précipitation faible de moins 100 mm/an et des vents de sable fréquents (Chaouche Bencherif 2008).

L'oasis est par conséquent une zone nettement différente de l'espace environnant et le changement des propriétés de surface s'accompagne d'un changement des propriétés de la basse atmosphère au contact de l'oasis ; il y a donc une modification locale du climat oasien en comparaison avec son environnement qui est le plus souvent chaud et sec (Chaouche Bencherif 2008 ; Messar 1996).

L'intégration des cultures basses et des cultures fruitières permet d'assurer un ombrage contre le fort ensoleillement. L'ombrage et l'humidité constante (oueds, irrigation par

inondation, densité de la couverture végétale) permettent de pallier les fortes chaleurs et entraînent ainsi le rafraîchissement et l'humidification de l'air dans l'oasis (Riou 1990).

3. La flore des oasis sahariennes

Les oasis du palmier dattier de la vallée d'Oued Righ sont structurées selon le modèle classique en trois strates :

- La première strate est constituée par le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) qui occupe une place importante dans le maintien de l'agriculture oasisienne grâce au microclimat qu'il crée (Battisti 1998 ; Chouaki et al. 2006).
- La deuxième strate est celle des arbres fruitiers représentée notamment par le grenadier, la vigne, le figuier et autres (Battisti 1998 ; Chouaki et al. 2006).
- La troisième strate est l'étage herbacée, à l'ombre, représentée par les cultures maraîchères, les céréales, les fourrages, les plantes médicinales et aromatiques (Battisti 1998 ; Chouaki et al. 2006).

La culture dans l'oasis est intensive, c'est un jardinage dont les travaux exigent beaucoup d'eau, surtout en été (20 à 30.000 m³/ hectare et par an). Cet écosystème oasisien, n'a pu se créer, que grâce à l'existence d'une source d'irrigation (Chouaki 2006 ; Mtimet et Belemlih 2009).

La culture dans les oasis du Sahara algérien est caractérisée par la prédominance de trois grandes familles : les Graminées, les Légumineuses et les Composées. Elles représentent à elles seules 35 à 40% de la flore du Sahara (Chouaki 2006).

4. Aperçu sur la culture dans les oasis

4.1. L'arboriculture fruitière

Les oasis sahariennes se caractérisent par une prédominance de l'arboriculture fruitière avec une grande variation en espèces et en densité selon les zones. Les espèces fruitières plantées sont une ressource agricole de grande importance ; notamment, l'olivier, l'amandier, le pommier, le poirier, le figuier, le grenadier, la vigne, l'abricotier, le pêcher, le cognassier, le prunier (Hajjaji 1990).

Les arbres fruitiers dans les oasis de la vallée de l'Oued Righ peuvent se trouver en intercalaire des palmiers, en plantation régulière sous-jacente ou bien en verger (parcelles) à l'intérieur de mailles de palmiers (Ferry et Toutain 1990).

4.2. Les principales espèces fourragères

4.2.1. La luzerne pérenne (*Medicago sativa*)

C'est la principale culture fourragère des oasis ; elle occupe près de 80% des superficies fourragères et près du tiers des superficies irriguées. C'est une culture très bien adaptée au climat saharien et très productive puisqu'elle peut produire dans de bonnes conditions jusqu'à 100 tonnes de vert/ha (Janati 1990 ; Chouaki 2006).

4.2.2. La fève (*Vicia faba*)

Les fèves, culture traditionnelle en Algérie, ont fait l'objet d'un travail d'amélioration soutenu durant la période coloniale, les variétés locales se montrent plus intéressantes (précocité, productivité) que les variétés d'introduction (surtout européennes). Dans certaines régions comme les Ziban (wilaya de Biskra) et les oasis, il existe certaines variétés locales de fève très précoces (Chouaki 2006).

4.2.3. Le tadelaght (*Vigna unguiculata* L.)

C'est une légumineuse saharienne peu connue, cultivée traditionnellement dans le Touat, Gourara, Tidikelt et le reste du sud-ouest algérien (Chouaki 2006).

C'est depuis l'extension prise par le haricot (*Phaseolus vulgaris*) que la loubia s'est localisée dans les régions à climat chaud et sec où il est d'une culture plus facile que celle du haricot. Il existe des variétés fourragères et des variétés comestibles. Ces dernières ont la graine grosse et généralement blanche (Chouaki 2006).

Le tadelaght a été introduit donc depuis fort longtemps en Algérie mais il n'a jamais été cultivé à très grande échelle. Les variétés ou cultivars ont été maintenus chez les populations des régions les plus reculées (régions montagneuses, oasis, etc...) (Chouaki 2006).

4.2.4. La vesce (*Vicia sativa*)

La vesce commune a été introduite par les colons pour la production de foin de vesce-avoine. Cependant, Quèzel et Santa (1962) mentionnent près de 36 espèces et sous-espèces de vesces spontanées en Algérie.

CHAPITRE II

Chapitre II : Les légumineuses

1. Généralités

La famille des légumineuses (fabacées) est extrêmement diverse, avec environ 18000 espèces, incluant de petites plantes herbacées annuelles, des arbustes, des lianes et des arbres. Cette famille colonise de très nombreux écosystèmes, des zones circumboréales jusqu'à l'équateur. L'intérêt des premiers agriculteurs de diverses régions du monde pour les légumineuses était probablement dû à l'observation des qualités nutritives de leurs graines (teneurs élevées en protéines) mais aussi de leur pouvoir fertilisant (Gough 2009 ; Franche et al. 2009).

Cette famille regroupe des espèces d'arbres et des plantes herbacées caractérisées par des feuilles pennées ou trifoliolées ; parfois épineuses ou vrilleuses ; fleurs à cinq pétales, la plupart papilionacées ; pétale supérieur (étendard) souvent large et dressé, chevauchant les deux latéraux (ailes) qui reposent de chaque côté sur les deux pétales inférieurs soudés (carène), contenant les dix étamines et le style ; sépales en tube à cinq dents longues ou courtes. Les fruits sont des gousses qui diffèrent selon les genres (Blamey et Grey-Wilson 2000).

1.1. Importance des légumineuses

Nous savons maintenant que la culture des légumineuses ne nécessite pas d'apport d'engrais azoté d'origine industrielle, ce qui est d'un avantage considérable en termes d'économie et d'écologie. La synthèse, le transport et l'épandage des engrais azotés sont, en effet, très coûteux et polluants.

Cette pollution est à la fois due aux gaz à effet de serre produits par ces processus et au fait qu'une partie des engrais est entraînée dans les eaux continentales et lessivées dans les nappes phréatiques.

On estime que la symbiose fixatrice d'azote rhizobia-légumineuses fixe chaque année, à l'échelon planétaire, au moins autant d'azote que l'industrie mondiale de fabrication d'engrais (Gough 2009).

Après la culture et la récolte des légumineuses, une partie de l'azote fixé se retrouve dans le sol sous forme de résidus peu lessivables, pouvant servir de source d'azote pour la

prochaine culture. Ainsi, depuis fort longtemps, on a observé que l'introduction des légumineuses dans une rotation a des effets bénéfiques (Gough 2009).

Un autre intérêt à cultiver des légumineuses est la forte teneur en protéines de toutes les parties de ces plantes, qu'il s'agisse des graines, comme pour le soja, le lupin ou la féverole, ou de l'ensemble des parties aériennes, comme pour la luzerne ou le trèfle.

Cette forte teneur en protéine est liée à leur aptitude à fixer l'azote. C'est ainsi que les légumineuses représentent 35 % des protéines végétales utilisées au niveau mondial pour l'alimentation humaine et animale.

D'un point de vue nutritionnel, la composition en acides aminés des légumineuses est très complémentaire de celle des céréales (Gough 2009).

Les sous espèces de légumineuses utilisées tels que *Dolichus biflorus L.*, alfalfa (*Medicago sativa*), fève (*Vicia faba*), bersim (*Trifolium alexandrinum*), *Calicotome villosa*, *Lotus creticus*, *Melilotus*, *Retama*, *Astragalus*, quelques *Acacia*, *Genista* et autres, sont toutes bien adaptées aux régions arides et aux oasis sahariennes (Janati 1990 ; Jeder et al. 1996 ; Chouaki 2006 ; Chafi et Bensoltane 2009 ; Thami-Alami 2010) . Cependant, en dépit de leur importance potentielle dans l'agriculture durable dans les terres sèches, peu d'études se sont concentrées sur les facteurs limitant une production et un usage plus large de ces espèces légumineuses dans les oasis sahariennes (Serraj et al. 2004).

Dans la flore algérienne, les *Fabaceae* sont représentées par environ 360 espèces et sous-espèces, dont 41 % rares à très rares et 13 % endémiques (Quèzel et Santa 1962).

Du fait de son importance fourragère et pastorale, cette famille a bénéficié d'une attention particulière de la part de différentes équipes de recherche.

Divers travaux sur les genres *Medicago*, *Trifolium*, *Scorpiurus*, *Hedysarum* et *Onobrychis* (Abdelguerfi et al. 1996 ; Abdelguerfi et Laouar 1999 ; Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar 2004) ont montré la présence d'une corrélation positive entre les paramètres biogéographiques et les traits biologiques liés à la croissance et à la reproduction, floraison, gousses et graines.

Les espèces des légumineuses affiliées aux genres *Medicago* et *Melilotus* sont importantes comme feuillage et comme une source d'engrais vert et sont distribuées naturellement ou cultivées dans beaucoup de régions du monde (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar 2004).

1.2. Taxonomie des légumineuses

Les légumineuses appartiennent à l'ordre *Fabales*, famille *Leguminosae*, (ou *Fabaceae* Lindl, 1836) (Baillon 1870). Elles constituent la troisième famille par ordre d'importance chez les angiospermes.

Les légumineuses se répartissent en trois sous-familles : les *Caesalpinioideae*, les *Papilionoideae* et les *Mimosoideae*. Cependant, environ 463 genres et 18000 espèces de légumineuses ont été décrites (Skerman 1982 ; Franche et al. 2009).

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Rosidae*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae* (Lindl 1836)

Sous famille : *Papilionoideae*

Sous famille : *Mimosoideae*

Sous famille : *Caesalpinioideae*

2. Le genre *Medicago*

2.1. Généralités

Le genre *Medicago* appartient à la famille des *Fabaceae*, sous famille des *Papilionoideae*. Il est proche des genres *Melilotus* et *Trifolium* (Quèzel et Santa 1962; Prospero et al. 1995; Maureira-Butler et al. 2008).

Leurs caractéristiques générales peuvent être résumées comme suit : plantes herbacées annuelles ou vivaces et parfois petits arbustes. Feuilles trifoliolées, fleurs généralement jaunes, en petits bouquets ou grappes axillaires. Gousse plus longue que le calice,

généralement déhiscente, droite ou courbée, mais souvent spiralée, épineux ou non, la gousse reste actuellement un des éléments principaux de détermination des espèces (Quèzel et Santa 1962 ; Arbeille et al. 2000).

Les aires d'origine de toutes les espèces du genre sont « le croissant fertile » recouvrant les pays des régions actuelles de Turquie, Iran, Irak, le sud du Caucase et le pourtour méditerranéen (Quèzel et Santa 1962 ; Prospero et al. 1995 ; Arbeille et al. 2000; Maureira-Butler et al. 2008).

En Algérie, pour la période de 1995 à 1997, la superficie consacrée à la luzerne pérenne (*Medicago sativa* L.) a représenté entre 0,37 et 0,71% de la superficie réservée aux cultures fourragères ; par rapport aux cultures herbacées sa superficie représente entre 1,86 et 3,03% pour la même période (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar 2004).

Dans le Sahara algérien, paradoxalement, la luzerne constitue le premier fourrage.

2.2.. L'espèce *Medicago littoralis* Rhode

2.2.1. Description et habitat

C'est une plante annuelle basse à petite, étalée ou prostrée, poilue à tiges souvent pourprées.

Les folioles sont cordiformes à ovales, plus larges dans la moitié supérieure du limbe, dentée au sommet, poilues sur les deux faces ; stipules lancéolées, à dents pointues.

Les fleurs sont jaunes de 5 à 6 mm de long par groupées de 3 à 7.

Les gousses de 3 à 6 mm, en cylindre plus au moins aplati, enroulée sur 3 à 6 spirales, généralement vers la droite, épineuse et glabre.

Cette espèce est observée dans les habitats côtiers sablonneux, dunes, terrains rocaillieux secs (Quèzel et Santa 1962 ; Arbeille et al. 2000).

En Algérie c'est une espèce très commune sur le littoral, assez commune dans les Hauts Plateaux, l'Atlas Saharien et dans le Sahara septentrional, mais rare dans le Tell (Quèzel et Santa 1962 ; Abdelguerfi et Laouar 1999).

2.2.2. Intérêt

Il a été proposé d'utiliser les médics (*Medicago* annuelles) indigènes tel que *Medicago littoralis* pour régénérer les parcours dégradés des zones arides et semi-arides en Afrique du Nord. L'idée était d'utiliser, sur le long terme, les mécanismes de dormances des graines de médics pour faire face aux aléas climatiques et à l'irrégularité des pluies en zones arides (Merabet et al. 2006).

D'autre part, on envisageait l'installation de ces médics pour initier une remontée biologique (fixation d'azote) de zones dénudées et une revégétalisation progressive par accumulation de particules fines et de matière organique en micro-dunettes pouvant accueillir par la suite des graminées et autres plantes pastorales. Cette approche était justifiée par le fait que les médics (*M. truncatula* ssp. *tricycla*, *M. littoralis* et *M. laciniata*) étaient omniprésentes en Afrique du Nord (Masson et Gintzburger 2000).

3. Le genre *Melilotus*

3.1. Généralités

Le *Melilotus* est un genre des légumineuses qui appartient à la famille des *Fabaceae*, sous famille des *Papilionoideae* ; il inclut 25 espèces, caractérisées par des rendements importants en graines, une tolérance aux températures extrêmes et un taux de fixation d'azote supérieur aux autres légumineuses.

Le Mélilot jaune est une plante d'origine méditerranéenne, de la famille des Fabacées, annuelle rarement vivace, éphémère à feuilles trifoliolées dentées; foliole médiane pétiolée, les latérales subsessiles. Deux stipules adnées au pétiole. Les fleurs sont petites en grappes axillaires, les gousses sont généralement à une ou deux graines (Quèzel et Santa 1962 ; Arbeille et al. 2000; Al Sherif 2009).

3.2. L'espèce *Melilotus indicus* (L.) All.

3.2.1. Description et habitat

Plante herbacée, annuelle, grêle de 10 à 40 cm de haut, à tiges dressées ou ascendantes, à nombreuses petites fleurs jaunes pâles de 2 à 3 mm de long disposées en grappes allongées.

Les feuilles ont trois folioles denticulées.

Les fruits sont des gousses sphériques de 1,5 à 3 mm, pendantes, nervurées vert noirâtres à maturité.

Cette plante contient de la coumarine, qui lui donne une odeur agréable. Elle est très répandue dans les terrains vagues et cultivés ainsi que les fossés d'irrigation et les endroits sablonneux humides, aux plaines et dans les régions tempérées d'Europe (Quèzel et Santa 1962 ; Arbeille et al. 2000).

En Algérie, *Melilotus indicus* est assez commun dans le Tell (Quèzel et Santa 1962 ; Khaznadar et al. 2009), à l'est du Sahara septentrional, cette espèce se retrouve dans les oasis à l'état subspontané, se rencontre sur les berges des canaux d'irrigation et peut atteindre des densités dépassant les 138 plants/m² (Quèzel et Santa 1962 ; Chaabena et Abdelguerfi 2007).

3.2.2. Intérêt

Dans certains pays, les espèces de *Melilotus* poussent dans les régions à salinité modérée où les légumineuses fourragères traditionnelles ne peuvent pas être cultivées.

Melilotus indicus est considérée comme une espèce avec une forte tolérance à la salinité, les températures extrêmes et la sécheresse, elle est caractérisée aussi par un taux de fixation d'azote plus important que les autres légumineuses (Rogers et al. 2008 ; Al Sherif 2009).

Dans les oasis du Sahara septentrionale, *Melilotus indicus* fait partie des cultures fourragères, elle n'est pas éliminée mais elle est donnée avec les autres espèces au bétail (Chaabena et Abdelguerfi 2007).

CHAPITRE III

Chapitre III : Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique

1. Généralités

L'azote moléculaire contenu dans l'atmosphère terrestre, représente une réserve pratiquement illimitée d'environ 4.10^{15} tonnes mais, pour être assimilable par les végétaux l'azote doit être combiné à d'autres éléments tels que l'hydrogène ou l'oxygène. La transformation de l'azote moléculaire en azote combiné est appelée fixation d'azote ; elle peut se faire selon des voies biologiques ou chimiques (fig.1) (Chafi et al. 2009).

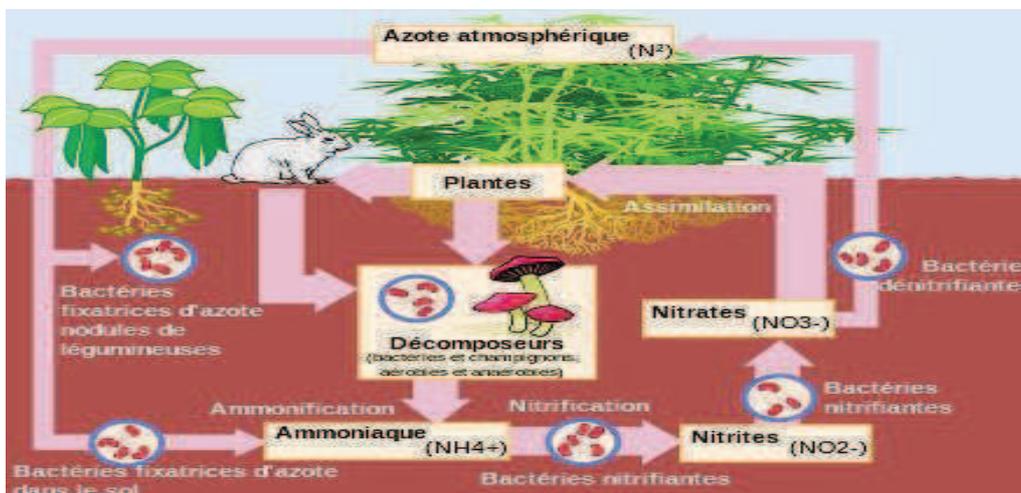


Fig. 1 : Cycle d'azote pour les écosystèmes terrestres (Pujik et Normand 2009)

La fixation biologique de l'azote représente environ 180 millions de tonnes d'azote fixé par an; soit plus que 100 millions de tonnes dans l'écosystème terrestre (Bogusz et Franche 1985; Franche et al. 2009).

L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) a estimé que les cultures fixent approximativement 40 millions tonnes d'azote par année (Chafi et al. 2009).

1.1. Les microorganismes fixateurs d'azote

Selon leur relation avec les plantes, on peut classer les fixateurs d'azote en deux groupes : les fixateurs libres et les fixateurs symbiotiques (Bogusz et Franche 1985)

1.1.1. Les fixateurs symbiotiques : la propriété symbiotique de fixation d'azote dans les nodules des plantes vasculaires est rencontrée chez deux groupes majeurs de bactéries phylogénétiquement différents ; les rhizobia (principalement *Alpha-Proteobacteria*) qui s'associent essentiellement avec des plantes légumineuses appartenant à la sous-famille des angiospermes (*Fabaceae*), et les *Frankia* (des *Actinobacteria*) qui s'associent avec un spectre plus large des plantes (Franche et al. 2009).

1.1.2. Les fixateurs non symbiotique (les fixateurs libres): représentés par les bactéries fixatrices libres (non associées avec une plante spécifique) comme *Klebsiella* ; *Azospirillum* ; *Azotobacter vinelandii* ; *Clostridium pasteurianum* et *Rhodospirillum rubrum*. (Bogusz et Franche 1985 ; Abdel-Ghafar 1989).

2. La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique

La fixation symbiotique d'azote est l'un des processus biologiques les plus importants qui influencent la production des plantes et la fertilité des sols (De Lajudie et al. 1998 ; Serraj et al. 2004 ; Al Sherif et al. 2004 ; Rejili et al. 2007 ; Franche et al. 2009). Ceci est dû aux grandes quantités d'azote atmosphérique apportées au sol par ce processus et dont la fixation symbiotique par les rhizobia qui vivent dans les nodules racinaires des plantes légumineuses constitue le mécanisme le plus important (Abdel-Ghafar 1989 ; Franche et al. 2009).

La symbiose intracellulaire qui s'établit entre les diverses bactéries du sol ou rhizobia, et les plantes de la famille des légumineuses aboutit à la formation de structures appelées nodosités sur les racines des plantes et parfois sur les tiges dans le cas de légumineuses aquatiques.

Dans les cellules de ces nodosités, les bactéries se différencient en bactéroïdes, capables de réduire l'azote atmosphérique N_2 en une forme assimilable par la plante-hôte. En contrepartie, la plante fournit aux bactéries une niche dans laquelle elles peuvent se multiplier abondamment grâce aux composés carbonés issus de la photosynthèse. Cette interaction constitue donc une « symbiose », puisque les deux partenaires vivent en contact étroit, il s'agit d'une association à bénéfice réciproque. Grâce à cette symbiose, les légumineuses sont capables de pousser dans des sols pauvres en azote minéral ou organique (Gough 2009).

2.1. Rhizobia

Le terme rhizobia est donné pour toutes les bactéries du sol capables de fixer l'azote atmosphérique et former des nodules sur les racines des plantes légumineuses, l'azote atmosphérique est fixé ou réduit en ammoniac pour être assimilable par les plantes (El-Fiki 2005 ; Willems 2006 ; Asadi Rahmani et al. 2009).

Les rhizobia sont des bactéries à Gram négatif non sporulant, aérobies de 1,2 à 3µm de longueur et de 0,5 à 0,9 de largeur, chimioorganotrophes, neutrophiles (pH entre 6 et 7) et mésophiles (température optimale de croissance est entre 25 et 30°C), mobiles par un flagelle polaire ou subpolaire ou bien par deux à six flagelles péritriches (Sadowsky et al. 1983 ; Somasegaran et Hoben 1985).

2.1.1. Caractères généraux des rhizobia

Les rhizobia constituent un groupe de micro-organismes génétiquement et physiologiquement hétérogènes (Somasegaran et Hoben 1985).

2.1.2. Caractères symbiotiques

Le principal caractère distinctif des rhizobia est l'infectivité ou la capacité d'établir une relation symbiotique avec une ou plusieurs espèces des plantes légumineuses et qui s'exprime par la formation des nodules (Prin et al. 1993).

Le caractère d'effectivité ou d'efficience est défini par la capacité de ces rhizobia à réduire l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante, à l'intérieur des nodules, qui se traduit par la couleur rouge ou rose de ces dernières (présence de l'enzyme de fixation d'azote) (Sadowsky et al. 1983 ; Somasegaran et Hoben 1985 ; Prin et al. 1993).

2.1.3. Caractères cultureux et biochimiques

2.1.3.1. Caractères cultureux

Sur le milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar), les rhizobia forment des colonies circulaires bombées, aqueuses, translucides, laiteuses ou blanches opaques, productrices d'EPS (Somasegaran et Hoben 1985 ; Sadowsky et al. 1983).

En raison du temps de génération, les rhizobia sont classées en deux grands groupes :

- a. **Les rhizobia à croissance rapide** ; avec un temps de génération de 2 à 4 heures, elles développent une turbidité remarquable dans un milieu de culture liquide après 2 à 3 jours. Elles sont capables d'utiliser une grande gamme d'hydrates de carbone (mais habituellement croissent mieux sur glucose, mannitol et saccharose) entraînant souvent une production d'acide. Les rhizobia de ce groupe infectent généralement les légumineuses des régions modérées et chaudes (Sadowsky et al. 1983 ; Somasegaran et Hoben 1985 ; Bala et al. 2004).
- b. **Les rhizobia à croissance lente** ; avec un temps de génération de 6 à 7 heures, elles exigent 3 à 5 jours pour la production d'une turbidité modérée dans un milieu liquide. Ce groupe de rhizobia se développe sur une gamme moins large de sources de carbones et entraîne une production d'alcalis (Sadowsky et al. 1983 ; Somasegaran et Hoben 1985 ; Bala et al. 2004).

La plupart des rhizobia n'absorbe pas ou très peu le colorant de rouge Congo sur le milieu YEMA ce qui permet de distinguer les espèces contaminantes colorées en rouge (Sadowsky et al. 1983 ; Somasegaran et Hoben 1985).

2.1.3.2. Caractères biochimiques

Les rhizobia sont des bactéries aérobies avec un système respiratoire où l'oxygène est l'accepteur final d'électrons.

Les rhizobia produisent de grandes quantités d'éléments extracellulaires (EPS) et également les lipopolysaccharides constitutives de la membrane externe et qui interviennent aussi aux différentes étapes de l'infection (Jordan 1984 ; Somasegaran et Hoben 1985). Généralement, les cellules des rhizobia contiennent des granules de poly- β -hydroxybutyrate (PHB) non colorés.

2.1.4. Taxonomie des rhizobia

La première classification des rhizobia a été basée sur les tests de l'inoculation croisée entre les rhizobia et leurs plantes hôte et sur d'autres critères morphologiques et culturales (Willems 2006 ; Berrada et Fikri-Benbrahim 2014).

L'isolement des rhizobia associés aux légumineuses non prises en compte auparavant, a souvent conduit au bouleversement de leur taxonomie. Ces modifications constantes de la

taxonomie ont conduit à la recherche des critères à prendre en compte pour la description de nouveaux taxons (Berrada et Fikri-Benbrahim 2014).

C'est ainsi que les bactériologistes ont commencé l'utilisation de la taxonomie polyphasique qui permet de prendre en compte une large gamme d'information phénotypique (caractères morphologiques, physiologiques) et génotypique (analyse des plasmides, hybridation ADN/ADN, analyse du pourcentage en GC) (Willems 2006 ; Berrada et Fikri-Benbrahim 2014 ; Peix et al. 2015).

Le changement le plus important dans la taxonomie des rhizobia est en relation avec l'introduction des techniques génétiques qui permettent l'analyse des gènes (séquençage des gènes de l'ARNr 16S, analyse des *Housekeeping genes* tels que le *recA*, *atpD*, *glnII*) (Willems 2006 ; Masson-Boivin et al. 2009 ; Berrada et Fikri-Benbrahim 2014 ; Peix et al. 2015).

D'après l'analyse des séquences ADNr 16S, tous les rhizobia appartiennent à trois sous-classes phylogénétiques distinctes α , β et γ -*Proteobacteria* (fig.2) connu sous le nom de alpha, beta ou gamma-rhizobia (Willems 2006 ; Masson-Boivin et al. 2009 ; Berrada et Fikri-Benbrahim 2014 ; Peix et al. 2015).

Ces rhizobia sont groupés en : 11 genres (*Rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrhobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia* et *Shinella*) qui appartiennent tous à l'ordre *Rhizobiales* de la sous-classe α -*Proteobacteria* ; deux genres, *Burkholderia* et *Cupriavidus*, appartiennent à la sous-classe β -*Proteobacteria* sont groupés dans l'ordre des *Burkholderiales*, et le genre *Pseudomonas* qui appartient à l'ordre *Pseudomonales* dans la sous-classe γ -*Proteobacteria* (Willems 2006 ; Masson-Boivin et al. 2009 ; Berrada et Fikri-Benbrahim 2014 ; Peix et al. 2015).

Il est à noter qu'un même genre ou également espèce peut grouper des souches rhizobiennes et non-rhizobiennes, c'est le cas du genre *Methylobacterium* qui contient une espèce de rhizobia, *M. nodulans*, en plus des bactéries saprophytes (Willems 2006 ; Masson-Boivin et al. 2009 ; Berrada et Fikri-Benbrahim 2014 ; Peix et al. 2015).

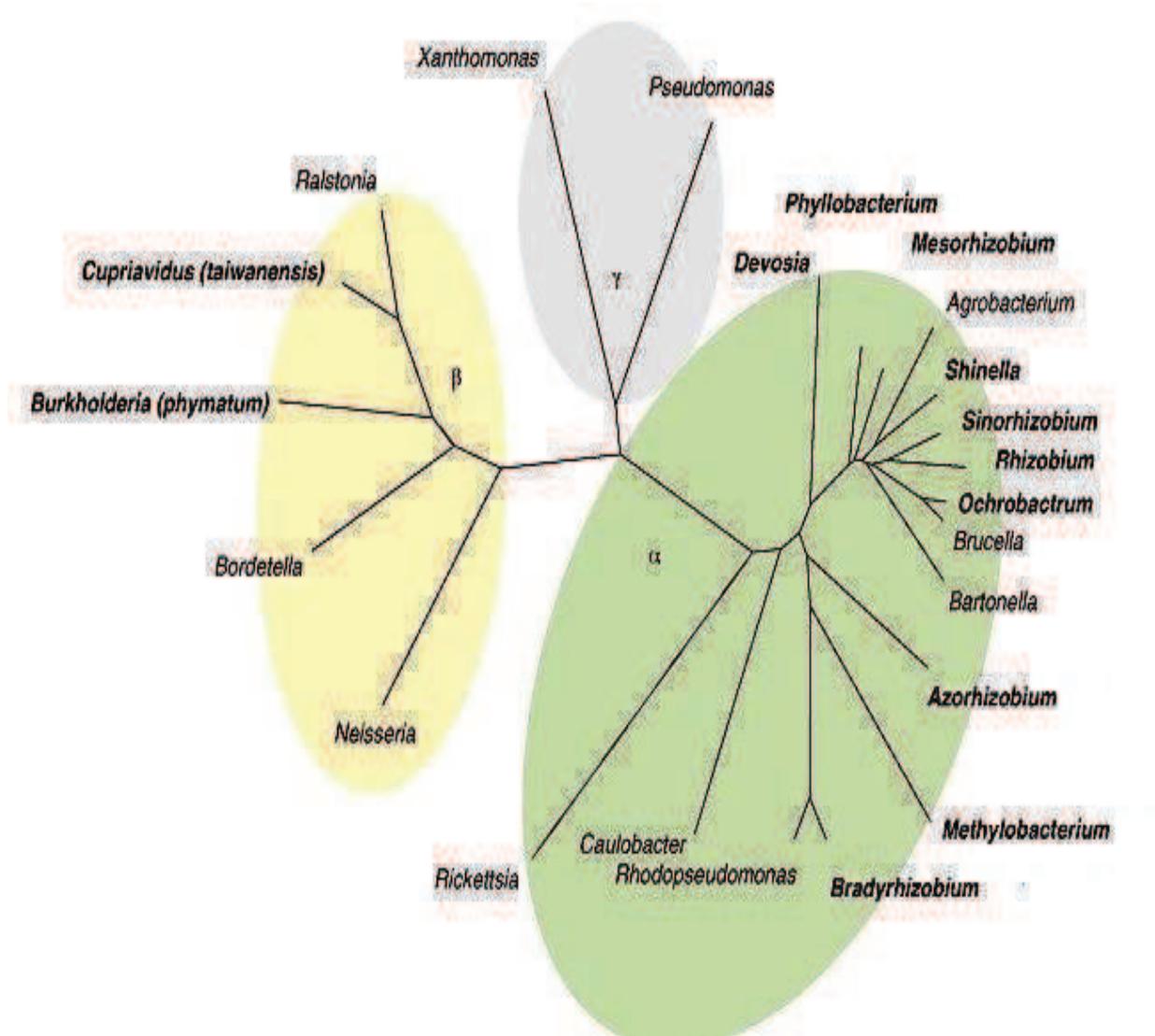


Fig. 2 : Arbre phylogénétique basés sur les séquences de l'ADNr 16S des rhizobia appartenant aux sous classes α -, β - et γ -Proteobacteria

Il est maintenant établi qu'une même plante peut être nodulée par des symbiontes taxonomiquement différents. C'est le cas par exemple de *Medicago*, *Melilotus* (tableau 2), *Phaseolus*, *Glycine*, *Sesbania*, *Acacia*, etc... (De Lajudie et al. 1998 ; Cacciari et al. 2003).

Nous nous sommes intéressés aux rhizobia symbiotiques des légumineuses *Medicago* et *Melilotus* des régions arides. Le tableau 2, montre que les rhizobia nodulant ces légumineuses sont affiliées au genre *Ensifer* (*Sinorhizobium*).

Tableau 2 : Les espèces rhizobiennes symbiotiques des genres *Medicago* et *Melilotus* (Willems 2006; Peix et al. 2015)

Genre	Espèces	Symbiotes rhizobienne	Référence
Medicago	<i>Medicago ruthenica</i>	<i>Rhizobium alamii</i>	Berge et al. 2009
		<i>Rhizobium mongolense</i>	van Berkum et al. 1998
	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Ensifer medicae</i>	Rome et al. 1996 ; Young, 2003
	<i>Medicago sativa</i>	<i>Ensifer garamanticus</i>	Merabet et al. 2010
		<i>Ensifer meliloti</i>	Dangeard 1926; de Lajudie et al. 1994; Young 2003
		<i>E. morelense</i>	Bromfield et al. 2010
		<i>E. adhaerens</i>	Willems et al. 2003
	<i>Medicago lupulina</i>	<i>E. sesbaniae</i>	Wang et al. 2013
	<i>Medicago laciniata</i>	<i>E. meliloti</i>	Badri et al. 2007
	<i>M. ciliaris</i>	<i>E. meliloti</i>	Djedidi et al. 2011
		<i>E. medicae</i>	Djedidi et al. 2011
	<i>M. polymorpha</i>	<i>E. meliloti</i>	Djedidi et al. 2011
		<i>E. medicae</i>	Djedidi et al. 2011
	<i>M. minima</i>	<i>E. meliloti</i>	Djedidi et al. 2011
	<i>M. rigiduloïdes</i>	<i>E. meliloti</i>	Gubry-rangin et al. 2013
Melilotus	<i>Melilotus alba</i>	<i>E. meliloti</i>	Bromfield et al. 2010
		<i>E. medicae</i>	Bromfield et al. 2010
		<i>E. morelense</i>	Bromfield et al. 2010

2.1.4.1. Le genre *Ensifer* (*Sinorhizobium*)

Ce genre constitue la deuxième sous-branche de la branche de *Rhizobium/Ensifer/Shinella* dans le sous classe *Alpha-Proteobacteria*. Ce genre inclut actuellement 18 espèces (tableau3) (Peix et al. 2015).

En 1988, le genre *Ensifer* a été séparé des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* et proposé comme nouveau genre des rhizobia à croissance rapide symbiotiques du soja. L'espèce *Rhizobium meliloti* a été transférée au genre *Ensifer* et devient *Ensifer meliloti* avec

deux autres espèces supplémentaires, *E. saheli* et *E. teranga* symbiotes d'*Acacia* et de *Sesbania* (Willems 2006 ; Peix et al. 2015).

Tableau 3 : Les espèces du genre *Ensifer* (Peix et al. 2015)

Nom	Année	Plante hôte	Référence
<i>E. meliloti</i>	1926	<i>Melilotus, Medicago, Trigonella</i>	Dangeard (1926)
<i>E. fredii</i>	1984	<i>Glycine, Vigna, Cajanus,</i>	Scholla et Elkan (1984)
<i>E. xinjiangense</i>	1988	<i>Glycine</i>	Chen et al. (1988)
<i>E. saheli</i>	1994	<i>Sesbania, Acacia</i>	de Lajudie et al. (1994)
<i>E. teranga</i>	1994	<i>Sesbania</i>	de Lajudie et al. (1994)
<i>E. medicae</i>	1996	<i>Medicago</i>	Rome et al. (1996)
<i>E. arboris</i>	1999	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick et al. (1999)
<i>E. kostiense</i>	1999	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick et al. (1999)
<i>E. kummerowiae</i>	2002	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Wei et al. (2002)
<i>E. morelense</i>	2002	<i>Leucaena leucocephala</i>	Wang et al. (2002)
<i>E. adhaerens</i>	2003	<i>Medicago sativa, Leucaena leucocephala, Pithecellobium dulce</i>	Willems et al. (2003)
<i>E. americanum</i>	2003	<i>Acacia spp</i>	Toledo et al. (2003)
<i>E. mexicanus</i>	2007	<i>Acacia angustissima</i>	Lloret et al. (2007)
<i>E. garamanticus</i>	2010	<i>Argyrobium uniflorum, Medicago sativa</i>	Merabet et al. (2010)
<i>E. numidicus</i>	2010	<i>Argyrobium uniflorum, Lotus creticus</i>	Merabet et al. (2010)
<i>E. sojiae</i>	2011	<i>Glycine max</i>	Li et al. (2011)
<i>E. psoraleae</i>	2013	<i>Psoralea corylifolia, Sesbania cannabina</i>	Wang et al. (2013)
<i>E. sesbaniae</i>	2013	<i>Sesbania cannabina, Medicago lupulina</i>	Wang et al. (2013)

2.1.4.1.1. Caractères

Les bactéries de ce genre sont de 0.5 à 0.9 μm de large et 1.2 à 3 μm de long, elles sont mobiles par un flagelle polaire ou par flagellation péritriche, elles sont Gram négatif, aérobies accumulant le PHB.

La température optimale de croissance pour les membres du genre *Ensifer* est de 25 à 30°C, ils peuvent tolérer des températures entre 10 et 35°C, le pH optimal est de 6.8 et ils peuvent croître sur une gamme de pH entre 5 et 10.5. Les bactéries du genre *Ensifer* généralement peuvent tolérer une salinité de 10 g/l de NaCl (Willems 2006).

2.2. Les rhizobia dans l'environnement aride

Plusieurs facteurs influencent la survie et l'activité des rhizobia dans l'environnement aride, tel que la température, l'humidité, la salinité, et le contenu en matière organique.

2.2.1. La sécheresse

Le potentiel hydrique du sol peut influencer la relation symbiotique entre les légumineuses et les rhizobia. Dans les conditions de sécheresse élevée la nodulation peut être faible et/ou inefficace.

La sécheresse peut aussi influencer la survie des rhizobia pendant leur vie saprophyte. En outre, la diminution de l'humidité du sol réduit la formation des cordons d'infection inhibant ainsi le processus de nodulation.

L'aridité peut inhiber aussi la fixation d'azote quand la nitrogénase étant très sensible aux variations, même faibles, du potentiel osmotique du sol (Zahran 1999 ; Cacciari et al. 2003).

2.2.2. La salinité

Les sols salins, qui se forment en général dans les conditions d'aridité et des températures élevées, sont souvent alcalins et peuvent présenter une disponibilité réduite en phosphore, fer, zinc et manganèse.

Une interaction entre salinité, pH et températures élevées présente des effets plus néfastes sur la symbiose que si chacun de ces facteurs est pris séparément (Cacciari et al. 2003).

Le sel exerce un double effet sur les rhizobia ; un effet spécifique dû à la toxicité des ions et un deuxième lié au potentiel osmotique.

Toutefois, le stress hydrique étant en général de durée limitée, il suffit que les microorganismes puissent y survivre un certain laps de temps, mais la salinité est permanente et les microorganismes doivent s'y adapter afin, non seulement de survivre, mais aussi de se reproduire (Priefer et al. 2001).

De nombreuses espèces bactériennes s'adaptent aux conditions salines par l'accumulation intracellulaires des molécules organiques appelées les osmolytes. Souvent, l'accumulation de ces osmolytes contrarie l'effet de la déshydratation causé par le stress hydrique mais elle n'interfère pas avec les macromolécules structurales ou fonctionnaires, les rhizobia utilisent ce mécanisme d'adaptation osmotique.

Plusieurs molécules ont été identifiées comme osmolytes, on prend par exemple :

- L'osmolyte, N-acétylglutaminyl-glutamine amide, s'accumule dans les cellules d'*E. meliloti*; cette accumulation dépend sur le niveau du stress osmotique, la phase de croissance de la culture, la source du carbone, et la présence d'osmolytes dans le milieu de culture.
- Le tréhalose est un disaccharide qui joue un rôle dans l'osmo-régulation quand les rhizobia poussent sous conditions de salinité ou de stress osmotique. Le tréhalose s'accumule à des niveaux très élevés dans les cellules de certains rhizobia sous l'augmentation de la pression osmotique causé par une hyper salinité. Les rhizobia à croissance rapide accumulent le tréhalose en présence de plusieurs sources du carbone (mannitol, saccharose ou lactose), mais celles à croissance lente ne l'accumulent que si elles sont cultivées sur le mannitol comme source de carbone.
- Le saccharose et l'ectoïne ont été définis comme osmoprotecteurs chez *Ensifer meliloti*. Cependant, ces composés, contrairement à d'autres osmoprotecteurs bactériens, ne sont pas accumulés comme osmolytes cytosolique dans les cellules d'*E. meliloti*. L'ectoïne ne s'accumule pas intracellulairement et par conséquent ne réprime

pas la synthèse des solutés compatibles tels que le glutamate ou le tréhalose; il peut jouer un rôle clé dans le déclenchement de la synthèse des osmolytes endogènes.

- L'accumulation de la glycine betaine, dans les cellules des rhizobia a été aussi identifiée comme autre mécanisme de réponse au stress osmotique ou salin. Ce substrat osmoprotectif joue un rôle considérable dans l'entretien de l'activité de la nitrogénase dans les bactéroïdes sous stress salin.

Par conséquent, au moins deux classes distinctes d'osmoprotecteurs existent: ceux tel que la glycine betaine ou le glutamate qui agissent comme osmolytes authentiques, et ceux tel que l'ectoïne qui agissent comme médiateurs chimiques.

D'autres types d'osmolytes ont été aussi caractérisés tel que les acides aminés (homospéridine) ou les cations (Na^+ , K^+ ou Mg^+).

Le changement morphologique des cellules bactériennes a été décrit comme autre mécanisme d'adaptation au stress salin. La structure des cellules rhizobiales a paru comme spirale ou filamenteuse, l'ultrastructure a été affectée sévèrement, l'enveloppe cellulaire a été déformée et le cytoplasme a été interrompu.

Le stress salin influence aussi la synthèse des lipopolysaccharides et des polysaccharides extracellulaires et capsulaires (LPS, EPS et CPS) indispensables dans les étapes de la nodulation.

2.2.3. La température

Dans les sols désertiques, la température pendant les mois chauds (Avril à Septembre) peut être assez élevée et avoir un effet pasteurisant sur la microflore dans la couche de surface, alors que pendant les nuits froides la température diminue à un niveau qui peut inhiber l'activité microbienne (Abdel-Ghaffar 1989).

Pour les rhizobia, la température affecte l'étape initiale de nodulation; la différenciation des bactéroïdes; la structure et le fonctionnement des nodules (Zahran 2001; Priefer et al. 2001; Cacciari et al. 2003; Asadi Rahmani et al. 2009; Thami-Alami et al. 2010).

Pour la majorité des rhizobia, la température optimale de croissance est entre 28 et 31°C et plusieurs souches sont incapables de persister à 37°C. Le stress thermique (35 à 40°C) cause des changements dans le modèle de synthèse des LPS ce que contribue à la fréquence des isolats non infectives dans les sols affectés par un stress thermique (Zahran 2001 ; Priefer et al. 2001).

En réponse à ce type de stress, des protéines de choc thermique ont été détectées chez les souches rhizobiennes. La synthèse de ces protéines a été avérée chez les deux types des rhizobia tolérantes et sensibles aux chaleurs (Zahran 1999).

2.3. Mécanisme de la symbiose légumineuse-rhizobia et la fixation d'azote

2.3.1. Spécificité d'hôte

Trois sous-familles des légumineuses principales sont distinguées: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* et *Papilionoideae*. Les *Papilionoideae* sont les plus importants en agriculture (De Lajudie et al. 1998 ; Hirsch et al. 2001 ; Franche et al. 2009). Les *Mimosoideae* ont eu l'attention récemment, depuis, que des rhizobia appartiennent à la sous-classe du *bêta-Proteobacteria* ont été isolées de leurs nodules, alors que les symbiotes des *Papilionoideae* appartiennent à la sous-classe *alpha* (Franche et al. 2009).

La spécificité d'hôte peut être définie par la diversité taxonomique des partenaires auxquels la symbiote rhizobienne peut s'associer. La spécificité peut être stricte (une seule espèce bactérienne avec un seul genre de légumineuse) ou plus large (Prin et al. 1993 ; Mahmoud et al. 2008).

Les rhizobia, sont en général spécifiques vis-à-vis de leur plante-hôte associée. Leur spectre d'hôte étroit n'exclut pas toutefois l'existence de quelques transgressions d'un groupe d'inoculation croisée à un autre (Prin et al. 1993).

2.3.2. Modulateurs et mécanisme de la symbiose

Pour former une relation symbiotique, les bactéries, doivent migrer vers la rhizosphère, la région autour des racines. Cette spécificité exige qu'il y ait un mécanisme (qui inclut différents éléments) pour la communication et la reconnaissance entre les partenaires symbiotiques (Schultze et al. 1992 ; Shamseldin et al. 2008 ; Franche et al. 2009).

2.3.2.1. Les flavonoïdes

Plus de 4000 flavonoïdes différentes ont été identifiées chez les plantes vasculaires, et seulement un ensemble particulier d'entre eux est impliqué dans la spécificité de l'hôte (Shamseldin et al. 2008 ; Hirsch et al. 2001).

Les flavonoïdes, excrétés par les racines de la plante hôte sont des dérivés de phénylpropanoïdes (Schultze et al. 1992 ; Foret 2004).

Structure : les flavonoïdes se constituent de deux cycles de benzène liés à travers un hétérocyclique pyrone (fig.3).

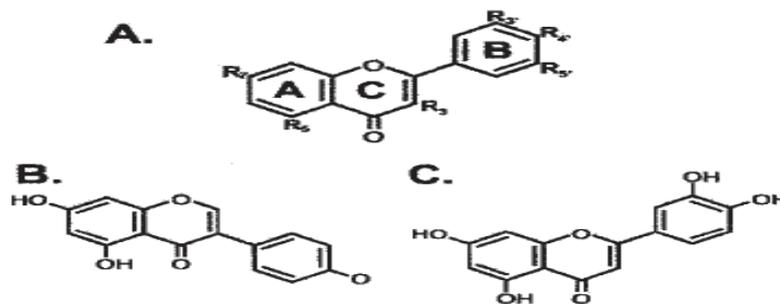


Fig. 3 : Structure des flavonoïdes :A : structure générale d'un flavonoïde. les changements sur le cycle ou dans les groupes R résultent : les flavonols, flavones, flavanones, et autres. B : inducteur d'isoflavonoïde, C : luteoline un inducteur du flavone (Hirsch et al. 2001)

Les isoflavonoïdes produites par les graines de chaque légumineuse, sont des inducteurs des gènes *nod* de leur microsymbiote. Cette spécificité permet aux rhizobia de distinguer leurs hôtes parmi des autres légumineuses (Hirsch et al. 2001).

Rôle : Ils agissent comme des molécules signaux exsudés dans la rhizosphère à travers les racines de la plante. Ces flavonoïdes influencent une série des gènes chez les rhizobia, les gènes *nod*, impliqués dans l'infection et la formation des nodules.

Ces signaux peuvent être reconnus par un récepteur bactérien spécifique, NodD (produits du gène *nodD*), qu'il agit comme un activateur de transcription d'autres gènes de nodulation (Cohen et al. 2001 ; Steinkellner et al. 2007 ; Subramanian et al. 2007; Franche et al. 2009).

2.3.2.2. Gènes de nodulation

La plupart de ces gènes sont localisés sur un plasmide (John et al. 1985 ; Franche et al. 2009).

Ces gènes sont impliqués dans le dialogue moléculaire: ils permettent de reconnaître les signaux de la plante, en général des flavonoïdes, qui activent le programme symbiotique précoce de la bactérie, et déterminent donc en retour la synthèse et la sécrétion des signaux bactériens, les facteurs Nod (Steinkellner et al. 2007 ; Shamseldin et al. 2008 ; Gough2009).

La capacité des rhizobia à former des nodules dépend sur la présence dans leur génome d'un ensemble de gènes de nodulation (gènes *nod*, *nol*, *noe*) indispensables à la symbiose (Masson-Boivin et al. 2006).

Les gènes de structure sont de deux types spécifiques à l'espèce, et les gènes qui sont communs à toutes les espèces des rhizobia :

- 1- **Les gènes communs *nodABC*** : les gènes communs (gènes de structures) *nodA*, *nodB* et *nodC* sont des gènes clés de la nodulation, codent pour les enzymes impliquées dans la synthèse du lipochitooligosaccharide. Ils sont responsables de la synthèse du squelette commun des facteurs Nod (Masson-Boivin et al. 2006 ; Roche et al. 1996 ; Bladergroen et Spaink 1998).

Ces gènes sont conservés chez tous les rhizobia, ils sont fonctionnellement équivalents entre les espèces rhizobial (Schultze et al. 1992 ; Roche et al. 1996).

- 2- **Les gènes *nod* spécifiques** : sont les déterminants majeurs de la spécificité de l'hôte. Chaque espèce de rhizobia est caractérisée par une combinaison donnée des gènes *nod*, qui codent pour des enzymes impliquées dans le griffage du squelette lipochitooligosaccharidique du facteur Nod avec les substitutions qui confèrent la spécificité de l'hôte (Roche et al. 1996 ; Bladergroen et Spaink 1998).

2.3.2.3. Facteurs Nod

Les facteurs Nod constituent les signaux principaux pour le développement de la symbiose. Ils constituent des molécules indispensable pour la première étape de l'infection (Shamseldin et al. 2008 ; Cooper 2007).

Structure : C'est une molécule constituée d'un squelette lipochitooligosaccharidique sur lequel des résidus de différentes natures (R1, R2...) sont ajoutés (fig.4) (Long 1996 ; Hirsch et al. 2001 ; Shamseldin et al. 2008).

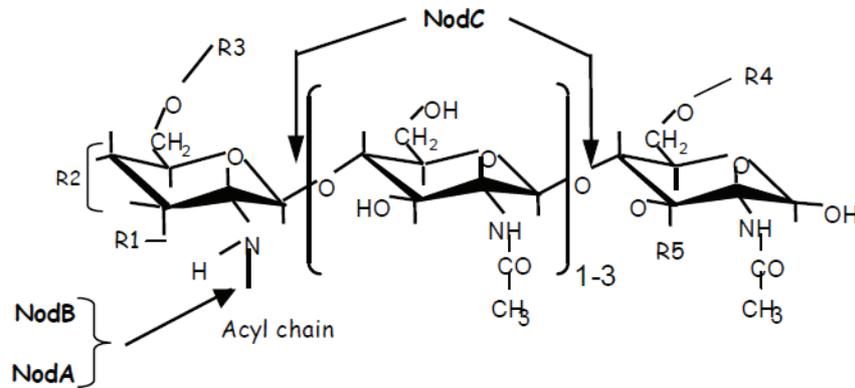


Fig. 4: Structure et synthèse du squelette de base des facteurs Nod (Masson-Boivin et al. 2006)

Les facteurs Nod de toutes les espèces rhizobial appartiennent à la même famille chimique.

Cependant, les substitutions produits sur le squelette de base définissent la spécificité d'hôte de chaque espèce rhizobienne (Long 1996 ; Roche et al. 1996 ; Hirsch et al. 2001).

Rôle : Ils provoquent une gamme de réponses chez la plante telle que :

- Ils agissent comme molécules signales et induisent la formation des nodules (Franche et al. 2009 ; Masson-Boivin et al. 2006).
- Ils sont inclus dans la dépolarisation de la membrane plasmique (Cooper 2007).
- Ils agissent comme régulateurs spécifique de croissance bactérienne dans les hôtes légumineuses (Roche et al. 1996).

2.3.3. Etapes du processus de nodulation

L'établissement de la symbiose entre les rhizobia et les plantes hôtes nécessite une communication moléculaire entre les deux partenaires, il comprend 4 étapes essentielles (fig. 5).

2.3.3.1. La pré-infection

Les bactéries sont attirées par des produits flavonoïdes ou isoflavonoïdes (molécules signales) exsudées par les racines. Les rhizobia reconnaissent ces flavonoïdes et d'autres molécules qui sont sécrétées par la plante hôte. Ces molécules induisent la production des facteurs Nod par les rhizobia, qui déclenchent le programme de nodogénèse chez la plante hôte (Margaret et al. 2001 ; Subramanian et al. 2007 ; Cooper 2007).

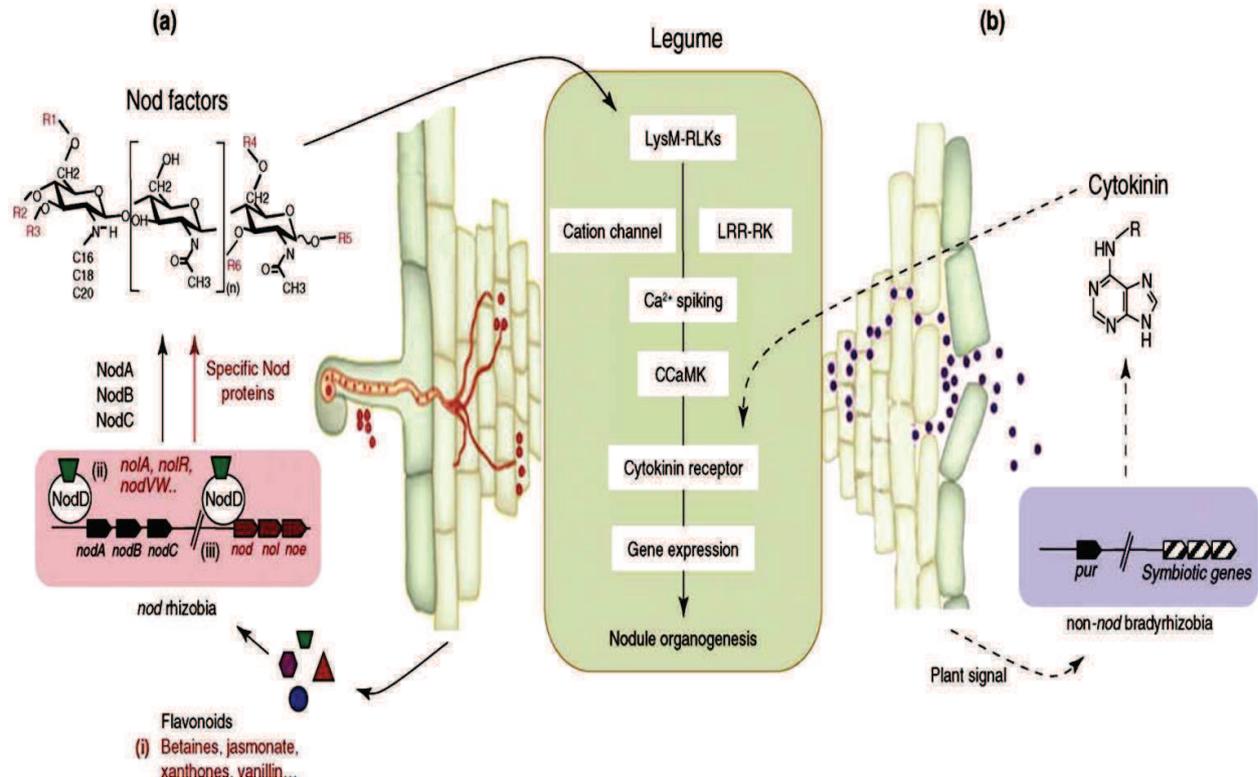


Fig. 5 : Mécanismes de nodulation chez les rhizobia. Les rhizobia induisent la formation de nodules sur des légumineuses utilisant un processus NF-dépendant (a), ou un processus NF-indépendant (b) (Masson-Boivin et al. 2009)

Les rhizobia de la rhizosphère migrent vers les racines des plantes hôtes par le phénomène de chimiotactisme (Franche et al. 2009).

Le processus d'infection début par une augmentation du nombre des bactéries au niveau de la racine (Mergaert et al. 2001 ; Cooper 2007).

Des facteurs de surface comme la protéine rhicadhésine, les polysaccharides capsulaires (CPS) ; les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS) chez la bactérie et la

lectine et autres adhésines chez la plante sont inclus dans la reconnaissance et l'attachement des bactéries à la plante (Long 1996 ; Cohen et al. 2001).

Ensuite, le poil se recourbe de façon caractéristique et comprime les bactéries engagées dans la couche mucilagineuse de la surface de la paroi et un filament d'infection se développe (Hirsch et al. 2001).

2.3.3.2. Phase d'infection et de formation des nodules

L'infection consiste à la pénétration des rhizobia en différents points du système racinaire.

Après avoir pénétré dans les poils absorbants, les bactéries sont entourées par un filament d'infection. Un méristème nodulaire est donc à former dans la racine pendant que les rhizobia entrent à travers le filament formé pour faciliter l'entrée du rhizobia aux couches les plus profondes. Le cordon (filament) d'infection poursuit sa progression en se ramifiant et déverse les bactéries dans les cellules du méristème nodulaire (Franche et al. 2009).

2.3.3.3. Maturité du nodule

Le stade final du processus infectieux est atteint lorsque les bactéries sont déversées dans la cellule hôte (fig.6).

Les rhizobia se libèrent du filament d'infection et sont enveloppées dans une membrane dérivée de la plante, appelé symbiosome (Franche et al. 2009).

Les bactéries finalement arrêtent de se diviser et se transforment en bactéroïdes entourés d'une membrane, nommée membrane pér bactéroïdienne qui a pour rôle de stabiliser le système hôte/bactéroïde ; si elle est endommagée, les bactéries vont se libérer dans le cytoplasme et considérées comme des corps étrangers et donc détruits par la cellule hôte (Jordan 1962 ; Franche et al. 2009 ; Masson-Boivin et al. 2009).

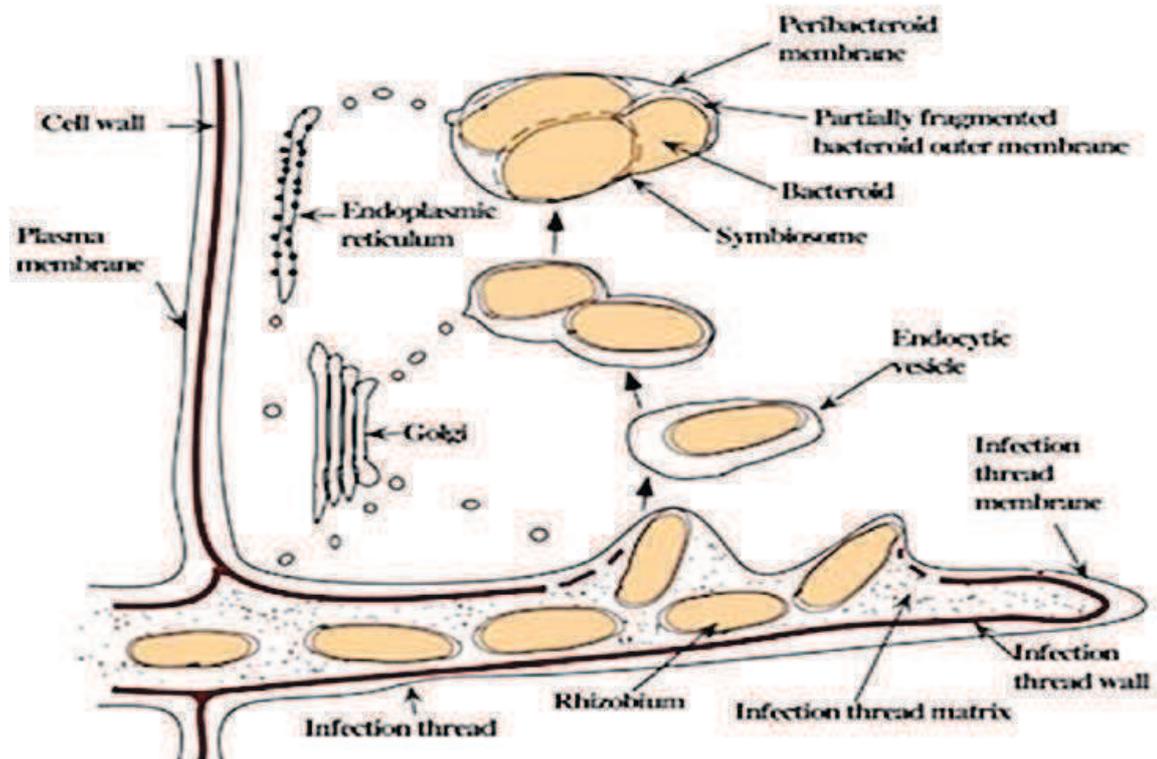


Fig. 6 : Libération des rhizobia dans le cytosol de la cellule hôte (Franche et al. 2009)

D'autres mécanismes d'infection sont aussi décrits tel que : l'infection par *crack entry* et la pénétration entre cellules épidermiques (Franche et al. 2009).

2.3.3.4. Phase de dégénérescence

Chez les nodosités âgées, les cellules végétales dégénèrent. Les membranes des symbiosomes seront désagrégées, les bactéroïdes se transforment en bactéries, ces dernières sont libérées dans le sol, et la plante résorbe les produits (Mergaert et al. 2001).

2.3.4. Forme des nodules

Les nodules induits chez les légumineuses peuvent prendre deux formes : cylindrique (type indéterminé) ou sphérique (type déterminé) (fig.7) (Gough 2009).

Le mode de fonctionnement du méristème explique la différence morphologique :

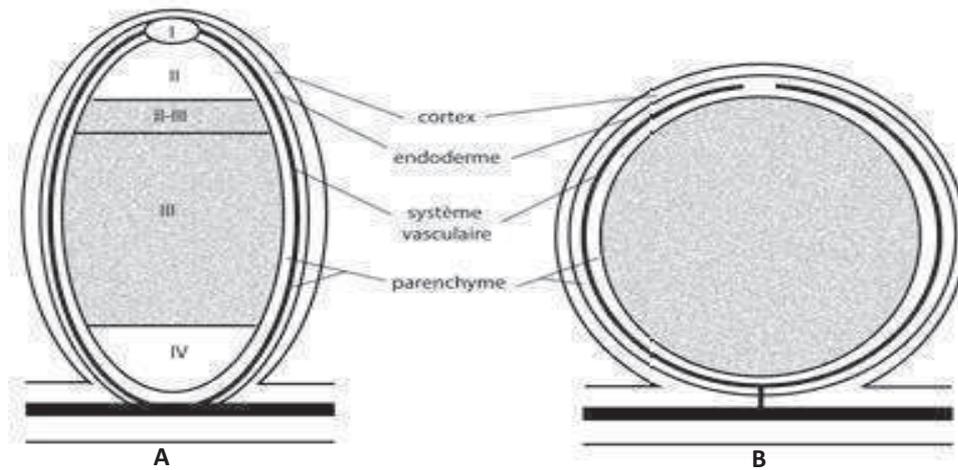


Fig. 7 : Structure des nodules chez les légumineuses. **A :** nodule de légumineuse de type indéterminé. **B:** nodule de légumineuse de type déterminé (Gough 2009)

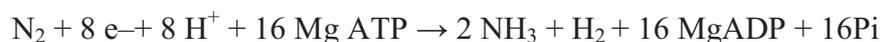
- une activité méristématique continue aboutit à la formation de nodosités de type indéterminé. Ce type est formé dans les symbioses entre les rhizobia à croissance rapide (ex : *Ensifer meliloti*) et les légumineuses des régions tempérées (ex : *Medicago* et *Melilotus*) (Gough 2009).
- Une activité méristématique limitée aboutit à la formation des nodules de type déterminé. Ce type est généralement induit par les *Bradyrhizobium* en symbiose avec les légumineuses des régions tropicales (Gough 2009).

2.3.5. Mécanisme moléculaire de fixation d'azote atmosphérique

La réduction de l'azote à l'intérieur du nodule exige de l'énergie qui est fourni par la plante. La photosynthèse produit du saccharose transporté au nodule et convertie dans le cytosol de la plante en acides dicarboxyliques qui fournissent les bactéroïdes avec le carbone et l'énergie à travers la membrane du symbiosome.

Pour la génération d'énergie par respiration, un haut flux mais avec une concentration interne faible d'oxygène est accompli à l'aide de leghémoglobine (Franche et al. 2009).

La fixation de l'azote est une réaction de réduction de l'azote moléculaire N_2 en ammoniac NH_3 (ou ammonium NH_4^+), l'équation de la réaction chimique est :



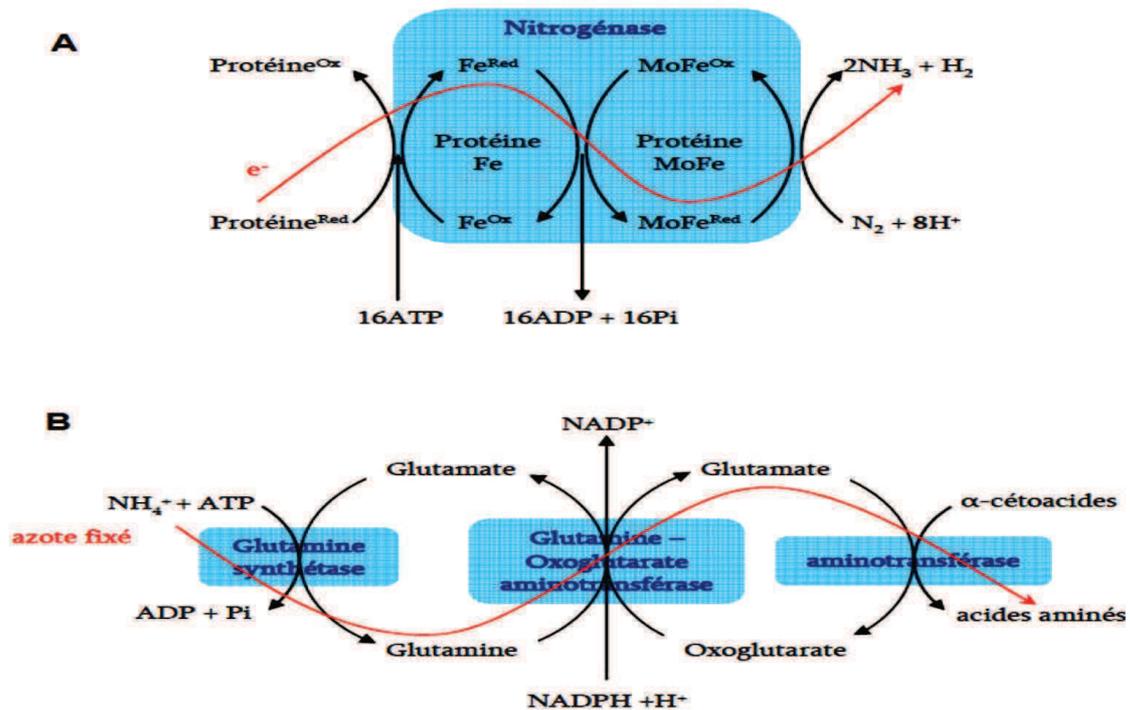


Fig. 8 : Mécanismes biochimiques impliqués dans la fixation d'azote. A ; mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote en ammoniacque par la Nitrogénase. B ; cycle GS-GOGAT qui permet l'assimilation de l'azote fixé dans le métabolisme de la cellule (Masson-Boivin et al. 2009)

L'équation indique qu'une molécule d'azote atmosphérique N_2 se combine avec des protons H^+ pour former deux molécules d'ammoniacque (2NH_3) et deux molécules d'hydrogène en gaz (2H_2). Cette réaction est menée par une enzyme appelée la nitrogénase. L'ammoniacque (NH_3) formé est convertie en acide aminé, la glutamine ou l'asparagine par les bactéroïdes et transporté dans le cytosol de la plante à travers la membrane du symbiosome (fig. 9) (Franche et al. 2009).

2.3.5.1. Les gènes de fixation d'azote

a- Les gènes *nif*

Les gènes *nif* ou gènes de la nitrogénase, également découverts sur les plasmides bactériens, sont impliqués dans la synthèse des constituants de la nitrogénase et dans la fixation d'azote. Ils interviennent seulement après la formation du nodule (Masson-Boivin et al. 2009).

b- Les gènes *fix*

Ce sont des gènes spécifiques impliqués dans la fixation d'azote.

Les produits des gènes *fixABCX* sont impliqués dans le transfert des électrons à la nitrogénase chez les rhizobia. Ces produits sont des flavoprotéines, alors que les gènes *fix N, O, Q, P* codent pour le cytochrome oxydase, et *fix G, H, I, S* codent pour la pompe cationique impliquée dans le processus d'oxydo-réduction dans le complexe membranaire (Masson-Boivin et al. 2009).

c- Les gènes de la plante hôte

Ce sont des gènes spécifiques qui codent pour les protéines de types nodulines dont les unes participent à la formation des nodosités et les autres ne s'expriment qu'après la formation du nodule ; c'est le cas du gène de la leghémoglobine, ou encore des enzymes intervenant dans la synthèse des phytohormones et des acides aminés. Ces nodulines sont codées par des gènes *nod* localisés dans le génome de la plante hôte (Bladergroen et al. 1998).

2.3.5.2. Les protéines de la fixation d'azote

a- Les nodulines : représentent chacune des protéines des nodosités fixatrices d'azote, codées par des gènes spécifiques de la plantes.

Selon le temps de leur apparition, il existe des nodulines précoces précédant et accompagnant l'infection (ex : End2, End12), et des nodulines tardives apparaissent au début de la fixation de l'azote (Foret 2004 ; Bladergroen et al. 1998).

- 1- **Les nodulines précoces**, ont un rôle dans les événements des signaux précoces et le processus d'infection (Bladergroen et al. 1998).
- 2- **Les nodulines tardives**, participent principalement dans la régulation de l'entrée des bactéries à l'intérieur du nodule, provoquent la transformation des bactéries en bactéroïdes et supportent le processus de fixation d'azote. Comme exemple des gènes des nodulines tardives avec une fonction connue c'est la leghémoglobine (Bladergroen et al. 1998).

b- La nitrogénase : c'est un complexe enzymatique des bactéries fixatrices d'azote catalyse le transfert des protons ou des électrons. Elle est constituée de deux

protéines (fig.10): une dinitrogénase réductase est un dimère de 68,000 Da, et une dinitrogénase (constituée de deux sous-unités α et deux sous-unités β) qui est une tétramère de 220,000 Da.

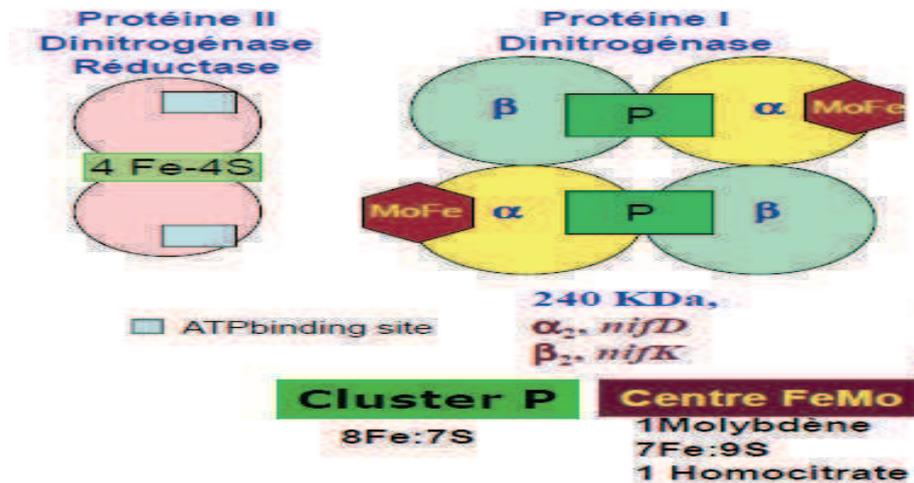


Fig. 9 : Les composants de la nitrogénase (Foret 2004)

Les deux composants contiennent du fer et également du molybdène. Le fer et le molybdène de la dinitrogénase sont situés dans un cofacteur nommé FeMo (Franche et al. 2009 ; Foret 2004).

L'ammoniaque joue un rôle important dans la répression et la dépression de la synthèse de la nitrogénase. Des gènes spécifiques du microsymbiote sont responsables de ces régulations (Masson-Boivin et al. 2009).

c- La leghémoglobine : c'est une chromoprotéine de 17500 Da, voisine de l'hémoglobine, présente dans les nodosités fixatrices d'azote des légumineuses. La leghémoglobine est la noduline la plus abondante dans les nodules; elle a pour fonction de transporter l'oxygène facilitant ainsi la diffusion de l' O_2 aux bactéroïdes (Franche et al. 2009).

La globine (la partie protéique) est codée par un gène de la plante alors que l'hème (la partie prosthétique) est codé par un gène de la bactérie.

2.3.6. La symbiose fixatrice d'azote dans l'environnement aride

Les plantes légumineuses sont fréquemment cultivées dans les sols dégradés des régions aride et semi-aride parce qu'elles présentent un grand pouvoir de se développer dans les sols très pauvres qui sont inaptes pour la plupart des récoltes (Thami-Alami et al. 2010). En outre, la relation symbiotique rhizobia-légumineuse constitue le mécanisme majeur de réduction de l'azote atmosphérique dans la biosphère.

Cependant, la nodulation et la fixation d'azote dépend de l'espèce, l'âge de la plante, les caractéristiques du sol, ainsi que la disponibilité d'eau.

Les rhizobia montrent, en général, une faible persistance dans les sols, ce qui peut entraîner une nodulation insatisfaisante des légumineuses et une réduction conséquente de leur productivité.

Il semble aussi que le type du sol influence fortement l'aptitude de survivre et l'efficacité symbiotique des espèces rhizobiennes (Cacciari et al. 2003).

ETUDE
EXPÉRIMENTALE

MATÉRIELS ET
MÉTHODES

Chapitre IV : Matériels et méthodes

1. Présentation de la région d'étude

Le site de l'Oued Righ est une vallée parsemée de 47 oasis dont Touggourt est la capitale (fig. 10). La vallée de l'Oued Righ s'étale sur deux wilayas, El-Oued et Ouargla, entre la latitude 32° 54' et une longitude 34° 09' et s'allonge sur 160 km du Sud au Nord et une largeur de 10 à 40 km.

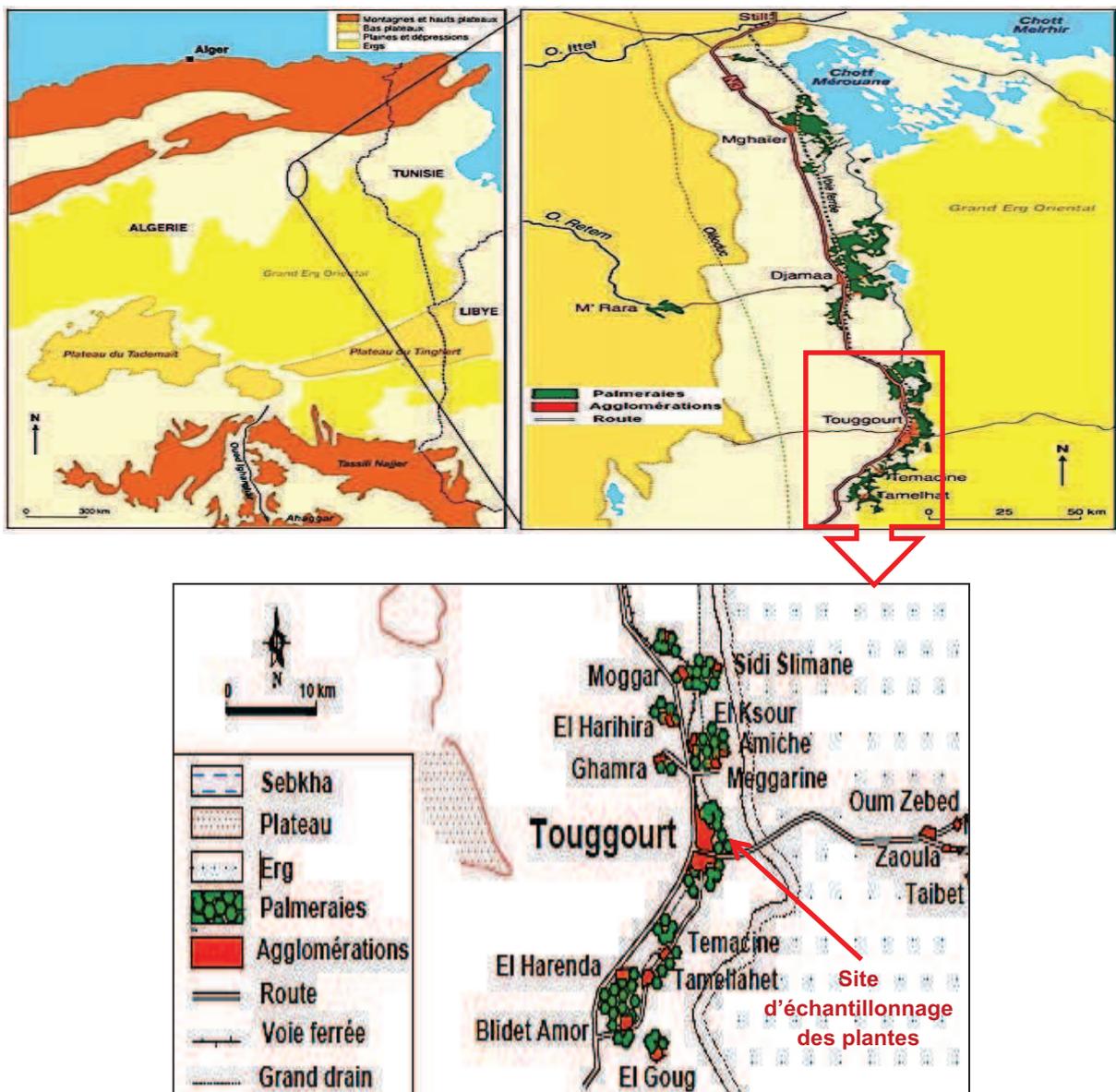


Fig.10 : Vallée de l'Oued Righ et site d'échantillonnage

Grâce à la disponibilité en eau et les conditions climatiques, Oued Righ est la première région dattier du Sahara algérien en quantité (1,7 million de palmiers) et qualité (forte proportion de Deglet Nour) (Chaouche Bencherif 2008).

La région d'Oued-Righ est caractérisée par un climat hyper aride, accusant des écarts de températures importants entre le jour et la nuit et entre les saisons (voir annexe 1) (Achour et al. 2011).

La température moyenne annuelle est de 22°C. La température moyenne des maxima enregistrée durant le mois d'Août est supérieure à 40.3°C alors que la température moyenne des minima enregistrée durant le mois de Janvier est de 5.1°C (Achour et al. 2011).

Les températures en mois de Juin, Juillet et Août constituent à elles seules plus de 36 % de la somme des températures de l'année (Achour et al. 2011).

Les précipitations sont rares et irrégulières, estimées à une moyenne de 61.9 mm par an (Achour et al. 2011).

Les vents sont fréquents et violents surtout durant la période s'étalant de Mars à Juillet (Achour et al. 2011).

L'humidité relative de l'air est faible, estimée d'une moyenne de 47.4 %, la plus élevée est enregistrée au mois de Décembre (65.1 %) et les plus faibles aux mois de Juillet et Août (respectivement : 32 et 35 %) (Achour et al. 2001).

La technique d'irrigation la plus utilisée est la submersion (inondation) par planche (Achour et al. 2011).

1.1. Nature du sol

La couverture pédologique de la vallée d'Oued-Righ présente une grande hétérogénéité. Elle est composée essentiellement des sols minéraux bruts, des sols peu évolués, des sols halomorphes et des sols hydromorphes (Achour et al. 2011).

La fraction minérale est constituée dans la majorité des cas de sable. Toutefois, certaines zones de superficie relativement faible présentent une texture argileuse. La fraction organique est très faible, elle est en général inférieure à 1 %. Le pH est légèrement alcalin (7,5 à 8,8) (Achour et al. 2011).

L'action conjuguée d'un climat caractérisé par une évapotranspiration intense et la présence d'une nappe peu profonde fait que la plupart des sols ont subi le phénomène de salinisation secondaire (Achour et al. 2011).

1.2. Site d'échantillonnage des plantes

Les plants de *Medicago littoralis* Rhode et *Melilotus indicus* (L.) All. utilisées dans cette étude sont récoltés de l'oasis de la Daïra de Touggourt. Cette récolte a été réalisée à partir de l'oasis située le long de la commune de Zaouia El Abidia.

2. Matériels utilisés

2.1. Matériels biologiques

- Nodules des légumineuses sauvages récoltées des sols de la région d'étude (*Medicago littoralis*, *Melilotus indicus*).
- Graines de *Medicago littoralis*.
- Graines de *Medicago ciliaris*.
- Graines de *Melilotus indicus*.
- Souches de références : *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* 1021 ; *Mesorhizobium ciceri* ; *Agrobacterium tumefaciens* C54.

2.2. Milieux de culture

Les milieux de culture et leurs compositions sont donnés au fur et à mesure dans la partie des méthodes.

2.3. Matériels

2.3.1. Principaux appareils

- Etuves bactériologiques.
- Réfrigérateur.
- Autoclave, four Pasteur.
- Distillateur.
- Balances ; pH mètre.
- Agitateur ; vortex.
- Bain-marie.
- Microscope optique.

2.3.2. Colorants réactifs et autres

- Solution de rouge Congo (RC) ; bleu de bromothymol (BBT) ; pourpre de bromocrésol (BCP).

- Solution de violet de Gentiane ; solution de Lugol ; solution de Fuschine.
- Alcool ; eau oxygénée, eau physiologique, eau de javel.
- Réactifs pour le test API 20NE : Kovacs ; nitrate réductase I et II.
- Réactif de Benedict.
- Antibiotiques, en disques : Streptomycine (30 µg), ampicilline (30 µg), chloramphénicol (30 µg), tétracycline (30 µg), acide nalidixique (30 µg), kanamycine (30 µg) ; en poudre : rifampicine, érythromycine et néomycine.

3. Méthodes

3.1. Collecte et conservation des nodules

- Les légumineuses sauvages (*Medicago littoralis* et *Melilotus indicus*) ont été récoltées en période de floraison (mois de Mars).
- Les racines avec les nodules sont bien lavées à l'eau courante pour éliminer les débris de sol (Somasegaran et Hoben 1985).
- Les nodules ont été détachés des racines (Somasegaran et Hoben 1985).
- Les nodules sont séchés dans l'ombre à l'air libre pour être conservés dans des récipients adéquats.

3.2. Isolement des bactéries à partir des nodules

Les nodules conservés par dessiccation doivent être réhydratés pendant une nuit dans de l'eau distillée stérile dans le réfrigérateur (Somasegaran et Hoben 1985).

3.2.1. Stérilisation de la surface des nodules

Les nodules sont immergés dans une solution d'hypochlorite à 2 % pendant 4 min, ensuite, ils sont rincés abondamment (5 fois) avec de l'eau distillée stérile (Somasegaran et Hoben 1985).

3.2.2. Ecrasement des nodules et ensemencement des boîtes

- Les nodules stérilisés sont mis dans des tubes stériles (à hémolyse ou à essai), avec un volume de 0.5 ml d'eau distillée stérile (1 nodule par tube).
- A l'aide d'une barre en verre stérilisée, on écrase les nodules pour obtenir une suspension de bactéroïdes.

- A l'aide d'une anse de platine, on prend une goutte de la suspension, et on l'étale sur une boîte de Pétri contenant le milieu YEMA au rouge Congo dont la composition est celle donnée par Somasegaran et Hoben (1985) dans les tableaux (4 et 5).

Tableau 4: Composition de la solution du Rouge Congo (RC)

Ingrédients	Quantité
Rouge Congo	0,25 g
Eau distillée	100 ml

Tableau 5: Composition du milieu de Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA)

Ingrédients	Quantité
Mannitol	10 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrait de levure	0,5 g
Eau distillée	1 L
Agar	15 g
pH	6,8
solution de rouge Congo	10 ml/L

L'ensemencement est réalisé selon la technique des cadrans pour avoir des colonies bien isolées.

Incubation

Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées à une température de 28°C et à l'obscurité.

Lecture

Après trois à cinq jours d'incubation, les colonies peuvent être observées sur les boîtes.

3.3. Examen microscopique des isolats : coloration à la Fuschine

Selon Somasegaran et Hoben (1985) la technique consiste à :

- Flamber la lame après l'avoir essuyé avec une compresse alcoolisée.
- Préparer un frottis avec les isolats.
- Couvrir tout le frottis avec la Fuschine et laisser agir pendant 10 à 20 secondes.
- Effectuer un rinçage à l'eau.
- Faire sécher le frottis entre deux feuilles de papier absorbant.
- Avant l'observation au microscope, on dépose sur le frottis une goutte d'huile à immersion.
- Observer à l'objectif à immersion (x 100).

3.4. Purification des isolats

Après l'isolement à partir des nodules, différents aspects de colonies peuvent être rencontrés sur les boîtes, ainsi différentes formes microscopiques peuvent être détectées, dans ce cas, une série de repiquage sur le même milieu (YEMA + RC) est nécessaire pour avoir des souches pures.

3.5. Conservation des isolats

Deux techniques de conservation ont été utilisées :

- a- Conservation à court terme** ; les souches ainsi purifiées et présumées être des rhizobia, sont conservées sur gélose inclinée (YEMA sans RC) en tubes à essais au réfrigérateur (4 à 6°C).
- b- Conservation à long terme** ; pour une conservation jusqu'à un an, les souches sont conservées dans le glycérol à 50 % (v/v) selon la méthode suivantes :
 - Préparer le milieu YMEB pour la conservation (composition du YEMA sans ajout d'agar).
 - Répartir le milieu dans des tubes d'Eppendorf stériles en raison de 0,6 ml/tube.
 - Inoculer les tubes contenant le YEMB à partir des colonies pures.
 - Ajouter 0,6 ml de glycérol à chaque tube inoculé.
 - Homogénéiser en évitant la formation des bulles d'air.
 - Conserver sous une température de -18 à -20°C.

3.6. Essais de nodulation

Cette étape est nécessaire pour démontrer que les souches isolées sont capables d'induire la nodulation de leurs plantes hôtes et donc elles appartiennent aux rhizobia.

Ce test est réalisé en deux étapes ; la première concerne l'inoculation des isolats chez leurs plantes hôtes d'origine.

La deuxième étape concerne le test de l'inoculation croisée, dont dix isolats de *Melilotus* sont inoculés chez des plantes de *Medicago ciliaris*.

3.6.1. Préparation des pots

- Des bouteilles en plastique de 500 ml de volume ont été trouées, lavées et désinfectées avec une solution d'hypochlorite de sodium et finalement bien rincées à l'eau stérile.

- Les pots sont ensuite séchés et recouverts par du papier aluminium pour protéger le système racinaire des plantes de la lumière.

- Au fond des pots, on met du gravier (bien rincé à l'eau et stérilisé dans le four Pasteur à 180°C pendant deux heures) pour assurer le drainage.

3.6.2. Préparation du substrat

Le substrat utilisé est le sable. Le sable est lavé plusieurs fois jusqu'à ce que l'eau de lavage devienne claire, ensuite laisser sécher, puis stériliser dans un récipient au four Pasteur à 180°C pendant deux heures.

3.6.3. Préparation de la solution d'arrosage

La nutrition des plantes est assurée par la solution de Rigaud et Puppo (1975), une à deux fois par semaine selon les besoins des plantes. La composition de la solution d'arrosage est présentée dans le tableau 6.

Tableau 6: Composition de la solution de Rigaud et Puppo (1975)

Ingrédients	Quantité
Solution I (pour 100 ml)	
KH ₂ PO ₄	2,04 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	2 g
KCl	2,01 g
CaSO ₄ 2H ₂ O	1,2 g
CoCl ₂ 4H ₂ O	1,2 g

Tableau 6 (suite)

Ingrédients	Quantité
Solution II (pour 100 ml)	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
MnSO ₄ ·2H ₂ O	0,2 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,3 g
H ₃ BO ₃	1,8 mg
Solution III (pour 100ml)	
Na ₂ EDTA	1,875 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,35 g

Pour la préparation d'un litre de solution d'arrosage: on ajoute 10 ml de la solution I, un ml de la solution II et 144 µl de la solution III à un litre d'eau distillée stérile.

3.6.4. Germination des graines

- Les graines de *Medicago littoralis* et *Melilotus indicus* sont sélectionnées de même dimension.
- Les graines sont stérilisées superficiellement dans une solution d'hypochlorite de sodium pendant 10 min puis rincées soigneusement 05 fois avec de l'eau distillée stérile.
- Ensuite, elles sont placées dans un récipient en verre stérile, et imbibées dans l'eau distillée stérile pendant une nuit à la température ambiante.
- Les graines, ainsi gonflées, sont mises à germées à l'obscurité et en température ambiante en conditions stériles.

3.6.5. Semis et inoculation

- Les graines qui ont une radicule de 1 à 2 cm de longueur sont introduites dans le sable dans des trous de 2 à 3 cm de profondeur et irriguées avec la solution d'arrosage.
- Les souches à inoculer sont cultivées dans des tubes de YEMA inclinés et incubées à 28°C pendant 48h à 72h (selon la vitesse de croissance des souches pour être à la phase exponentielle de croissance).
- Après incubation des souches à tester dans les tubes, on leur ajoute 1 ml d'eau distillée stérile, en raclant pour obtenir une suspension bactérienne.

- Après émergence des graines sous le sol de presque 2 cm, chaque graine est inoculée avec une première dose de 1 ml de suspension bactérienne.
- Enfin, les pots sont exposés à la lumière solaire, et après une semaine, les plantules sont inoculées par une deuxième dose (toujours d'une culture bactérienne fraîche).

3.6.6. Vérification de la nodulation

Après six à huit semaines de la première inoculation, la formation des nodules au niveau des racines indique que les souches isolées sont effectivement des rhizobia.

3.6.7. Mesure du poids sec de la partie végétative (production de matière sèche)

Le poids sec de la partie aérienne a été déterminé pour chaque plant.

- Les plants récoltés sont débarrassés de leur partie racinaire et étiquetés.
- Mise à sécher à une température de 50°C.
- Après dessiccation, le poids de la matière sèche est déterminé (en mg).

3.7. Tests d'identification préliminaire

3.7.1. Coloration différentielle de Gram

Cet examen nous permet de différencier les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif et de déterminer la forme des cellules bactériennes.

Technique: selon Delarras (1998)

- Préparer un frottis bactérien.
- Couvrir le frottis avec un colorant basique : le violet de Gentiane et laisser agir pendant une minute.
- Eliminer l'excès de violet de Gentiane avec une solution de Lugol et laisser agir pendant 30 secondes.
- Rincer à l'eau.
- Décolorer à l'alcool à 90°.
- Faire un deuxième rinçage à l'eau.
- Recouvrir le frottis avec un deuxième colorant : la Fuschine, laisser agir pendant 3 seconde.
- Rincer à l'eau.
- Sécher le frottis entre deux feuilles de papier absorbant.

- Avant l'observation microscopique on dépose une goutte d'huile d'immersion et on observe à l'objectif d'immersion x100.

Lecture

Cellules colorées en rose = Gram négatif.

Cellules colorées en violet = Gram positif.

3.7.2. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Cette enzyme permet la décomposition de l'eau oxygénée (H₂O₂) en eau et oxygène moléculaire.

Technique

Cette réaction est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'H₂O₂ à 10 volumes : une goutte d'H₂O₂ est placée sur une lame propre en présence d'un échantillon de culture solide (colonies) (Delarras 1998).

Lecture

Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles d'air traduisant la décomposition de l'H₂O₂ sous l'action de la catalase (catalase +)



3.7.3. Test d'absorption du colorant rouge Congo sur milieu YEMA

Ce milieu permet de mettre en évidence la morphologie et les caractéristiques des colonies (couleur, texture, etc...) ainsi que de vérifier la pureté des souches isolées. Les rhizobia absorbent peu ou pas le RC donc ce milieu permet de sélectionner les bactéries recherchées (Somasegaran et Hoben 1985).

Technique

- Le milieu utilisé est le YEMA à pH 6,9 auquel on ajoute 10 ml/litre d'une solution aqueuse de rouge Congo dont la concentration finale du milieu soit 0.0025 % (p/v) de RC.

- Procéder à un ensemencement des boîtes de Pétri par des stries à la surface suivant la technique des trois cadrons puis incubé à une température de 28°C (Somasegaran et Hoben 1985).

Lecture

Les colonies qui absorbent fortement le colorant sont des bactéries contaminants.

Les colonies qui absorbent peu ou faiblement le colorant sont des bactéries suspectées des rhizobia.

3.7.4. Test d'acidification ou alcalinisation du milieu YEMA au bleu de Bromothymol

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des isolats à acidifier ou alcaliniser le milieu YEMA (Somasegaran et Hoben 1985).

Technique

- Le milieu utilisé est le YEMA à pH 6,9 additionné de 5 ml/litre d'une solution alcoolique de BBT pour une concentration finale de 0,0025 % (p/v) (tableau 7) (Somasegaran et Hoben 1985).

Tableau 7 : Composition de la solution de Bleu de Bromothymol (BBT)

Ingrédients	Quantité
Bleu de bromothymol	0,5 g
Ethanol	100 ml

- Ajouter 5 ml de cette solution à un litre du milieu YEMA après autoclavage.
- Procéder à un ensemencement des boîtes de Pétri par stries selon la technique des cadrons et incubé à 28°C pendant 72 heures.

Lecture

Les colonies jaunes indiquent une acidification du milieu.

Les colonies bleuâtres indiquent une alcalinisation du milieu.

3.7.5. Test de croissance sur milieu Glucose Peptone Agar (GPA)

Le Glucose Peptone Agar (GPA) est un milieu nutritif très riche qui favorise le développement de grand nombre des bactéries comme les entérobactéries et les *Agrobacterium*.

Technique

- Préparer le milieu GPA selon la composition suivante (tableau 8) (Somasegaran et Hoben 1985).

Tableau 8 : Composition du milieu de Glucose Peptone Agar (GPA)

Ingrédients	Quantité
Glucose	5 g
Peptone	10 g
Agar	15g
Eau distillée	1L
Solution de BCP	100ml

- Additionner cinq ml de la solution de pourpre de bromocrésol (BCP) (tableau 9) à un litre du milieu GPA après autoclavage.

Tableau 9 : Solution de pourpre de Bromocrésol (Bromocresol Purple BCP)

Ingrédients	Quantité
Pourpre de bromocrésol	0,5 g
Ethanol	100 ml

- Ensemencer les isolats par stries sur des boîtes contenant le GPA additionné de BCP et incuber à 28°C.

Lecture : faire une lecture à partir de 24 heures.

Croissance avec virage du couleur du milieu au jaune : bactérie non rhizobia.

Pas de croissance ou croissance faible sans virage au jaune: bactérie appartient probablement au rhizobia.

3.7.6. Test de la croissance sur gélose à l'acétamide

Le milieu gélose à l'acétamide est utilisé pour la différenciation des bactéries à Gram négatif non fermentaires comme *Pseudomonas aeruginosa*.

La désamination de l'acétamide (activité de l'acylamidase) produit de l'ammoniaque et induit ainsi l'augmentation du pH du milieu et provoque le changement de leur couleur correspondant, de jaune orangé au rouge violacé.

Technique

- Préparation du milieu : le milieu est préparé par l'ajout de 20 g du milieu gélose à l'acétamide en poudre à un litre d'eau distillée puis autoclaver.
- Les isolats ont été ensemencés sur des boîtes de Pétri contenant le milieu gélose à l'acétamide, incubés à 28°C pendant 72 heures.

Lecture

Désamination de l'acétamide : croissance avec virage du couleur du milieu de jaune au rouge violacé.

Pas de désamination : croissance sans changement du couleur du milieu.

3.8. Caractérisation phénotypique

3.8.1. Test de tolérance aux températures élevées et aux différentes concentrations de NaCl

L'objectif de ce test est d'étudier la capacité des bactéries à résister aux conditions de salinité et des températures élevées et déterminer les valeurs (T et NaCl) inhibitrices. Ce test permet aussi d'évaluer les effets de la combinaison des deux stresses sur ces bactéries.

Technique

- Préparation du YEMA supplémenté, avant autoclavage, avec les concentrations de NaCl suivantes (p/v): 0.0 ; 0.01 ; 1 ; 2.5 ; 3.5 ; 4.5 et 6 %.
- Les boîtes, contenant les milieux aux différentes concentrations, ont été subdivisées en 9 secteurs (égaux).
- Les bactéries ont été précultivées dans des tubes de YEMA pendant 2 à 3 j.
- Une suspension bactérienne a été préparée à partir des précultures et ajustée à un DO de l'ordre de 01.

- Les secteurs ont été ensemencés par spot avec 10 µl des suspensions préparées (neuf isolats/boîte).
- Les isolats ont été ensemencés sur la gamme du milieu YEMA additionné du NaCl en quatre séries. Chaque série de boîtes a été incubée sous l'une des températures suivantes : 28°C, 37°C, 40°C et 45°C pendant 5 jours (Djedidi et al. 2011, Maâtallah et al 2002).

Lecture

- Après incubation, la croissance des bactéries a été suivie pendant 5 jours.
- La tolérance des bactéries a été évaluée selon la densité de la croissance (forte croissance : forte tolérance ; faible croissance : tolérance faible ; pas de croissance : intolérance).

3.8.2. Test de tolérance aux différents pH

Le but de ce test est d'évaluer l'aptitude des isolats à tolérer des pH extrêmes.

Technique

- Le test a été réalisé selon la même procédure du test précédent, sur YEMA ajusté avec les solutions de NaOH et HCl aux valeurs de pH suivantes : 4.5, 5.5, 6.8 (contrôle), 8 et 9.
- Les boîtes ont été incubées pendant trois jours à 28°C (Thami-Alami et al. 2010).

Lecture

Les résultats de ce test ont été évalués de la même façon que le test précédent.

3.8.3. Test de tolérance au stress hydrique

Ce test consiste à étudier la croissance des isolats sous conditions de déficit hydrique, ce dernier a été créé en utilisant le polyéthylène glycol PEG4000 à différentes concentrations.

Technique

- Des solutions de polyéthylène glycol PEG4000 ont été préparées à différentes concentrations finales (p/v): 10 %, 15 %, 20 % et 25 %.
- Un ml de chaque concentration a été ensemencé par une masse cellulaire de l'un des isolats testés.
- Dix µl de chaque suspension bactérienne ont été inoculé par la technique des spots sur une boîte de milieu YEMA divisée en 4 secteurs et incubé à 28°C pendant trois jours.

Lecture

Les résultats de ce test ont été évalués de la même façon que les deux tests précédents.

3.8.4. Test de résistance intrinsèque aux antibiotiques

L'objectif de ce test est l'étude de la résistance des isolats à neuf différents antibiotiques.

Technique : ce test a été réalisé selon deux méthodes.

- La méthode de diffusion, en mesurant les diamètres des zones d'inhibition sur boîtes de Pétri du milieu YEMA :
- 0.5 ml de chaque suspension préparée à partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle a été inondé à la surface du milieu YEMA en boîtes, le liquide en excès a été éliminé.
- Les boîtes ont été laissées pour sécher pendant 30 min avant de placer les disques d'antibiotiques suivants: streptomycine (30 µg), ampicilline (30 µg), chloramphénicol (30 µg), tétracycline (30 µg), acide nalidixique (30 µg), kanamycine (30 µg).
- Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 5 jours (Rome et al. 1996, Elbanna et al. 2009).
- La deuxième méthode avec les antibiotiques stérilisés par filtration:
- Préparation des solutions stockées des antibiotiques : la préparation de ces solutions a été réalisée comme décrit par Somasegaran et Hoben (1985) (tableau 10).

Tableau 10 : Composition des solutions stockées des antibiotiques

Ingrédients	Quantité
Antibiotique	200 mg
Eau distillée	100 ml

- Les solutions stockées des trois antibiotiques (ATB) ont été préparées de la même procédure à une concentration de 2 mg/ml.
- Les solutions initiales des ATB préparées ont été stérilisées, sous conditions d'asepsie, par filtration à travers un microfiltre de 0.2 µm de porosité, les solutions ont été ensuite conservées sous froid jusqu'à l'utilisation.
- La solution stockée de chaque antibiotique stérilisé par filtration a été ajoutée aseptiquement au milieu YEMA stérile fondu à 50°C pour obtenir les concentrations

finale suivantes: rifampicine (30 µg/ml), érythromycine (30 µg/ml) et néomycine (30 µg/ml) (Shetta et al. 2011, Thami-Alami et al. 2010, Zhang et al. 1991).

- Les boîtes ont été incubées à 28°C, pendant 3 jours.

Lecture

Les résultats ont été marqués par la mesure des diamètres des zones d'inhibition pour la technique des disques et l'absence ou la présence d'une croissance bactérienne pour la deuxième technique.

3.8.5. Test de distinction *Rhizobia/Agrobacterium* (recherche de 3-cétolactose hydrolase)

La recherche de l'enzyme 3-cétolactose hydrolase est un test spécifique pour la distinction entre les bactéries *Agrobacterium* et les rhizobia, cette simple épreuve est très utile pour une pré-identification des souches d'*Agrobacterium* (biovar 1) (Murugesan et al. 2010).

Technique

Les isolats ont été cultivés en premier temps pendant 48 à 72 heures sur le milieu de base (glucose nutritif agar NGA) avec la composition donnée dans le tableau 11.

Tableau 11 : Composition du milieu Glucose nutritif Agar (GNA)

Ingrédients	Quantité
Extrait de levure	3 g
Glucose	2,5 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 L
pH	7

Une suspension bactérienne pour chaque isolat a été réalisée à partir de la culture sur NGA, en utilisant la technique des spots, les isolats ont été cultivés sur le milieu gélose lactosé (tableau 12).

Tableau 12 : Composition du milieu gélose au lactose

Ingrédients	Quantité
Lactose	10 g
Extrait de levure	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 L
pH	7

- Les bactéries ont été cultivées sur le milieu gélose lactosé en raison de trois isolats par boîte.
- Les bactéries ont été ensuite incubées à 28°C pendant 72 heures.
- Après 72 heures, les boîtes ont été inondées avec une couche de la réactif Benedict (Bouzar et al. 1995) (tableau 13).

Tableau 13: Composition du réactif de Benedict

Ingrédients	Quantité
Citrate de sodium	17,3 g
Carbonate de sodium anhydre	10 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	1,73 g
Eau distillée	100 ml

Lecture

- La présence de l'enzyme 3-cétolactose dans le milieu (résultat positif) est indiquée par l'apparition d'un halo jaune autour de la croissance bactérienne après 15 à 20 minutes.
- L'absence d'un halo jaune signifie un résultat négatif.

3.8.6. Caractérisation biochimique et auxanotrophique

Les systèmes API 20NE et API 50CH sont des micro-méthodes standardisées, l'API 20NE combine 20 tests pour l'identification des bactéries bacilles Gram négati non-exigeantes alors que l'API 50CH est constitué de 50 microtubes utilisés pour étudier le métabolisme des hydrates de carbone chez les microorganismes.

Pour tous ces tests, les précultures ont été réalisées sur boîtes de milieu TYEA (Tryptone Yeast Extract Agar) (tableaux 14 et 15).

Tableau 14: Composition du milieu Tryptone Yeast Extract Agar (TYEA)

Ingrédients	Quantité
Tryptone peptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Agar	10 g
Eau distillée	1 L
CaCl ₂ (1M)	10 ml

Tableau 15 : Composition de la Solution de CaCl₂ à 1M

Ingrédients	Quantité
CaCl ₂	14,7 g
Eau distillée	100 ml

Ce milieu permet de réduire la production des LPS et des EPS synthétisés par les bactéries par rapport au milieu YEMA (Wang et al. 2006).

- a- Test sur système API 20 NE :** les préparations sont réalisées et inoculées selon les recommandations des fabricants (BioMérieux, France).

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés par un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

- Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de l'isolat sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

- Préparation de l'inoculum

- Préparer une suspension (2 ml) d'eau physiologique stérile de chaque souche à tester à partir d'une culture jeune sur YEMA (48 à 72 heures).
- Réaliser une suspension de turbidité égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

- **Inoculation de la galerie**

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente en évitant la formation des bulles d'air au fond des tubes.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium et y transférer environ 200 µl de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation des bulles d'air.
- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Les cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH et URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incubé à 28°C.
- Après incubation, les résultats ont été suivis chaque jour pendant 5 à 7 jours.

- **Lecture et interprétation**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GUL, ADH, URE, ESC, GEL et PNPG).
- La révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilations à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests pendant la révélation des tests de NO₃ et TRP.
- La révélation de test NO₃ :
 - Ajouter une goutte de réactifs NIT1 et NIT2 dans la cupule NO₃.
 - Après 5 min, une couleur rouge indique une réaction positive.
 - Une réaction négative peut être due à la production d'azote ; ajouter 2 à 3 mg de réactif Zn dans la cupule NO₃.
 - Après 5 min, une cupule restée incolore indique une réaction positive. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative.

- La révélation de test TRP :
 - Ajouter une goutte de réactif JAMES.
 - Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.
- Tests d'assimilation :
 - Observer la pousse bactérienne. Une cupule trouble indique une réaction positive.
 - Une réincubation est nécessaire en cas de faible discrimination (après élimination des réactifs NIT1, NIT2 et JAMES par aspiration à l'aide d'une pipette, et recouvrir les tests NO₃ et TRP par l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe).

b- **Test sur système API 50 CH** : La capacité des isolats à métaboliser plusieurs substrats comme source de carbone a été testée en utilisant la galerie API 50 CH (BioMérieux, France).

La galerie API 50 CH est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif.

La galerie API 50 CH peut être utilisée pour étudier deux autres voies :

- a. L'oxydation se traduisant par un changement de couleur dans la cupule, dû à une production d'acide en aérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.
- b. L'assimilation se traduisant par une croissance de la bactérie dans la cupule quand le substrat est utilisé comme seule source de carbone présente.

Le milieu employé pour l'inoculation des galeries doit être choisi en fonction du métabolisme et des exigences du groupe bactérien étudiés.

Dans notre cas (étude des rhizobia), nous avons choisi d'utiliser le milieu décrit par Kersters (1984) pour l'inoculation des galeries.

Les précultures ont été préparées comme suit : des colonies bien formées obtenues après 72 heures d'incubation sur du TYEA solide à 28°C ont été prélevées et dispersées dans 1 ml d'eau distillée stérile. Le mélange a été suspendu dans un milieu dépourvu de toute source de carbone (tableau 16), maintenu à 45°C.

Tableau 16 : Composition de milieu de culture pour API 50 CH selon Kersters (1984)

Ingrédients	Quantité en g/l
K ₂ HPO ₄	0,46
KH ₂ PO ₄	0,13
MgSO ₄	0,2
NaCl	0,1
Yeast Nitrogen base (Difco)	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Agar (Difco)	7,5

- **Préparation des galeries :** chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 microtubes numérotés.
 - Préparer une boîte d'incubation (fond et couvercle).
 - Inscrire la référence de l'isolat sur la languette latérale de la boîte.
 - Répartir environ 10 ml d'eau distillée dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
 - Sortir les bandes de leur emballage, séparer les bandes 0-19 et 20-39 et les déposer dans le fond de la boîte et compléter la galerie avec la bande 40-49.
- **Préparation de l'inoculum**
 - Cultiver les isolats sur milieu TYEA.
 - Récolter cette culture (par anse de platine).
 - Préparer l'inoculum dans le milieu approprié (milieu de Kersters 1984).
- **Inoculation de la galerie**
 - Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une micropipette (cônes stériles) dans les 50 tubes de la galerie.
 - Incliner légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
 - Eviter la formation des bulles d'air en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule.

- Lorsque le tube seul doit être inoculé, ne pas dépasser la limite supérieure du tube afin de conserver une bonne anaérobiose.
- Lorsque le tube et la cupule doivent être complètement remplis, éviter la formation d'un ménisque concave ou convexe.
- Incuber les galeries à la température optimum de croissance des rhizobia (à 28°C).
- Après incubation des galeries, les résultats ont été suivis chaque jour pendant 5 à 7 jours.

- **Lecture et interprétation**

La lecture de la galerie est réalisée par observation de la pousse bactérienne et en interprétant chaque test : positif (+), négatif (-), douteux (\pm) et les noter sur la fiche de résultat.

3.8.7. Analyses statistiques

L'analyse en composantes principales (ACP) a été exécutée pour évaluer les relations entre la tolérance d'isolats *in vitro* aux hautes températures et à la salinité. Les calculs et les expositions graphiques ont été réalisés en utilisant le logiciel XLSTATTM (version 2004. 7. 5. 2, Addinsoft, Paris, France, <http://www.xlstat.com>).

Une classification ascendante hiérarchique (CAH) basé sur les caractères phénotypiques des isolats a été réalisée en utilisant le logiciel STATISTICA 7.0.

Lecture

Un phénogramme a été construits par la méthode de groupement : Unweighted Pair Group Method with Average (UPGMA).

3.9. Séquençage et analyse phylogénétique des gènes de l'ARNr 16S

L'analyse de l'ADNr 16S est reconnue comme la méthode la plus puissante et la plus rapide pour déterminer les relations et la position phylogénétique des bactéries symbiotiques des légumineuses.

Technique

- L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée en utilisant le mini kit QIAAmp (QIAGEN, Düsseldorf, Germany) selon le protocole développé par le constructeur.
- Les fragments des gènes de l'ARNr 16S des isolats ont été amplifiés en utilisant des amorces spécifiques pour rhizobia (tableau 17).

Tableau 17: Les promoteurs d'amplification et de séquençage

Amorces	Séquences 5'→3'	Référence
fD1	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Weisburg et al. 1990
rD1	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'	Weisburg et al. 1990

- Le mélange de la réaction d'amplification a été constitué du tampon de réaction de 1X PCR : 100 nM de chaque amorce, 200 mM de chaque deoxyribonucléotide triphosphate, 0.25 Unités Hot Star Taq de l'enzyme ADN polymérase (Qiagen, Hilden, Germany) et 20 ng d'ADN bactérien (ADN des isolats).
- Le programme de PCR consiste à une étape initiale d'activation d'enzyme à 95°C pendant 15 min, suivi par une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 minutes ; 30 cycles de dénaturation pendant une minute à 95°C, une étape de fixation d'une minute à 55°C et élongation de 1.5 minute à 72°C, suivi d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 7 minutes.
- les amplifiants ont été purifiés sur gel en utilisant le kit de gel d'extraction QIAquick (Qiagen, Hilden, Germany) selon les instructions du fabricant puis séquencés en bidirection en utilisant les amorces rD1 et fD1. Pour la souche ML08 la séquence d'un simple brin est obtenue.
- Les séquences obtenues ont été soumis à la base de NCBI et une recherche de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) est réalisée pour identifier les séquences de plus forte similarité.
- Les séquences des gènes d'ARNr 16S des isolats ont été analysées et alignées avec celles des souches types des rhizobia rapportées dans la base de NCBI à fin de créer l'arbre phylogénétique.
- L'analyse phylogénétique a été inférée en utilisant la méthode de ML (*Maximum-likelihood*).
- L'alignement multiple des séquences nucléotidiques pour la création de l'arbre phylogénétique de *Maximum-likelihood* a été réalisé usant le logiciel MEGA 5.2.
- Les séquences des gènes de l'ARNr 16S des six souches ont été déposées au GenBank pour l'obtention des numéros d'accessions (voir annexe 4).

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre V : Résultats et discussions

1. Objectif de l'étude

L'objectif de ce travail est l'étude la diversité des rhizobia présents dans les nodules racinaires des légumineuses indigènes, spontanées, rencontrées dans l'oasis de Touggourt située dans la vallée de l'Oued Righ dans le Sud algérien.

Les rhizobia sont isolés, purifiés et une sélection d'une quarantaine de souches a fait l'objet de caractérisations phénotypiques et génotypiques approfondies.

2. Les légumineuses sahariennes étudiées

2.1. Récolte des plants des légumineuses

Les espèces de légumineuses spontanées récoltées sont au nombre de trois, il s'agit de *Vicia sativa*, *Medicago littoralis* et *Melilotus indicus*. Pour les espèces cultivées, nous avons récolté *Vicia faba* (fèves) et *Medicago sativa* (luzerne).

L'observation du système racinaire des plants récoltés montre un taux de nodulation très faible (*Medicago littoralis* avec une moyenne de 5 nodules/plant) ou nul (*Vicia faba*, *Vicia sativa* et *Medicago sativa*). La seule espèce qui a un taux de nodulation très important (avec une moyenne de 35 nodules/plant) est *Melilotus indicus*.

Le faible taux de nodulation de ces légumineuses pourrait s'expliquer par la nature et la composition des sols sahariens. Il a été démontré que le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-rhizobia en inhibant le processus d'infection ainsi que le développement des nodules (Farissi et al. 2014).

La salinité affecte aussi la taille et le nombre de nodules et peut induire l'inhibition de la formation du filament d'infection. En général, les premières étapes de la nodulation sont les plus sensibles au stress salin.

2.2. Les légumineuses spontanées étudiées

Au vu des résultats et observations notées précédemment, notre choix s'est porté sur deux espèces de *Fabaceae* appartenant à deux genres différents. Le seul critère retenu est la présence de nodules racinaires sur les plants récoltés.

Ces plantes sont les suivantes :

- *Medicago littoralis* Rhode et
- *Melilotus indicus* (L.) All.

2.2.1. L'espèce *Medicago littoralis* Rhode

La légumineuse *Medicago littoralis* Rhode est récoltée de l'oasis de Touggourt. Cette plante est d'abord identifiée sur le plan taxonomique et botanique en se basant sur les clés de détermination décrite par Quèzel et Santa (1962).

C'est une plante annuelle, basse à petite, étalée ou prostrée, poilue ; tiges souvent pourprées. Les folioles sont cordiformes à ovales, plus larges dans la moitié supérieure du limbe, dentée au sommet, poilues sur les deux faces. Les fleurs sont jaunes de 5 à 6 mm de long par 3 à 7. Les gousses sont de 3-6 mm, en cylindre plus au moins aplati, enroulée sur 3-6 spirales, généralement vers la droite, dorsale portant les épines ou rarement sans épines, non ou à peine saillante, jamais entourée de sillons (fig.11 ; 12 ; 13 et 14).



Fig. 11 : *Medicago littoralis* Rhode

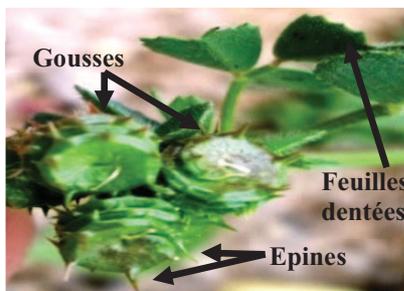


Fig. 12: Gousses de *M. littoralis*

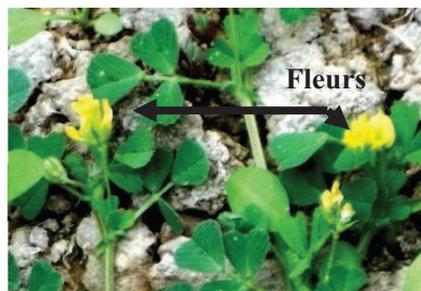


Fig. 13: Feuilles et fleurs de *M. littoralis*



Fig. 14: Système racinaire et nodules de *M. littoralis*

2.2.2. L'espèce *Melilotus indicus* (L.) All.

La deuxième espèce étudiée est *Melilotus indicus* récoltée de l'oasis de la région de Touggourt. Elle est identifiée, en utilisant les mêmes clés de détermination de Quèzel et Santa (1962). C'est une plante grêle de 10 à 40 cm de haut, à tiges dressées ou ascendante, à nombreuses petites fleurs jaunes pâles de 2 à 3 mm de long disposées en grappes allongées. Les feuilles ont trois folioles denticulées. Les fruits sont des gousses sphériques de 1,5 à 3 mm, pendantes, nervurées vert noirâtres à maturité (fig.15 ; 16 ; 17 et 18).

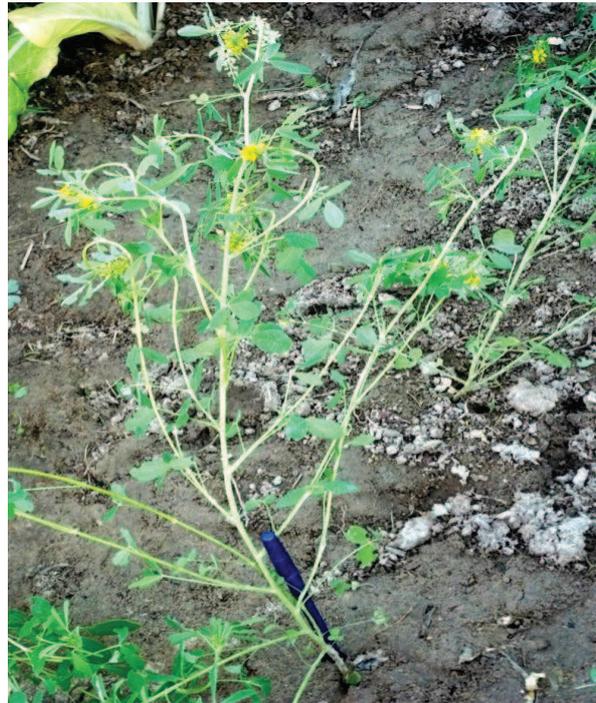


Fig. 15: *Melilotus indicus* (L.) All.

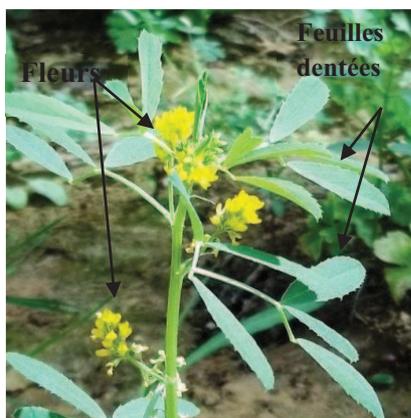


Fig. 16: Feuilles et fleurs de *Melilotus indicus*



Fig. 17: Gousses de *Melilotus indicus*



Fig. 18: Système racinaire et nodules de *Melilotus indicus*

3. Les isolats des nodules racinaires

L'isolement des bactéries, symbiotes ou endophytes, présentes dans les nodules racinaires de *Medicago littoralis* et *Melilotus indicus* de la région de Touggourt est réalisé sur le milieu de culture sélectif YEMA (Somasegaran et Hoben 19985) additionné du colorant rouge Congo (RC).

Les colonies de rhizobia apparaissent au bout de 72 heures d'incubation, elles sont de couleur rosâtre due au fait qu'elles n'absorbent pas le rouge Congo.

Un total de 40 isolats (tableau 18) a été obtenu après plusieurs purifications sur milieu YEMA additionné de rouge Congo.

Tableau 18 : Nombre d'isolats obtenus à partir des nodules racinaires des légumineuses utilisées

Légumineuses spontanées	Nombre de nodule	Nombre d'isolat
<i>Melilotus indicus</i>	33	25
<i>Medicago littoralis</i>	19	15
Total	52	40

Le nombre total de nodules utilisés pour l'isolement des rhizobia est de **52** dont 33 nodules de *M. indicus* et 19 nodules de *M. littoralis* (tableau18). A partir de ces nodules, nous avons réussi à isoler un total de **40** souches, avec un taux de 25/33 (isolats/nodules) pour *Melilotus indicus* et 15/19 (isolats/nodules) pour *Medicago littoralis*.

4. Caractérisation culturelle et morphologique des isolats

4.1. Temps de croissance

Le temps de croissance des rhizobia, cultivés sur YEMA est un bon indice de sélection, il permet de différencier les rhizobia à croissance rapide (entre 48 et 72 heures) des rhizobia à croissance lente (plus de 4 jours) (Somasegaran et Hoben 1985).

Les isolats ont été purifiés sur milieu YEMA additionné de RC, et les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 19.

Nous remarquons que les isolats obtenus (de *M. littoralis* et *M. indicus*) ont un temps de croissance compris entre 48 et 72 heures, donc ils sont classés dans la catégorie des rhizobia à croissance rapide.

Tableau 19 : Temps de croissance des souches isolées

Légumineuses spontanées	Isolats	Nombre	Temps de croissance
<i>Medicago littoralis</i>	MD13	01	< 48 heures
	MD01, MD02, MD03, MD04, MD05, MD09, MD10, MD11, MD12, MD14, MD15	11	48 heures
	MD06, MD07, MD08	03	72 heures
<i>Melilotus indicus</i>	ML17	01	< 48 heures
	ML01, ML12, ML15, ML22, ML23, ML24, ML25, ML26	08	48 heures
	ML02, ML04, ML05, ML06, ML07, ML10, ML13, ML14, ML16, ML19, ML20, ML21, ML03, ML08, ML09, ML11	16	72 heures

4.2. Observation macroscopique et microscopique des isolats

Le tableau 20 regroupe les résultats des observations des aspects macroscopiques des colonies et les aspects microscopiques des bactéries.

Nous avons remarqué que tous les isolats testés présentent les caractères des rhizobia à croissance rapide formant des colonies discrètes blanchâtres, translucides, circulaires, lisses bombées, à un diamètre entre 3 et 5 mm.

La croissance de la majorité des isolats sur milieu YEMA est caractérisée par une production importante d'exopolysaccharides EPS.

L'observation microscopique des isolats montre des bâtonnets courts ; ceci est la forme caractéristique des rhizobia.

Les résultats du tableau 20 concordent avec ceux mentionnés par Somasegaran et Hoben (1985) et Fraysse et al. (2003).

Tableau 20 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats

Plante hôte	Plants	Isolats	Aspects et tailles des colonies	Morphologie
<i>Medicago littoralis</i>	P01	MD01	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P02	MD02	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		MD03	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		MD04	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P03	MD05	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P04	MD06	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		MD07	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P05	MD08	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		MD09	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		MD10	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P06	MD11	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		MD12	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P07	MD13	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		MD14	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		MD15	Petites (1 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
<i>Melilotus indicus</i>	P01	ML01	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		ML02	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P05	ML03	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P06	ML04	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses	Courts bâtonnets
		ML05	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		ML06	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		ML07	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets

Tableau 20 (suite)

Plante hôte	Plants	Isolats	Aspects et tailles des colonies	Morphologie
<i>Melilotus indicus</i>	P07	ML08	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		ML09	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P09	ML10	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P11	ML11	Petites (≤ 3 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		ML12	Petites (≤ 2 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P12	ML13	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P15	ML14	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P16	ML15	Petites (≤ 3 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		ML16	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		ML17	Petites (≤ 2 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P19	ML19	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P22	ML20	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		ML21	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P23	ML22	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P24	ML23	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P19	ML19	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P22	ML20	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		ML21	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P23	ML22	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P24	ML23	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		ML24	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
	P25	ML25	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets
		ML26	Petites (≤ 4 mm) ; blanchâtres translucides ; circulaires lisses ; bombées	Courts bâtonnets

4.3. Tests d'absorption de rouge Congo (RC) et d'acidification ou alcalinisation du milieu

Les résultats de ces tests sont représentés dans le tableau 21. Les colonies apparaissent légèrement rosâtres ce qui veut dire que les isolats n'ont pas absorbé le RC.

Selon Somasegaran et Hoben (1985) les rhizobia à croissance rapide symbiotiques des genres *Medicago* et *Melilotus* n'absorbent pas (ou faiblement) le colorant de rouge Congo quand elles sont incubées à l'obscurité.

Pour ce qui est du test d'acidification ou d'alcalinisation des milieux de culture ; la majorité des isolats testés sont acidifiantes (ex : fig. 19) ; seules les souches MD06 et ML11 sont faiblement alcalinisantes.

Il est à noter que les rhizobia à croissance rapide sont généralement acidifiantes ; alors que les rhizobia à croissance lente alcalinisent le milieu de culture (Somasegaran et Hoben 1985 ; Jordan 1984).

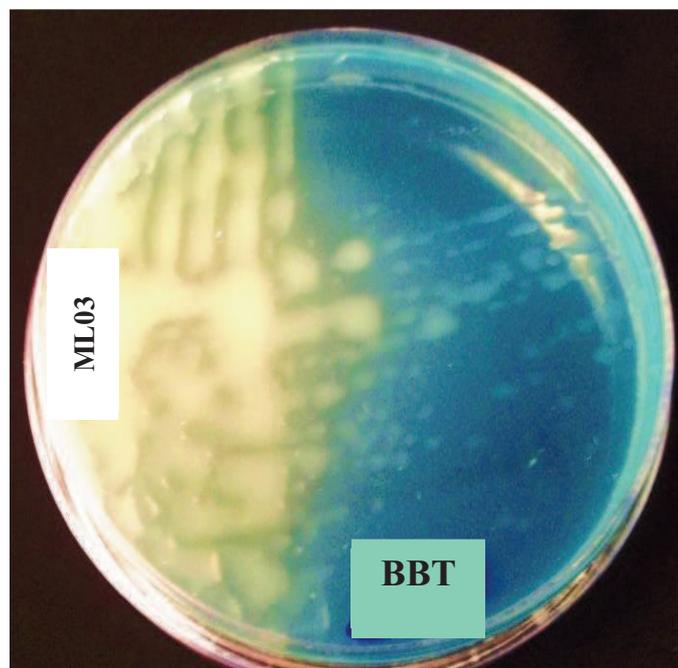


Fig. 19 : Croissance de l'isolat ML03 sur milieu YEMA additionné de BBT

Tableau 21 : Tests d'absorption de RC ; acidification ou alcalinisation (BBT) et croissance sur milieu GPA

Plantes	Isolats	Absorption du colorant (YEMA additionné de rouge Congo)	Acidification ou alcalinisation (YEMA additionné de BBT)	Croissance sur milieu GPA
<i>Medicago littoralis</i>	MD01	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	MD02	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	MD03	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	MD04	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	MD05	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	MD06	Pas d'absorption	Légère alcalinisation	Pas de croissance
	MD07	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	MD08	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	MD09	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	MD10	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	MD11	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	MD12	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	MD13	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	MD14	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	MD15	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
<i>Melilotus indicus</i>	ML01	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	ML02	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	ML03	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	ML04	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	ML05	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	ML06	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	ML07	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	ML08	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	ML09	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	ML10	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	ML11	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	ML12	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	ML13	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	ML14	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance

Tableau 21 (suite)

Plantes	Isolats	Absorption du colorant (YEMA additionné de rouge Congo)	Acidification ou alcalinisation (YEMA additionné de BBT)	Croissance sur milieu GPA
<i>Melilotus indicus</i>	ML15	Pas d'absorption	Alcalinisation	Croissance positive et forte alcalinisation
	ML16	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	ML17	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	ML19	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	ML20	Pas d'absorption	Forte acidification	Pas de croissance
	ML21	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	ML22	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	ML23	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	ML24	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	ML25	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance
	ML26	Pas d'absorption	Légère acidification	Pas de croissance

4.4. Croissance des isolats sur les milieux GPA et gélose à l'acétamide

Les résultats de la croissance des isolats sur le milieu GPA sont représentés dans le tableau 21.

Nous constatons une absence totale de croissance pour tous les isolats à l'exception de la souche ML15 qui présente une faible croissance avec une forte alcalinisation du milieu.

En général, les rhizobia ne poussent pas sur le milieu GPA (Somasegaran et Hoben, 1985) ; mais certaines espèces peuvent donner une faible croissance sur ce milieu.

C'est le cas de la souche ML15 qui alcalinise le milieu de culture GPA. Ceci démontre que la ML15 est une rhizobia et non une entérobactérie ou une agrobactérie.

Le tableau 22 présente les résultats du test de croissance sur le milieu gélose à l'acétamide.

Les résultats du tableau 22 indiquent que la majorité des isolats testés (86 % des isolats de *Medicago* et 69 % de *Melilotus*) sont capables de se développer sur ce milieu mais sans

variation de couleur (fig. 20) ; ceci montre que les isolats n'ont pas désaminé l'acétamide et donc ne possèdent pas d'activité d'acétylaminidase.

Tableau 22 : Croissance des isolats sur le milieu gélose à l'acétamide

Plantes	Isolats	Nombre d'isolats	Croissance sur gélose à l'acétamide
<i>Medicago littoralis</i>	MD01, MD02, MD03, MD04, MD05, MD08, MD09, MD10, MD11, MD12, MD13, MD14, MD15	13	Forte croissance
	MD06, MD07	02	Pas de croissance
<i>Melilotus indicus</i>	ML01, ML02, ML04, ML07, ML12, ML13, ML14, ML15, ML16, ML17, ML19, ML20, ML21	13	Forte croissance
	ML03, ML05, ML08, ML09, ML22	05	Faible croissance
	ML06, ML10, ML23, ML24, ML25, ML26	06	Non testés
	ML11	01	Pas de croissance

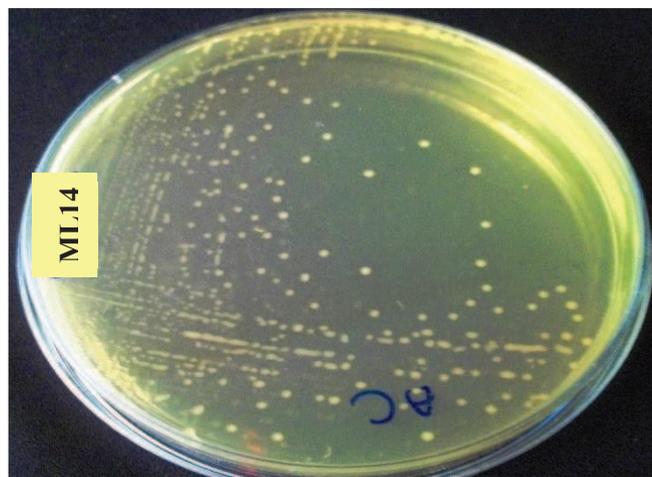


Fig.20 : Croissance de l'isolat ML14 sur gélose à l'acétamide

En effet, le milieu gélosé à l'acétamide est habituellement utilisé pour mettre en évidence l'activité de l'acétylaminidase chez les bactéries à Gram négatif non fermentaires et aussi pour sélectionner l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.

Les isolats testés et qui donnent un résultat positif sur ce milieu c'est-à-dire croissance et alcalinisation pourraient donc s'apparenter au genre *Pseudomonas*.

Les souches ML11 et ML12 ont provoqué le virage de la couleur du milieu au rouge violacé, ce résultat indique que ces isolats sont capables de désaminer l'acétamide et donc possèdent une activité acylamidase.

Nous avons procédé par la suite à la culture des isolats ML11 et ML12 sur milieux King A et B (milieux généralement utilisés pour caractériser les *Pseudomonas* fluorescents) et ce afin de confirmer ou d'infirmier l'appartenance de ces deux isolats au genre *Pseudomonas*.

Nous avons observé une bonne croissance des souches ML11 et ML12 sur les milieux King A et King B. Par contre le test de fluorescence est négatif, ce qui démontre l'absence de production de pigments de type pyocyanine ou pyoverdine fluorescents. Nous pouvons dire que les souches ML11 et ML12 n'appartiennent pas au genre *Pseudomonas*.

4.5. Résultat de la coloration de Gram

L'observation microscopique des isolats après coloration de Gram montre des bâtonnets courts colorés en rose. Les isolats sont donc Gram négatif.

5. Caractérisation symbiotique

5.1. Essais de nodulation

Les essais de nodulation sont effectués afin d'évaluer la capacité symbiotique des isolats et de déterminer leur infectivité et leur efficacité.

L'infectivité de chaque souche est appréciée par le nombre de nodules formés sur la racine de chaque plante et l'efficacité est estimée par l'observation de la couleur des nodules et la détermination de gain en matière sèche (partie aérienne) des plantes inoculées.

Les essais de nodulation sont effectués en pots remplis de sable et ce pour permettre un bon développement du système racinaire des plantes hôtes.

Les figures 21 ; 22 ; 23 et 24 montrent la croissance des plantes après inoculation par les isolats et les systèmes racinaires nodulés.

Après 6 à 8 semaines de croissance, les plantes sont déterrées et les racines sont rincées pour éliminer le sable.

L'observation du système racinaire des plants inoculés par les isolats montre que la totalité des isolats de *Melilotus* et 87 % des isolats de *Medicago* ont formés des nodules roses de type indéterminé (forme cylindrique) sur les racines.

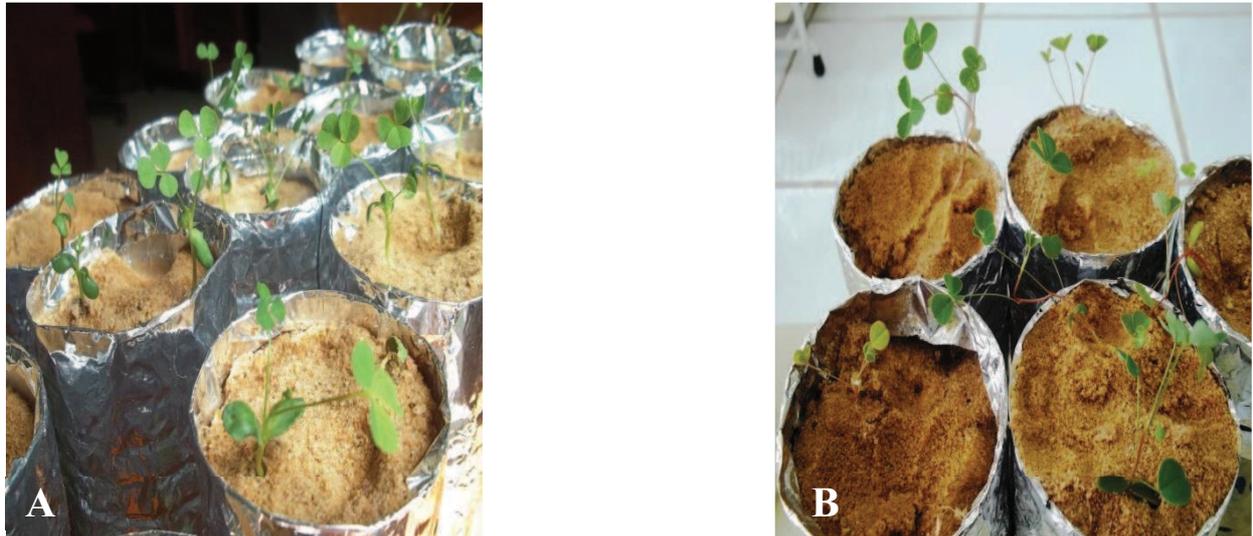


Fig. 21 : Photos des essais de nodulation en pots des plantes de *Medicago littoralis*

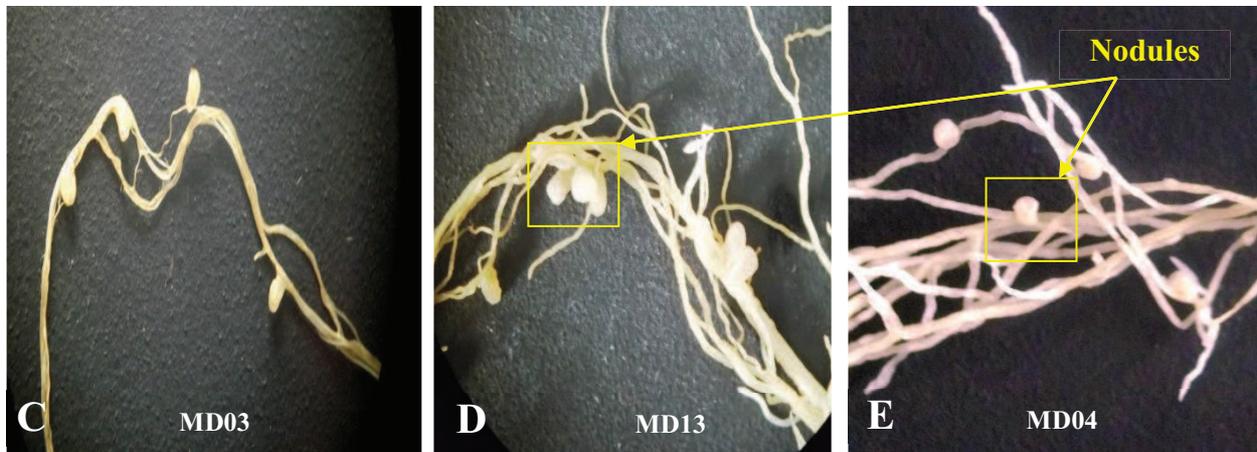


Fig. 22 : Photos (C, D, E) nodules formées sur les racines de *M. littoralis*



Fig. 23 : Photos des essais de nodulation en pots des plantes de *M. indicus*

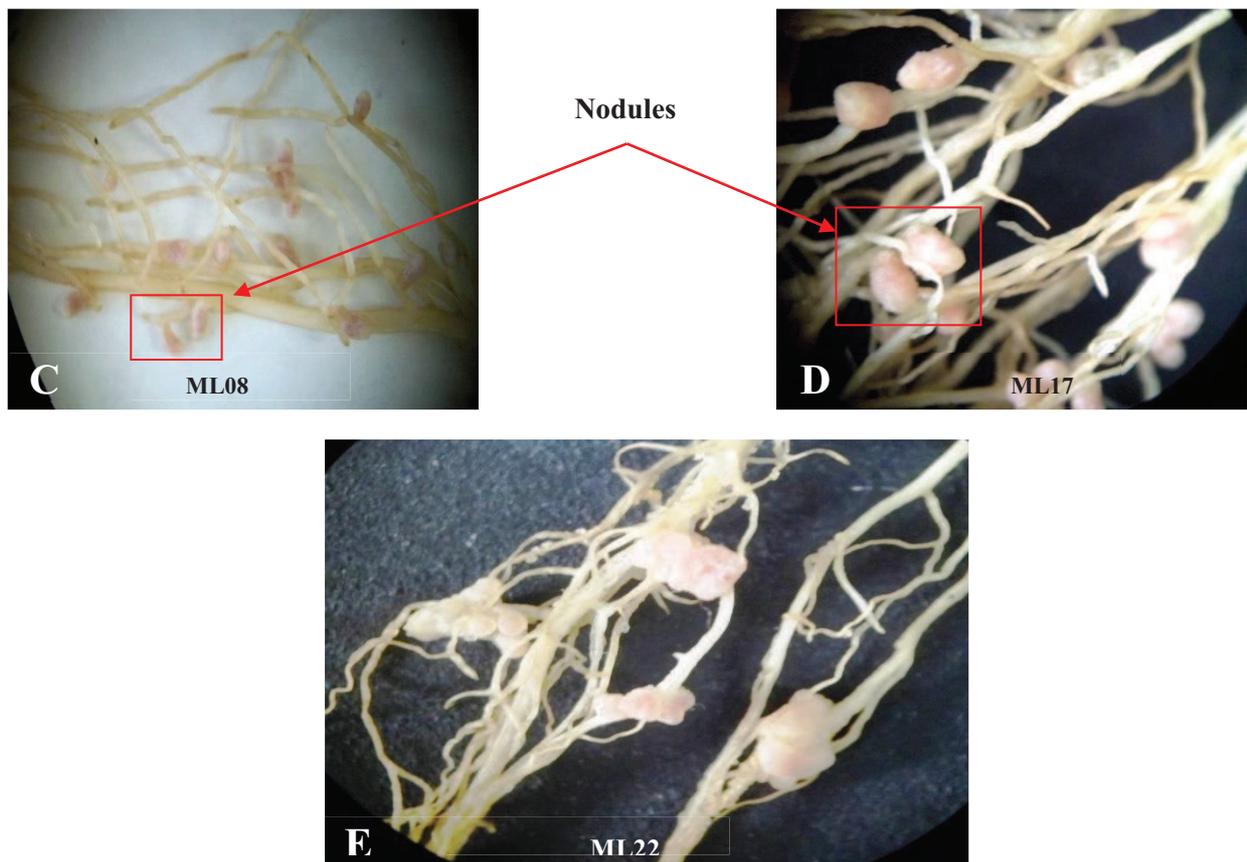


Fig. 24 : Photos (C, D, E) nodules formées sur les racines de *M. indicus*

Les résultats des essais de nodulation pour tous les isolats sont résumés dans les fig. 25 et 26.

Ces figures présentent le nombre des nodules formés par les isolats en fonction du gain en poids de la matière végétale (poids sec).

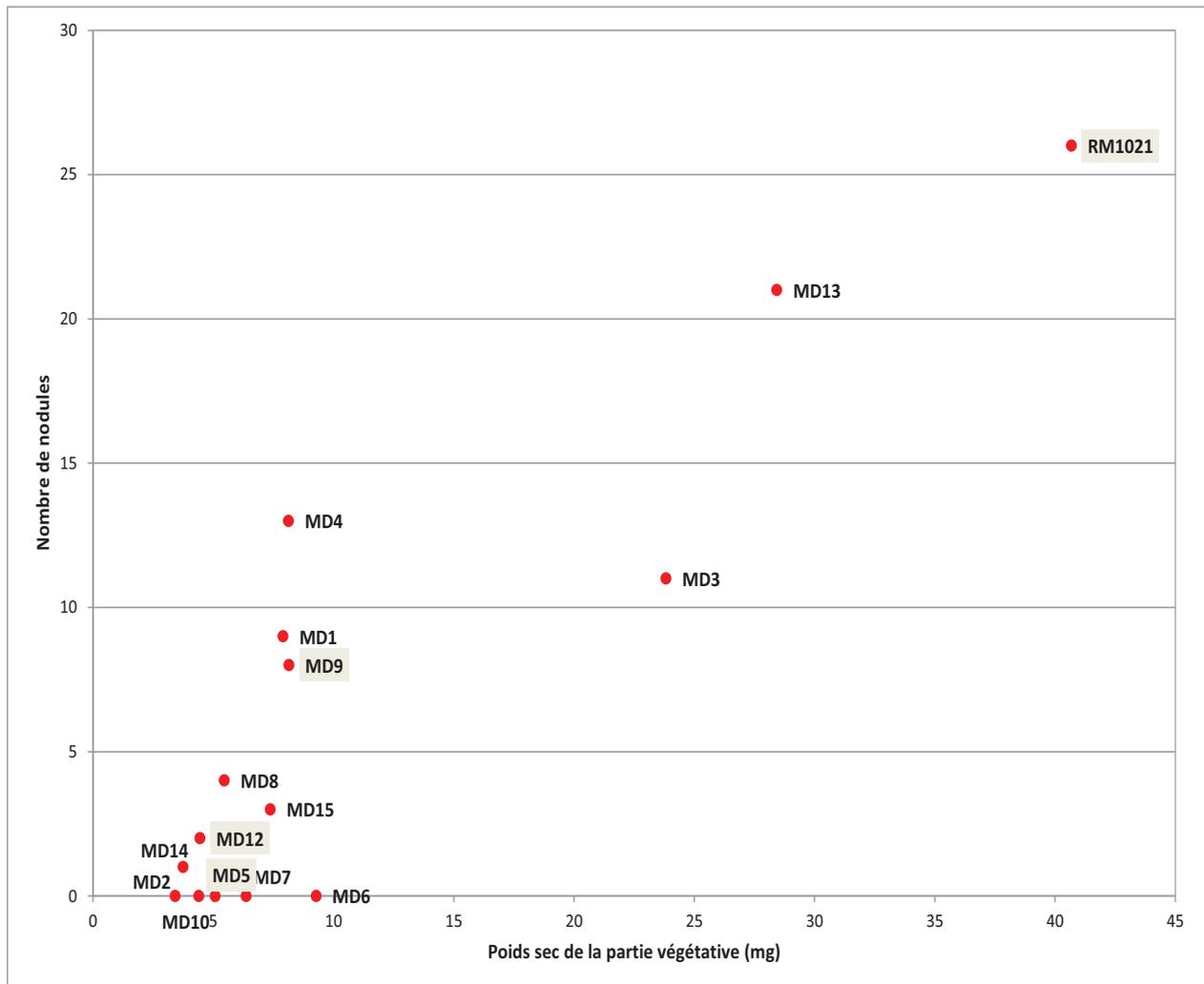


Fig.25 : Nombre moyen des nodules formés par les isolats (série MD) en fonction du poids de la partie aérienne

Les isolats de série MD (*Medicago*) ont induit la formation d'un nombre de nodules qui varie entre 0 et 21 nodules/plant.

Nous remarquons que 60 % des isolats montre un taux de nodulation inférieure de 5 nodules/plant.

Ces résultats sont proches à ceux observés lors de la récolte des plantes de *Medicago littoralis* à partir du sol oasien.

La souche de référence *Ensifer meliloti* Rm1021 a donné une moyenne de 26 nodules/plant.

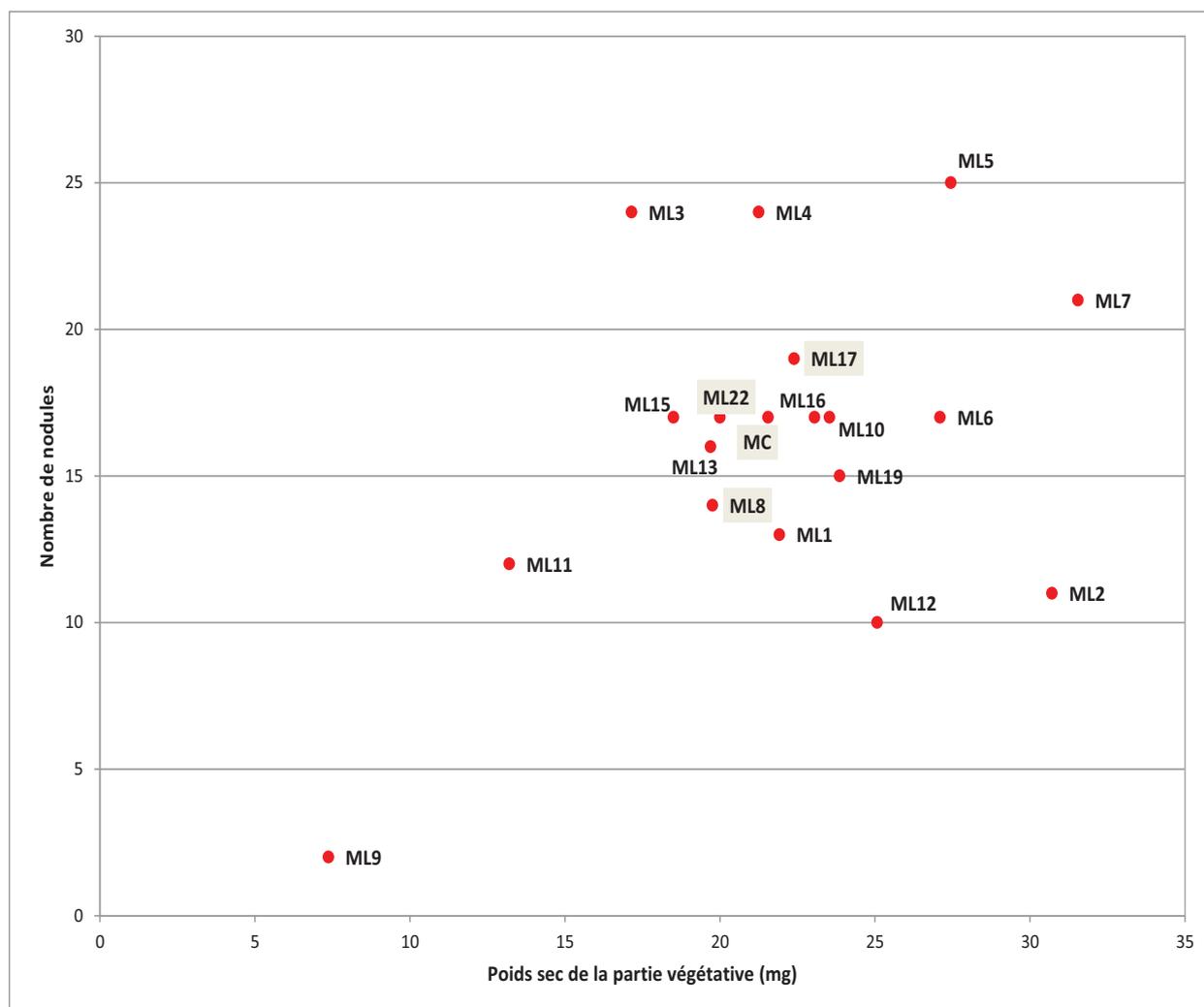


Fig.26 : Nombre moyen des nodules formés par les isolats (série ML) en fonction du poids de la partie aérienne

Les isolats de la série ML (*Melilotus*) ont induit la formation d'un nombre de nodules qui varie entre 3 et 26 nodules formés par plant, la souche de référence *Mesorhizobium* M4 a donné une moyenne de 17 nodules/plant.

D'après ces résultats, nous remarquons que le taux de nodulation dans les conditions de laboratoire est plus important que celui noté lors de récolte des légumineuses à partir du sol oasien.

Ces résultats indiquent que la plupart des isolats testés sont capables d'infecter leurs plantes hôtes et par conséquent la production de biomasse aérienne des plants nodulés est plus importante en comparaison avec ceux non nodulés.

En comparant ces résultats avec ceux observés au cours de la récolte des plantes sauvages (à partir du sol oasien), nous notons que le taux de nodulation présenté par les isolats sous conditions de laboratoire est plus important que celui *in vivo*.

En prenant en compte les températures semblables de la période de récolte (entre 7 et 22°C à Touggourt en Février/Mars) et celles de la période de la réalisation du test de nodulation (entre 7 et 20°C à Annaba en Février/Mars), ces observations démontrent l'influence du stress salin du sol oasien sur le taux de nodulation et le processus de la symbiose entier.

Nous remarquons aussi que le nombre de nodules induits par les isolats des séries MD et ML, représentés dans les fig. 25 et 26, est relativement faible comparé aux souches de références l'*Ensifer meliloti* Rm1021 et la *Mesorhizobium* M4

Aussi, le nombre de nodules formés par les isolats de la série ML est plus élevé que celui des isolats de la série MD.

Ces observations ont aussi été remarqués et notés par Zahran (2001) ; il explique ce phénomène par le fait que les rhizobia qui survivent dans des conditions défavorables de chaleur et de salinité peuvent perdre leur infectivité, suite à la perte du plasmide (qui porte les gènes responsables de la symbiose) ou à une modification dans la composition des polysaccharides cellulaires nécessaires pour l'infection.

Aussi, la symbiose légumineuse-rhizobia dans la nature est très sensible aux contraintes de l'environnement (Drevon et al. 2004; Serraj et al. 2004; Bruning et Rozema 2012; Palma et al. 2013). Habituellement, la température relativement élevée (35-40°C) conduit à la formation des nodules inefficaces.

La nature du substrat utilisé (sable) est un autre facteur qui peut expliquer la faible infectivité observée chez nos isolats par rapport aux souches de références (*Ensifer meliloti* 1021 et *Mesorhizobium ciceri* M4). En effet, des recherches ont montré que dans la culture en sols sablonneux, la productivité des plantes et l'efficacité symbiotique étaient de 5 à 8 fois inférieures que dans la culture hydroaéroponique (culture hors-sol utilisant des solutions nutritives et des substrats inertes) (Jebara et al. 2001). Donc, la culture en sable ne peut être adéquate pour sélectionner les partenaires symbiotiques les plus efficaces.

L'espèce *Ensifer meliloti* possède un large spectre d'hôte pour les espèces des légumineuses sauvages (Al Sherif et al. 2004 ; Amrani et al. 2010). Nos résultats sur le piégeage des rhizobia montrent que la légumineuse *Melilotus indicus* est un très bon hôte pour l'espèce *Ensifer meliloti* résistante aux stress abiotiques des sols oasiens.

Les résultats de l'induction de la nodulation par les isolats des séries MD et ML (fig.25 et 26) se répartissent en trois groupes :

- 1^{er} groupe : 15 à 20 nodules / plant
- 2^{ème} groupe : 15 à 8 nodules / plant
- 3^{ème} groupe : moins de 8 nodules / plante

A partir de ces groupes, nous avons sélectionné 15 isolats (9 de ML et 6 de MD) pour une caractérisation phénotypique (70 caractères) en utilisant les galeries API 20 NE et 50 CH.

5.2. La nodulation croisée

La nodulation croisée a été effectuée sur la légumineuse *Medicago ciliaris* inoculée par 10 isolats de la série ML isolés de *Melilotus*: ML05, ML06, ML07, ML08, ML11, ML12, ML13, ML14 et ML16.

La fig.27 présente les résultats obtenus et montrent que tous les 10 isolats testés sont capables d'infecter les plants de *Medicago ciliaris*.

Les nodules formés sont de type indéterminé (cylindrique) légèrement roses ou jaunes.

La fig. 27 montre aussi que les isolats ML08, ML13, ML14 et ML16 ont formé :

- Le nombre le plus élevé de nodules sur *Medicago ciliaris*
- La plus grande quantité en biomasse produite.

Les résultats de ce test ainsi que ceux des essais de nodulation montrent le grand pouvoir d'infectivité de ces isolats de la série ML.

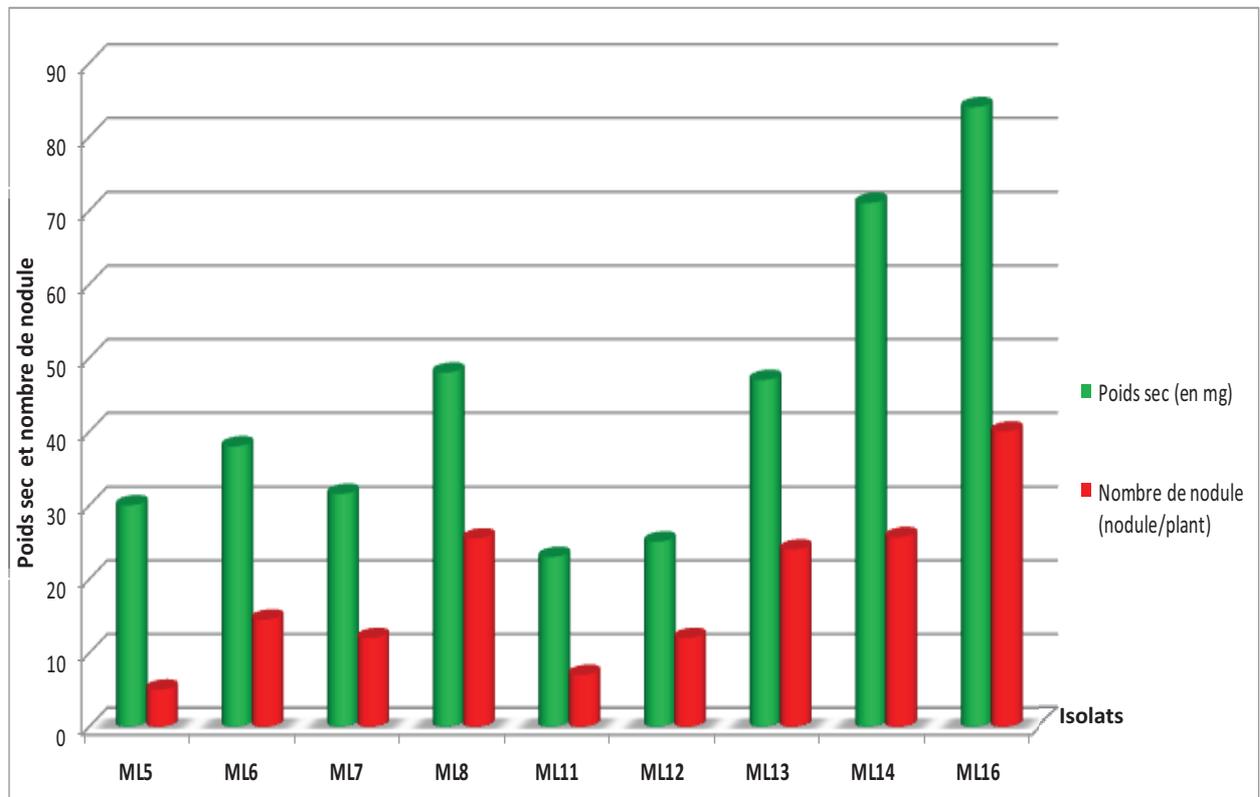


Fig. 27 : Infectivité et production de matière végétale par *Medicago ciliaris* inoculée par les isolats de la série ML

L'infectivité est une caractéristique très recherchée et place les isolats de la série ML comme meilleurs candidats pour leur usage comme biofertilisants.

Ils peuvent aussi être utilisés pour le développement de nouveaux inoculants pour d'autres légumineuses cultivées dans les régions arides de l'Algérie.

6. Etude de la tolérance des isolats aux différents stress

6.1. La tolérance à la température

Les isolats des séries ML et MD sont testés pour évaluer leur croissance sous quatre températures (28, 37, 40 et 45°C).

Dans cette étude 98 % des isolats sont capables de se développer à une température de 45°C, ces souches sont isolées de plantes autochtones d'une région aride (Touggourt) avec une moyenne des températures maximales de 45°C (Djennane 1990).

La fig. 28 montre que tous les isolats testés se sont développés aux températures 28, 37 et 40°C. La majorité des isolats (98 %) ainsi que les souches de références (*Ensifer meliloti* Rm1021, *Mesorhizobium ciceri* M4 et l'*Agrobacterium tumefaciens* C58) ont supporté des températures allant jusqu'à 45°C.

Dans les régions arides, la température élevée du sol affecte à la fois la survie et les propriétés symbiotiques des rhizobia (Zahran 1999). Pour la plupart des rhizobia, la température optimale de croissance est comprise entre 28 et 31°C et de nombreuses rhizobia sont incapables de croître à 38°C (Zahran 2001; Cacciari et al. 2003; Al Sherif et al. 2004 ; Thami-Alami et al. 2010).

Pour résister aux effets des températures élevées, les rhizobia à croissance lente et rapide synthétisent des protéines appelées « *de choc thermique* » (Zahran 1999, Michiels et al. 1994).

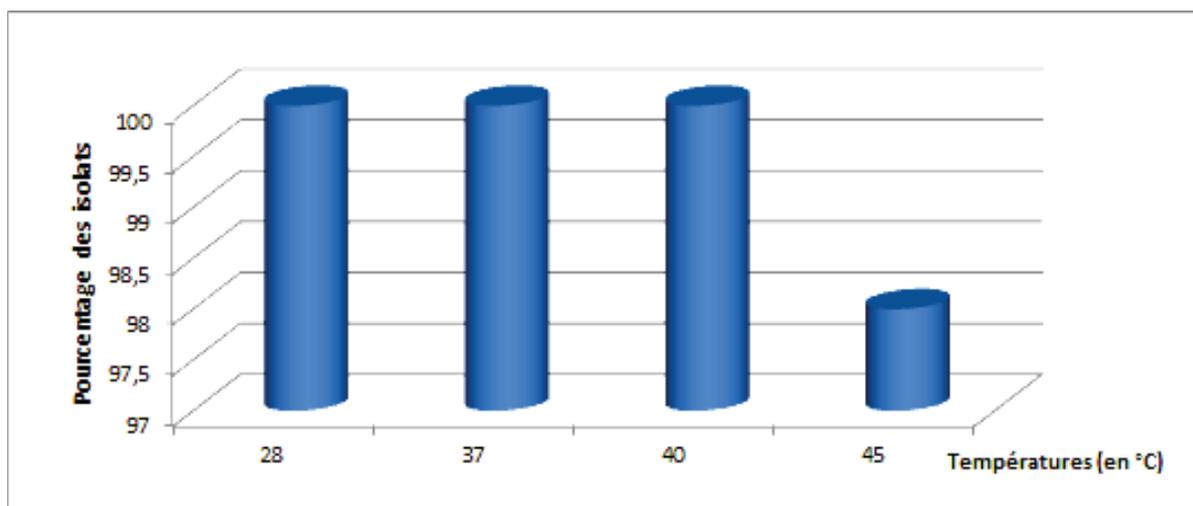


Fig. 28 : Tolérance des isolats à différentes températures

6.2. La tolérance à la salinité

Ce test est réalisé pour étudier la croissance des isolats en présence de différentes concentrations de NaCl (0, 0.01, 2.5, 3.5, 4.5 et 6 % de NaCl).

Pour les tests de salinité, les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec ceux de Thami-Alami et al. (2010) qui ont montré que les rhizobia à croissance rapide ; et nos isolats sont à croissance rapide ; sont plus tolérants à la salinité que celles à croissance lente.

Les résultats obtenus sont représentés dans la fig.29 et font ressortir :

- 100 % des isolats se sont développés aux faibles concentrations en NaCl (0 et 0.01 %),
- 98 % des isolats tolèrent une concentration de 1 % en NaCl
- 87 % des isolats tolèrent une concentration de 2.5 % de NaCl
- 75 % des isolats tolèrent une concentration de 3.5 % de NaCl
- 52.5 % des isolats tolèrent une concentration de 4.5 % de NaCl
- 45 % des isolats et *Agrobacterium tumefaciens* C58 tolèrent une concentration de 6 % de NaCl.

Remarque : *Ensifer meliloti* 1021 et *Mesorhizobium ciceri* M4 n'ont pas toléré des concentrations supérieures à 1 % de NaCl.

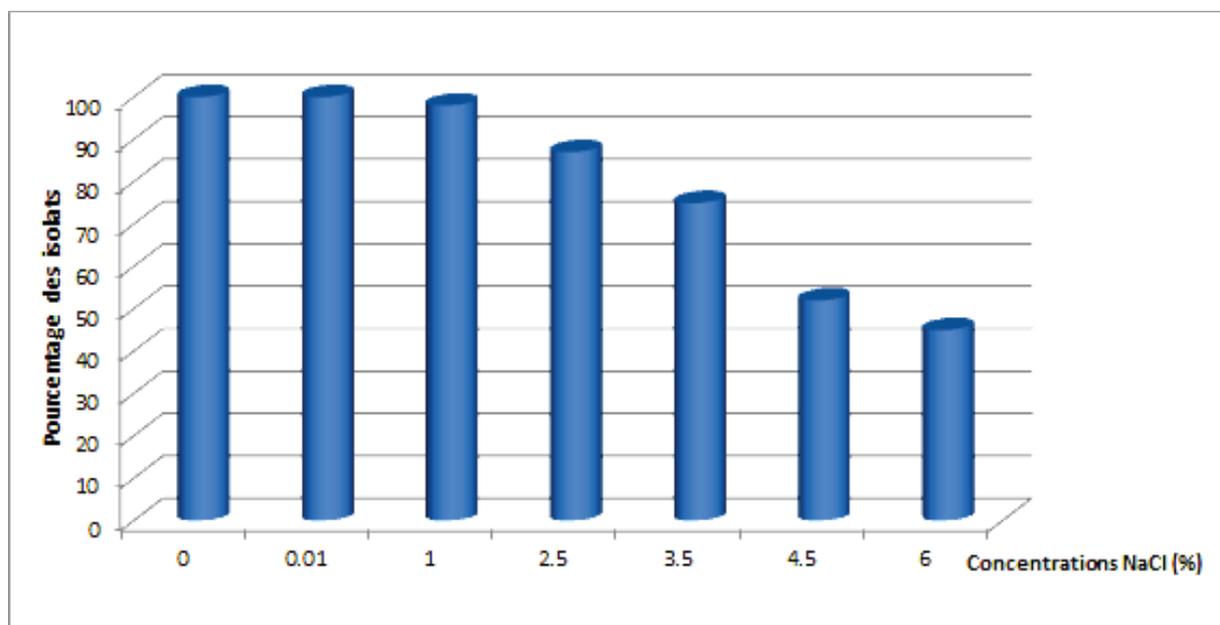


Fig. 29 : Tolérance des isolats à la salinité

Il a été noté que la salinité engendre des modifications de la morphologie et de la taille des rhizobia ainsi que la composition des exopolysaccharides (EPS) et des lipopolysaccharides (LPS) (Zahran 1999 ; Nogales et al. 2001). Ceci entraîne des répercussions sur la symbiose parce que les EPS et les LPS sont indispensables pour le développement des nodules et le processus de symbiose en général (Zahran 1999 ; Unni et Rao 2001 ; Nogales et al. 2001).

Dans les régions arides et semi-arides, la salinité des sols constitue une menace sérieuse pour l'agriculture (Zahran 2001; Palma et al. 2013). Presque 40% des terres dans le monde

sont considérées comme ayant des problèmes de salinité et la plupart de ces terres sont situées dans les régions sahariennes, les régions tropiques et méditerranéennes (Koull et al. 2013).

Le succès donc d'une symbiose rhizobia-légumineuse sous stress salin exige la sélection des bactéries halotolérantes.

6.3. Analyse en composantes principales (ACP) : Relation entre la tolérance à la salinité et aux températures élevées

Le grand intérêt de l'ACP réside dans le fait qu'elle prend en compte toutes les variables étudiées simultanément.

Nous avons utilisé la méthode d'ACP pour déterminer les corrélations existant entre la tolérance des isolats à la salinité et aux températures élevées.

Pour simplifier l'interprétation de cette analyse, nous avons choisi de réaliser une ACP pour les résultats de la tolérance à la salinité à chaque température séparément (fig. 30a ; 30b ; 30c et 30d).

En observant les quatre figures et d'après la disposition des vecteurs des variables, nous pouvons déduire que le premier axe (F1) représente la progression des concentrations en NaCl dont les faibles concentrations ont des faibles scores sur cet axe et ainsi le contraire.

Le deuxième axe (F2) représente l'opposition entre les faibles et les fortes concentrations en NaCl.

De même, les projections des individus sur les plans formés par les premières composantes principales permettent de visualiser la répartition des différents individus (isolats), ce qui donne une idée sur leur ressemblance vis-à-vis des variables mesurées (salinité et température).

D'après l'observation des quatre figures, il est clairement démontré que la disposition des variables (concentration NaCl) et la répartition des individus (isolats) sont différentes d'une température à l'autre, ce que signifie que cette dernière influence fortement sur le pouvoir des isolats à tolérer les différentes concentrations de NaCl.

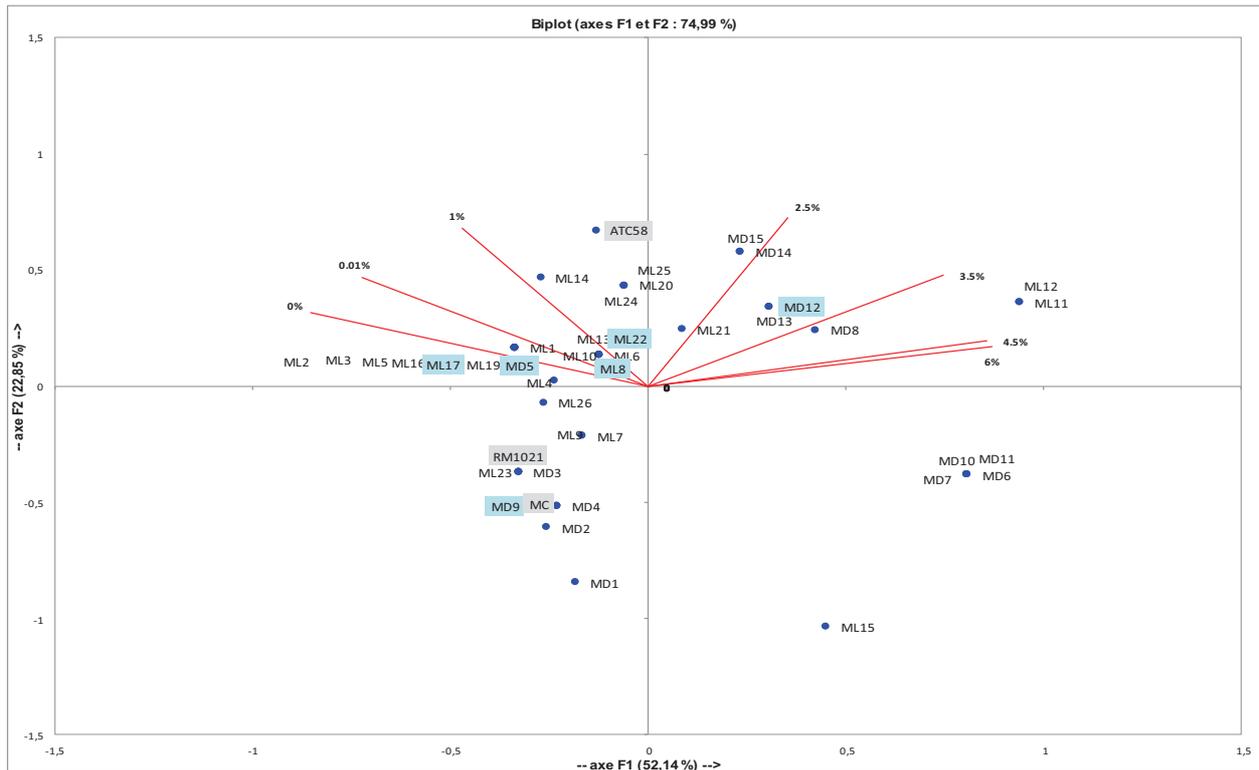


Fig. 30a: ACP représente la relation entre la tolérance des isolats aux différentes concentrations de NaCl et la croissance à la température 28°C. Rm1021: *E. meliloti* 1021, MC: *M. ciceri*, ATC58: *A. tumefaciens*. En bleu: isolats séquencés; en gris souches de référence.

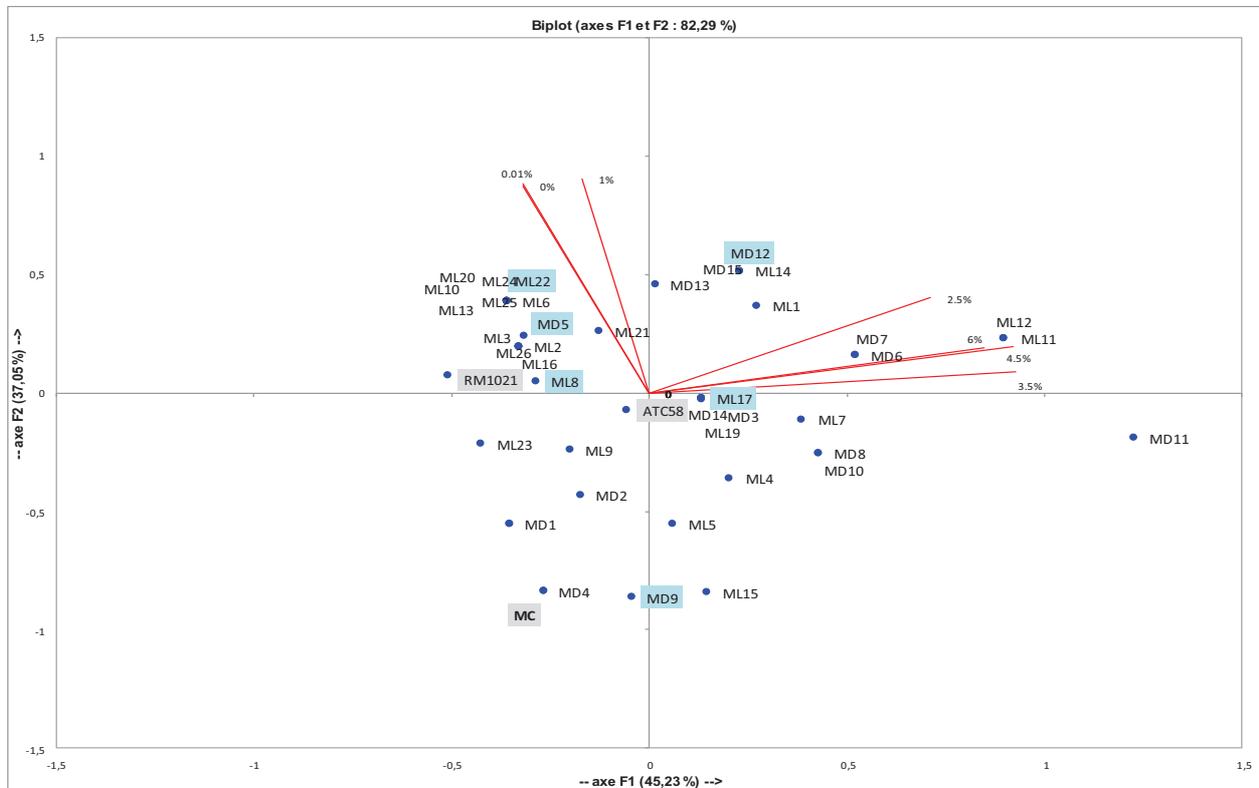


Fig. 30b: ACP représente la relation entre la tolérance des isolats aux différentes concentrations de NaCl et la croissance à la température 37°C. Rm1021: *E. meliloti* 1021, MC: *M. ciceri*, ATC58: *A. tumefaciens*. En bleu: isolats séquencés; en gris souches de référence.

Nous avons remarqué aussi que le nombre des isolats tolérants des fortes salinités atteint son niveau maximale à température 37°C (de 13 isolats à 28°C en 19 isolats à 37°C) ce qui peut être due au fait que la température optimale de croissance des rhizobias est environ 30°C, après ce niveau, plus la température augmente plus que la tolérance des isolats diminue.

Les matrices de corrélation (voir annexe 2) montrent qu'il existe une corrélation positivement entre les faibles concentrations de NaCl (de 0 % à 1 % de NaCl) et ainsi le cas entre les fortes concentrations (de 2.5 % à 6 % de NaCl) mais une corrélation négative est remarquée entre les fortes et les faibles concentrations.

Le facteur F1 regroupe tous les isolats représentant une tolérance aux fortes concentrations de NaCl dans le pôle positif alors que les isolats intolérables aux concentrations plus de 1 % de NaCl ont été groupés dans le pôle négatif. Donc plus l'isolat tolère une forte concentration de NaCl plus il a un score élevé sur l'axe F1, et d'après ces résultats nous pouvons constater que les isolats ML11 ; ML12 et MD11 représentent les souches les plus tolérantes à la salinité, et que leur tolérance a été affaiblie par l'augmentation de température mais pas totalement infirmé comme le cas des autres isolats.

Nos résultats ont montré donc la présence d'une forte corrélation entre la tolérance des isolats à la salinité et leur tolérance aux hautes températures, cette corrélation a été confirmée clairement par l'ACP.

La plupart de nos souches semblent être tolérantes à plus que 2 % de NaCl. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études réalisées sur les rhizobias de la région méditerranéenne (Priefer et al. 2001; Maâtallah et al. 2002; Cacciari et al. 2003; Mnasri et al. 2007).

Cette résistance révèle leur tolérance à la salinité de leur sol d'origine correspond à la charge élevée de l'eau d'irrigation en sel (entre 4 et 7 g/l de résidu sec) (Le Houérou 1975; Djennane 1990; Djili et al. 2003; Tabouche et Achour 2004 ; Bruning et Rozema 2012 ; Koull et al. 2013).

Plusieurs auteurs ont rapporté que les rhizobias associées aux genres *Medicago* et *Melilotus* sont capables de croître en présence de plus de 2 % NaCl (Rome et al. 1996; Yan et al. 2000; Thami-Alami et al. 2010; Djedidi et al. 2011).

Les résultats obtenus dans cette étude sont en désaccord avec ceux de Boukhatem et al. (2012) qui ont rapporté que la tolérance des souches rhizobiennes au NaCl en cultures pures

in vitro ne présente aucune relation avec leur tolérance la salinité de leurs sols d'origines qui peut être expliqué par le fait que les rhizobia dans le sol sont localisés dans des microniches de la rhizosphère et à l'intérieur des nodules et donc elles sont protégés des contraintes du sol.

L'analyse comparative entre les résultats de tolérance à la température et à la salinité a montré que la fréquence des rhizobia présentant une résistance aux deux stress (température et salinité à la fois) est très faible, comme il est rapporté par Djedidi et al. (2011).

Dans notre étude seulement un isolat (ML12) a pu survivre à une température de 45°C et en présence de plus que 3 % de NaCl, cela pourrait dû au fait que les oasis constituent une zone distinctement différente en température et en humidité que l'environnement chaud et aride des entours.

Par conséquent, ce résultat suggère que dans le but de chercher des inoculums convenables avec multi-tolérance (température et salinité) pour la culture des légumineuses dans les régions arides et semi-arides, il est nécessaire de réaliser des études de tolérance sur une grande collection d'isolats.

6.4. La tolérance aux pH acides ou alcalins

L'effet de l'acidité et de l'alcalinité sur la croissance des isolats des séries MD et ML a été testé sur milieu YEMA ajusté aux différents pH.

Les résultats de la tolérance des isolats aux différents pH sont présentés dans la fig. 31.

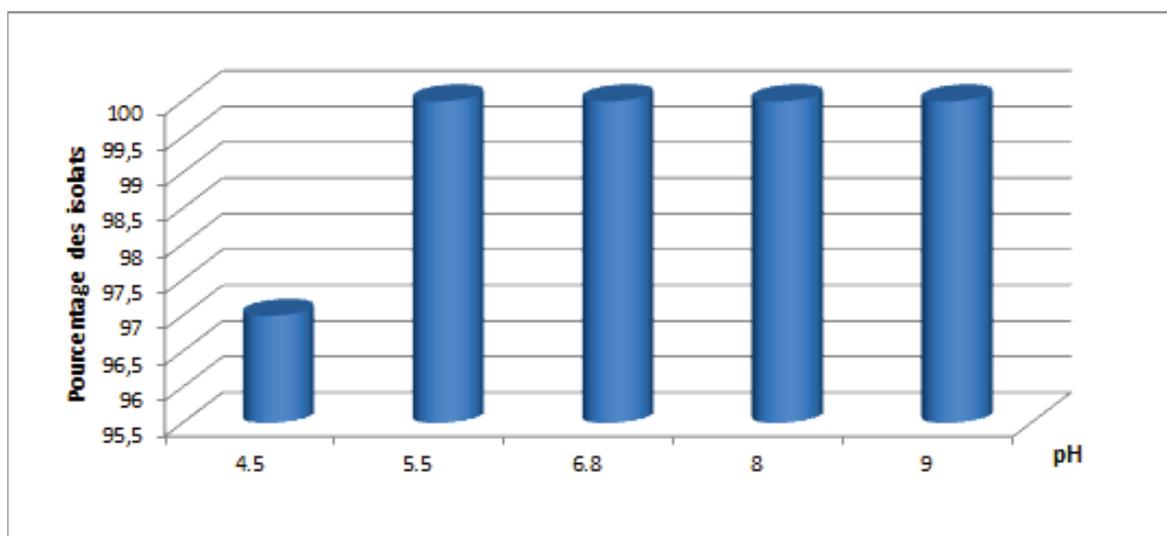


Fig. 31 : Tolérance des isolats aux différentes valeurs de pH

Les résultats représentés sur la fig. 31, montrent que la quasi-totalité des isolats (97 %) ainsi que les souches de référence (*Ensifer meliloti* 1021, *Mesorhizobium* M4 et *Agrobacterium tumefaciens* C58) se sont développés aux pH compris entre 4.5 et 9. Nous remarquons que seule la souche ML15 n'a pas toléré un pH acide, inférieur à 5.5.

Les souches testées sont donc tolérantes aux pH acides et ces résultats concordent avec ceux observés par Thami-Alami (2010), Mahdhi (2008) et Priefer (2001). Notons que l'espèce *Ensifer meliloti* peut tolérer un pH 3.5 selon Thami-Alami (2010).

Nos résultats sont par contre différents de ceux observés par Yan et al. (2000) ; qui considère que les rhizobia à croissance rapide sont généralement moins tolérantes aux pH acides que les rhizobia à croissance lente. Quant à Zahran (1999), il note que quelques rhizobia seulement, à croissance rapide, sont tolérantes aux milieux acides.

Notons que le pH est l'un des facteurs majeurs limitant la survie et les propriétés symbiotiques des rhizobia dans le sol (Shetta et al. 2011).

La fig. 32 montre la croissance de quelques isolats sur milieux acide et alcalin.

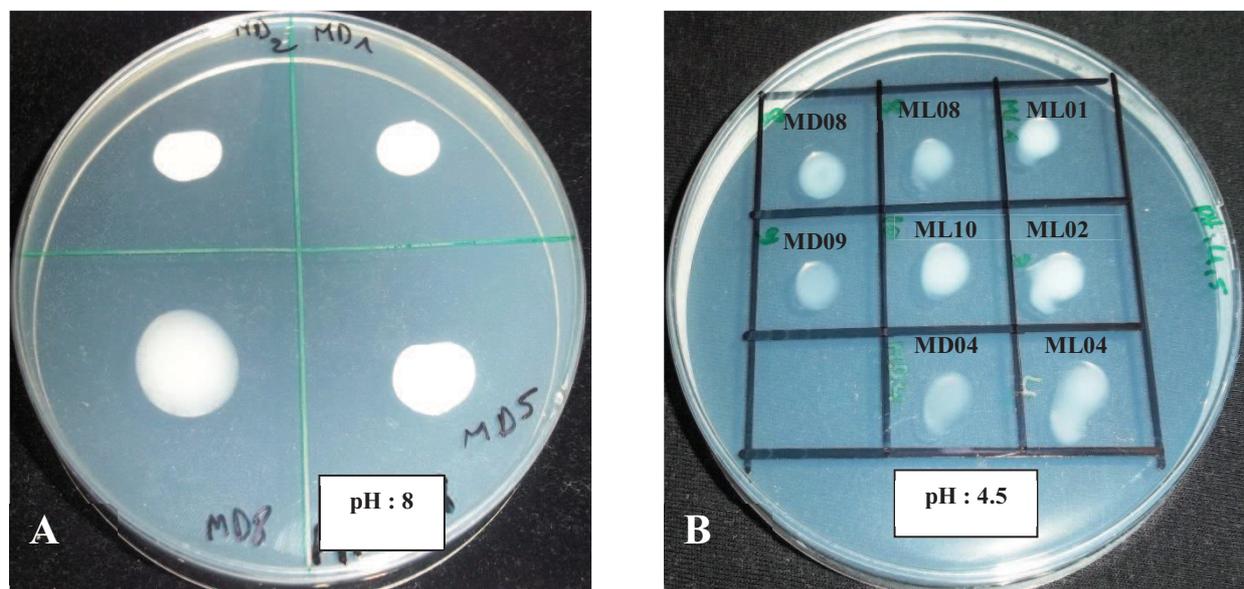


Fig. 32 : Croissance des isolats sur YEMA ajusté aux différents pH. A ; croissance des isolats de *Medicago*, B ; croissance des isolats de *Melilotus*

Les rhizobia présentent différents mécanismes de tolérance aux pH extrêmes tel que les modifications de la composition des lipopolysaccharides (LPS) (Zahran 1999).

6.5. La tolérance au stress hydrique

La tolérance au stress hydrique ou osmotolérance est estimée pour l'ensemble des isolats sur milieu YEMA additionné de polyéthylène glycol 4000 (PEG 4000) à différentes concentrations.

La fig. 33 montre que les isolats ont toléré toutes les concentrations en PEG 4000 testées.

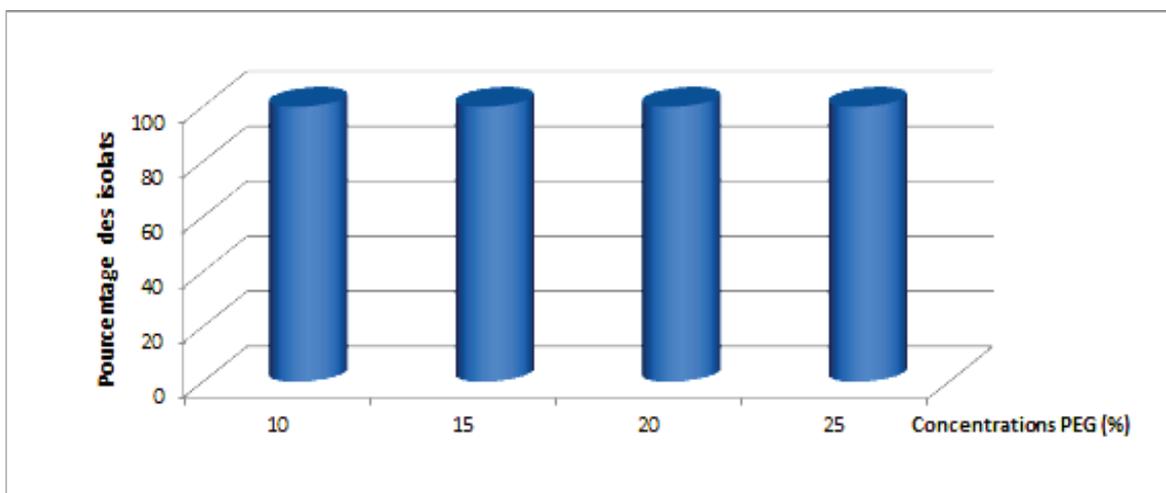


Fig. 33 : Tolérance des isolats aux différentes concentrations de PEG 4000

La fig. 34 montre la croissance de deux isolats en présence de différentes concentrations de PEG 4000.

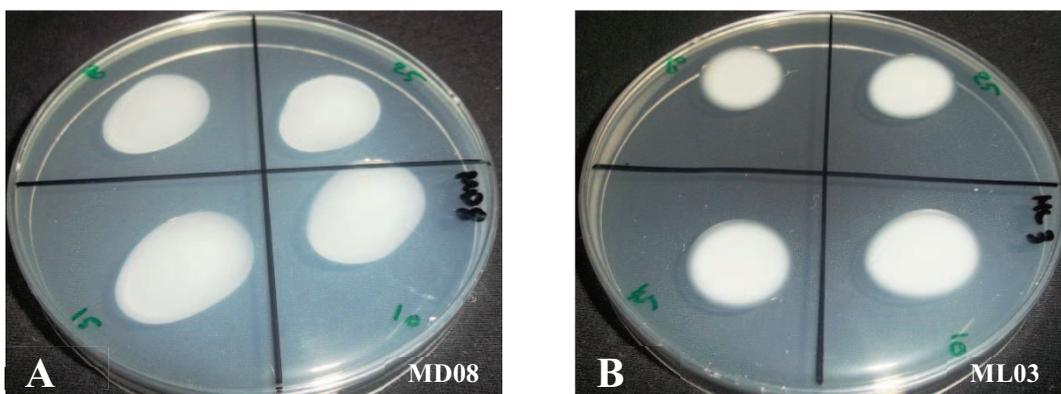


Fig. 34 : Croissance des isolats sur YEMA additionné de PEG 4000. A : MD8, B : ML03

Il existe une forte corrélation entre la tolérance aux stress salin et hydrique (sécheresse) ; nous avons observé que les isolats halotolérants sont aussi tolérants aux fortes concentrations de PEG.

Ces résultats obtenus concordent avec ceux observés par Amrani et al. (2010), il suggère que les mécanismes de l'osmoadaptation sont opérés en communs.

Plusieurs mécanismes d'adaptation au stress osmotique ont été décrits chez les rhizobia, l'une des réponses au déficit hydrique concerne le changement morphologique des cellules bactériennes (Zahran 1999 ; Unni et Rao 2001 ; Nogales et al. 2001 ; Thami-Alami et al. 2010).

7. Test de distinction *Agrobacterium/Rhizobia*

La 3-cétolactose hydrolase est une enzyme produite par les souches d'*Agrobacterium* (biovar 1) durant leur croissance sur le lactose (Janssens et al. 1983). La recherche de cette enzyme est un test spécifique pour la distinction entre les *Agrobacterium* et les autres rhizobia. Ce test est utile pour une présélection des souches d'*Agrobacterium* (Murugesan et al. 2010).

Les résultats de ce test confirment l'absence de l'enzyme 3-cétolactose hydrolase pour tous les isolats testés. Nous pouvons donc avancer que les isolats testés n'appartiennent pas au genre *Agrobacterium*.

La fig.35 présente des résultats obtenus pour la mise en évidence de l'activité 3-cétolactose hydrolase.

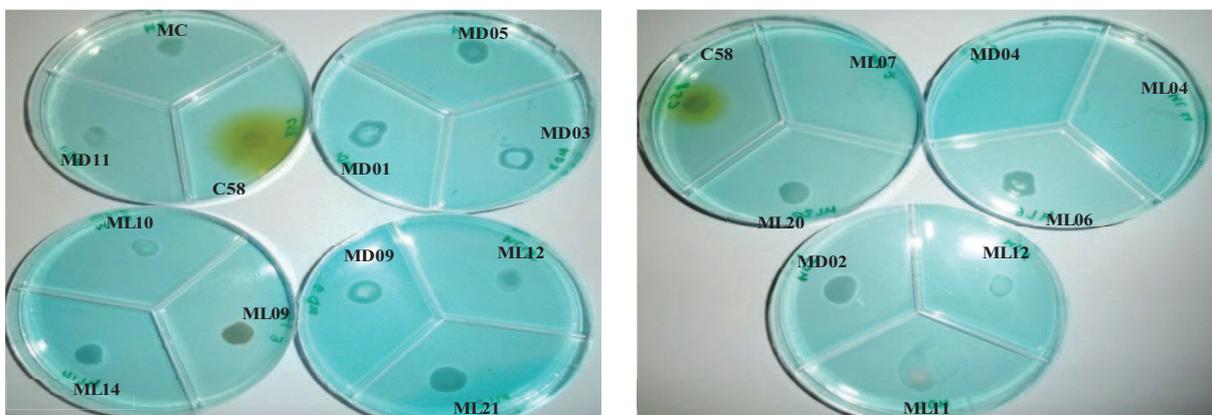


Fig. 35 : Photos des résultats du test de 3-cétolactose

8. Etude de la résistance ou sensibilité des isolats aux antibiotiques

La sensibilité ou la résistance des isolats aux différents antibiotiques testés sont évaluées en utilisant deux méthodes ; par disques d'antibiotique (ATB) et sur milieu YEMA additionné d'ATB.

La totalité des isolats ainsi la *E. meliloti* 1021 et l'*Agrobacterium tumefaciens* C58 montrent une forte sensibilité à la kanamycine, tétracycline et rifampicine, contrairement à *Mesorhizobium ciceri* qui est résistante à la kanamycine et à la tétracycline.

La fig. 36 et 37 montrent des exemples sur les résultats du test de résistance aux ATB selon les deux méthodes utilisées.



Fig. 36 : Croissance des isolats en présence des disques d'ATB

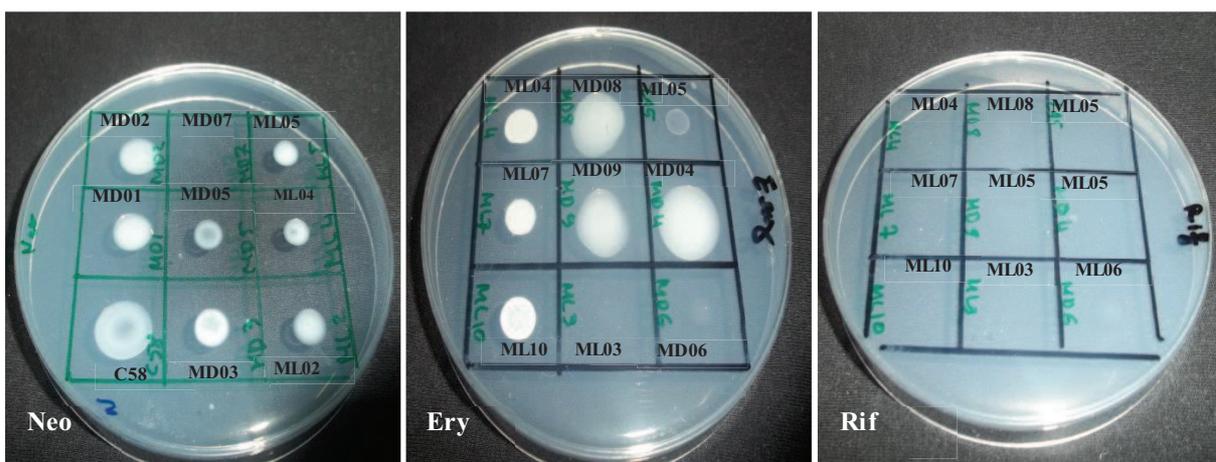


Fig. 37 : Croissance des isolats en présence des ATB (additionnées au milieu YEMA)

La fig. 38 montre que la presque totalité des isolats (93 %) présentent une forte résistance à la néomycine, la majorité d'eux résistent à l'ampicilline (87 %), l'acide nalidixique (85 %) et l'érythromycine (80 %). Pour le reste des antibiotiques, les résultats obtenus sont variables d'une souche à l'autre.

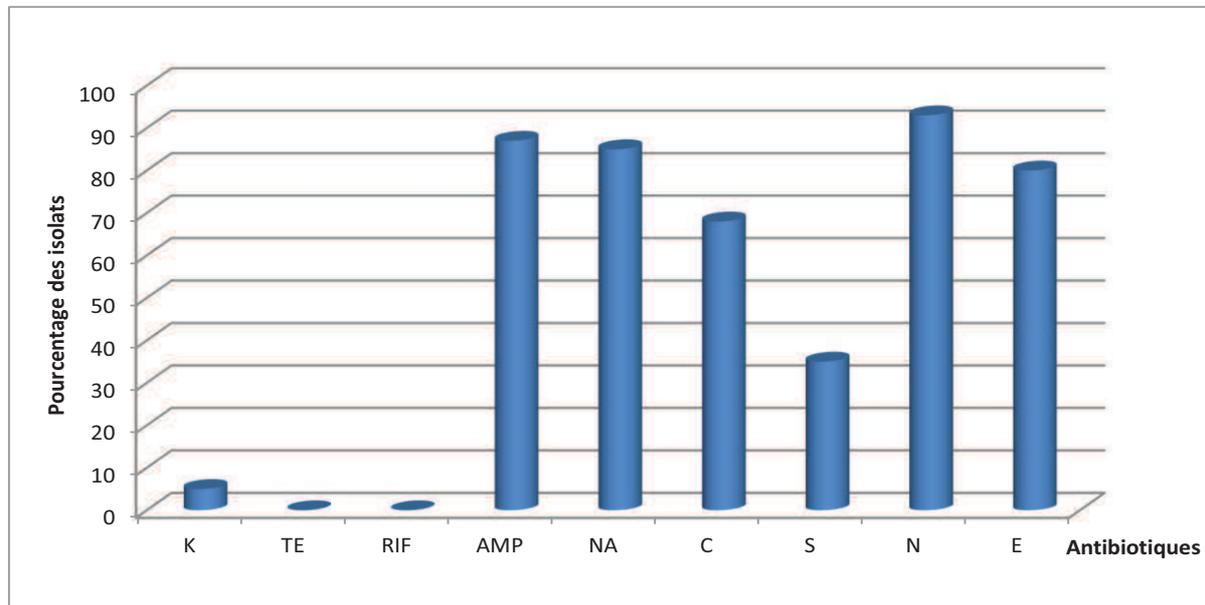


Fig. 38: Résistance intrinsèque des isolats aux antibiotiques : K: Kanamycine, TE: Tétracycline, R: Rifampicine, AM: Ampicilline, AN: Acide Nalidixique, C: Chloramphénicol, S: Streptomycine, N: Néomycine, E: Erythromycine.

Dans cette étude, toutes les souches sont sensibles à la tétracycline et à la rifampicine, la plupart se sont montrées sensibles à la streptomycine et à la kanamycine.

Ces résultats s'accordent avec ceux de Jordan (1984) qui a montré que les rhizobia à croissance rapide sont sensibles à la tétracycline et à la streptomycine. Ces résultats concordent aussi avec ceux de Bromfield et al. (2010) qui a montré que les souches d'*E. meliloti* sont sensibles à environ 5 µg de kanamycine et de tétracycline.

Les isolats sont fortement résistants au chloramphénicol, l'acide nalidixique, l'ampicilline, la néomycine et l'érythromycine ; ces résultats sont en accord avec ceux de Bromfield et al. (2010) qui a montré que des souches d'*Ensifer meliloti* sont résistantes à des concentrations supérieures de 50 µg d'érythromycine et de 20 µg d'acide nalidixique.

Il a aussi été montré que les espèces d'*E. meliloti* et *E. medicae* isolées des sols marocain présentent une forte résistance au chloramphénicol (Elboutahiri et al. 2010).

9. Caractérisation biochimique et assimilation des hydrates de carbone

9.1. Recherche de la catalase

Le test de la catalase est effectué pour les 40 isolats et les résultats obtenus montrent que toutes les souches sont catalase positive c'est-à-dire qu'il y a un dégagement d'oxygène gazeux issu de la dégradation de l'eau oxygénée.

Les caractères ainsi obtenus sont ceux des rhizobia ; en effet Jordan (1984) rapporte que les rhizobia sont des bactéries à catalase positive et Gram négatif.

9.2. Assimilation des hydrates de carbone (API 20 NE et API 50 CH)

Un total de 49 substrats carbonés ont été testés pour étudier l'assimilation des hydrates de carbone des 15 isolats sélectionnés (ML01, ML03, ML04, ML05, ML07, ML08, ML12, ML17, ML22, MD03, MD04, MD05, MD09, MD12 et MD13) et les souches de références *Ensifer meliloti* 1021, *Mesorhizobium ciceri* (M4) et *Agrobacterium tumefaciens* C58.

Le tableau 23 résume les résultats obtenus des tests biochimiques sur galeries API 20 NE des 15 isolats.

Tableau 23 : Résultats des tests conventionnels sur galeries API 20 NE des 15 isolats.

Test	Composants actifs	Réaction/enzyme	Isolats							
			ML01	ML03	ML04	ML05	ML07	ML08	ML12	ML17
NO3	Potassium nitrate	Réduction des nitrates	+	+	+	+	+	+	+	+
TRP	L-tryptophane	Formation d'indole	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	D-glucose	Fermentation du glucose	+	+	+	+	+	+	-	+
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	Urée	UREase	+	+	+	+	+	+	-	+
ESC	Esculine de Fer	Hydrolyse (β -glucosidase)	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	Gélatine	Hydrolyse (protéase)	-	-	-	-	-	-	+	-
PNPG	4-nitrophényl- β -dgalactopyranoside	β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β DGalactopyranosidase)	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) résultat positif ; (-) résultat négatif.

Tableau 23 (suite): Résultats des tests conventionnels sur galeries API 20 NE des 15 isolats.

Test	Composants actifs	Réaction/enzyme	Isolats						
			ML22	MD03	MD04	MD05	MD09	MD12	MD13
NO3	Potassium nitrate	Réduction des nitrates	+	+	+	+	+	+	+
TRP	L-tryptophane	Formation d'indole	-	-	-	-	-	-	-
GLU	D-glucose	Fermentation du glucose	+	+	-	+	+	+	+
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	-	-	-	-	-	-	-
URE	Urée	UREase	+	+	+	+	+	+	+
ESC	Esculine Citrate de Fer	Hydrolyse (β -glucosidase)	+	+	+	+	+	+	+
GEL	Gélatine	Hydrolyse (protéase)	-	-	-	-	-	-	-
PNPG	4-nitrophényl- β -dgalactopyranoside	β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β DGalactopyranosidase)	+	+	+	+	+	+	+

(+) résultat positif ; (-) résultat négatif.

Les données du tableau 23 montrent que les 15 isolats présentent des réponses semblables pour tous les tests, à l'exception de la ML12 et de la MD04 qui donnent une réaction négative pour la fermentation du glucose. La souche ML12 donne une réaction négative pour l'uréase et elle est capable d'hydrolyser la gélatine.

Pour les autres tests, les isolats sélectionnés réduisent les nitrates, possèdent les enzymes uréase (à l'exception de ML12), la β -glucosidase et la β -galactosidase.

Par ailleurs, tous les isolats sélectionnés sont incapables de produire l'indole, ils sont dépourvus de l'enzyme arginine dihydrolase et de la protéase.

Concernant l'assimilation des substrats carbonés sur API 20 NE, le tableau 24 résume les résultats obtenus des 15 isolats testés.

Quatorze isolats (sauf la ML12) ont métabolisé le D-glucose, le L-arabinose, le D-mannose, le D-mannitol, le N-acétyl glucosamine, le gluconate de potassium, le D-maltose et l'acide malique.

D'autre part, les 15 isolats sont incapables de se développer sur l'acide caprique, le citrate trisodium et l'acide phénylacétique.

Les isolats ont présenté des réactions variables avec l'acide adipique.

Tableau 24: Résultats des tests d'assimilation des substrats sur API 20 NE

Test	Composants actifs	Isolats							
		ML01	ML03	ML04	ML05	ML07	ML08	ML12	ML17
GLU	D-glucose	+	+	+	+	+	+	-	+
ARA	L-arabinose	+	+	+	+	+	+	-	+
MNE	D-mannose	+	+	+	+	+	+	-	+
MAN	D-mannitol	+	+	+	+	+	+	-	+
NAG	N-acétyl-glucosamine	+	+	+	+	+	+	-	+
MAL	D-maltose	+	+	+	+	+	+	-	+
GNT	Potassium gluconate	-	+	-	+	+	-	-	+
CAP	Acide caprique	-	-	-	-	-	-	-	-
ADI	Acide adipique	+	+	-	-	+	-	-	+
MLT	Acide malique	+	+	+	+	+	+	-	+
CIT	Trisodium citrate	-	-	-	-	-	-	-	-
PAC	Acide phénylacétique	-	-	-	-	-	-	-	-

Test	Composants actifs	Isolats						
		ML22	MD03	MD04	MD05	MD09	MD12	MD13
GLU	D-glucose	+	+	+	+	+	+	+
ARA	L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+
MNE	D-mannose	+	+	+	+	+	+	+
MAN	D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+
NAG	N-acétyl-glucosamine	+	+	+	+	+	+	+
MAL	D-maltose	+	+	+	+	+	+	+
GNT	Potassium gluconate	+	-	-	+	+	+	-
CAP	Acide caprique	-	-	-	-	-	-	-
ADI	Acide adipique	+	+	+	+	+	-	+
MLT	Acide malique	+	+	+	+	+	+	+
CIT	Trisodium citrate	-	-	-	-	-	-	-
PAC	Acide phénylacétique	-	-	-	-	-	-	-

(+) résultat positif ; (-) résultat négatif.

Le tableau 25 regroupe les résultats obtenus des tests d'assimilation sur galerie API 50 CH des 15 isolats.

Tableau 25 : Résultats des tests d'assimilation sur API 50 CH des 15 isolats.

Test	Composants actifs	Isolats							
		ML01	ML03	ML04	ML05	ML07	ML08	ML12	ML17
GLY	GLYcérol	+	+	+	+	+	+	+	+
ERY	ERYthritol	+	+	+	+	+	+	+	+
DARA	D-ARAbinose	+	+	+	+	+	+	+	+
LARA	L-ARAbinose	+	+	+	+	+	+	+	+
RIB	D-RIBose	+	+	+	+	+	+	+	+
DXYL	D-XYLose	+	+	+	+	+	+	+	+
LXYL	L-XYLose	+	+	+	+	+	+	-	+
ADO	D-ADOnitol	+	+	+	+	+	+	+	+
MDX	Méthyl-βD-Xylopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+
GAL	D-GALactose	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	D-GLUcose	+	+	+	+	+	+	+	+
FRU	D-FRUctose	+	+	+	+	+	+	+	+
MNE	D-MANnosE	+	+	+	+	+	+	+	+
SBE	L-SorBosE	+	+	+	+	+	+	-	+
RHA	L-RHAMnose	+	+	+	+	+	+	+	+
DUL	DULcitol	+	+	-	+	-	+	+	+
INO	INOsitol	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	D-MANnitrol	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	D-SORbitol	+	+	+	+	+	+	+	+
MDM	Méthyl-αD-Mannopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-
MDG	Méthyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-
NAG	N-AcétylGlucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	AMYgdaline	+	+	-	+	-	+	+	+
ARB	ARButine	+	+	+	+	+	+	+	+
ESC	ESCuline citrate de fer	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) résultat positif ; (-) résultat négatif.

Tableau 25 (suite)

Test	Composants actifs	Isolats							
		ML01	ML03	ML04	ML05	ML07	ML08	ML12	ML17
SAL	SALicine	+	+	+	+	+	+	-	+
CEL	D-CELibiose	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	D-MALtose	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	D-LACtose	+	+	+	+	+	+	+	+
MEL	D-MELibiose	+	+	+	+	+	+	+	+
SAC	D-SACcharose	+	+	+	+	+	+	+	+
TRE	D-TRRhalose	+	+	+	+	+	+	+	+
INU	INUline	-	-	+	-	+	-	-	-
MLZ	D-MéléZitose	+	+	+	+	+	+	+	+
RAF	D-RAFinose	+	+	+	+	+	+	+	+
AMD	AmiDon	-	+	+	+	+	+	+	-
GLYG	GLYcoGène	-	-	+	-	+	-	+	+
XLT	XyLiTol	+	+	+	+	+	+	+	+
GEN	GENtiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
TUR	D-TURanose	+	+	+	+	+	+	+	+
LYX	D-LYXose	-	+	+	+	+	+	+	+
TAG	D-TAGatose	+	+	+	+	+	+	+	+
DFUC	D-FUCose	-	+	+	+	+	+	+	+
LFUC	L-FUCose	+	+	+	+	+	+	+	+
DARL	D-ARabitoL	+	+	+	+	+	+	+	+
LARL	L-ARabitoL	+	+	+	+	+	+	+	+
GNT	potassium GlucoNaTe	-	+	-	+	-	+	-	+
2KG	potassium2- CétoGluconate	+	+	+	+	+	+	+	+
5KG	potassium5- CétoGluconate	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) résultat positif ; (-) résultat négatif.

Tableau 25 (suite) : Résultats des tests d'assimilation sur API 50 CH des 15 isolats sélectionnés.

Test	Composants actifs	Isolats						
		ML22	MD03	MD04	MD05	MD09	MD12	MD13
GLY	GLYcérol	+	+	+	+	+	+	+
ERY	ERYthritol	+	+	+	+	+	+	+
DARA	D-ARAbinose	+	+	+	+	+	+	+
LARA	L-ARAbinose	+	+	+	+	+	+	+
RIB	D-RIBose	+	+	+	+	+	+	+
DXYL	D-XYLose	+	+	+	+	+	+	+
LXYL	L-XYLose	+	+	+	+	+	+	+
ADO	D-ADOnitol	+	+	+	+	+	+	+
MDX	Méthyl-βD-Xylopyranoside	+	+	+	+	+	+	+
GAL	D-GALactose	+	+	+	+	+	+	+
GLU	D-GLUcose	+	+	+	+	+	+	+
FRU	D-FRUctose	+	+	+	+	+	+	+
MNE	D-MANnosE	+	+	+	+	+	+	+
SBE	L-SorBosE	+	+	+	+	+	+	+
RHA	L-RHAmnose	+	+	+	+	+	+	+
DUL	DULcitol	+	+	+	+	+	+	-
INO	INOsitol	+	+	+	+	+	+	+
MAN	D-MANnitol	+	+	+	+	+	+	+
SOR	D-SORbitol	+	+	+	+	+	+	+
MDM	Méthyl-αD-Mannopyranoside	-	-	-	-	-	-	-
MDG	Méthyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	-	-	-	-
NAG	N-AcétylGlucosamine	+	+	+	+	+	+	+
AMY	AMYgdaline	+	+	+	+	+	+	-
ARB	ARButine	+	+	+	+	+	+	+
ESC	ESCuline citrate de fer	+	+	+	+	+	+	+

(+) résultat positif ; (-) résultat négatif.

Tableau 25 (suite)

Test	Composants actifs	Isolats						
		ML22	MD03	MD04	MD05	MD09	MD12	MD13
SAL	SALicine	+	+	+	+	+	+	+
CEL	D-CELObiose	+	+	+	+	+	+	+
MAL	D-MALtose	+	+	+	+	+	+	+
LAC	D-LACtose	+	+	+	+	+	+	+
MEL	D-MELibiose	+	+	+	+	+	+	+
SAC	D-SACcharose	+	+	+	+	+	+	+
TRE	D-TRRhalose	+	+	+	+	+	+	+
INU	INUline	-	-	-	-	-	-	+
MLZ	D-MéléZitose	+	+	+	+	+	+	+
RAF	D-RAFinose	+	+	+	+	+	+	+
AMD	AmiDon	-	-	-	+	+	+	+
GLYG	GLYcoGène	+	-	-	-	-	-	+
XLT	XyLiTol	+	+	+	+	+	+	+
GEN	GENtiobiose	+	+	+	+	+	+	+
TUR	D-TURanose	+	+	+	+	+	+	+
LYX	D-LYXose	+	-	-	+	+	+	+
TAG	D-TAGatose	+	+	+	+	+	+	+
DFUC	D-FUCose	+	-	-	+	+	+	+
LFUC	L-FUCose	+	+	+	+	+	+	+
DARL	D-ARabitoL	+	+	+	+	+	+	+
LARL	L-ARabitoL	+	+	+	+	+	+	+
GNT	potassium GlucoNaTe	+	-	-	+	+	-	-
2KG	potassium2- CétoGluconate	+	+	+	+	+	+	+
5KG	potassium5- CétoGluconate	-	-	-	-	-	-	-

(+) résultat positif ; (-) résultat négatif.

Tableau 26 : Résultats des tests d'assimilation sur API 50 CH des souches de références.

Test	Composants actifs	Souche			Test	Composants actifs	Souche		
		SM1021	M4	C58			SM1021	M4	C58
GLY	GLYcérol	+	+	+	SAL	SALicine	+	-	+
ERY	ERYthritol	+	+	-	CEL	D-CELobiose	+	+	+
DARA	D-ARAbinose	+	+	+	MAL	D-MALtose	+	+	+
LARA	L-ARAbinose	+	+	+	LAC	D-LACtose	+	+	+
RIB	D-RIBose	+	+	+	MEL	D-MELibiose	+	+	+
DXYL	D-XYLose	+	+	+	SAC	D-SACcharose	+	+	+
LXYL	L-XYLose	+	+	+	TRE	D-TRRhalose	+	+	+
ADO	D-ADONitol	+	+	+	INU	INUline	+	-	+
MDX	Méthyl-βD-Xylopyranoside	+	-	+	MLZ	D-MéléZitose	+	-	+
GAL	D-GALactose	+	+	+	RAF	D-RAFinose	+	+	+
GLU	D-GLUCose	+	+	+	AMD	AmiDon	+	-	+
FRU	D-FRUCtose	+	+	+	GLYG	GLYcoGène	+	-	+
MNE	D-MANnosE	+	+	+	XLT	XyLiTol	+	+	+
SBE	L-SorBosE	+	-	+	GEN	GENTIobiose	+	+	+
RHA	L-RHAMnose	+	+	+	TUR	D-TURanose	+	+	+
DUL	DULcitol	+	+	+	LYX	D-LYXose	+	+	+
INO	INOsitol	+	+	+	TAG	D-TAGatose	+	+	+
MAN	D-MANNitol	+	+	+	DFUC	D-FUCose	+	+	+
SOR	D-SORbitol	+	+	+	LFUC	L-FUCose	+	+	+
MDM	Méthyl-αD-Mannopyranoside	-	-	-	DARL	D-ARabitoL	+	+	+
MDG	Méthyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	LARL	L-ARabitoL	+	+	+
NAG	N-AcétylGlucosamine	+	+	+	GNT	potassium GlucoNaTe	+	+	+
AMY	AMYgdaline	-	-	+	2KG	potassium2-CétoGluconate	+	+	+
ARB	ARButine	+	+	+	5KG	potassium5-CétoGluconate	-	+	+
ESC	ESCuline citrate de fer	+	+	+		/			

(+) résultat positif ; (-) résultat négatif.

L'analyse des résultats du tableau 25 montre que 75 % des substrats sont assimilables par tous les isolats testés.

Par contre les substrats MD-Mannopyranoside, MD-Glucopyranoside et le potassium 5-cétogluconate ne sont pas assimilables par les isolats testés.

Les résultats obtenus de la souche de référence *Ensifer meliloti* 1021 (tableau 26) montre un profil d'assimilation des substrats semblable à ceux des isolats testés. Les isolats testés sont donc phénotypiquement très proches de *E. meliloti* 1021.

On note des différences dans l'assimilation, par les isolats, des substrats : le gluconate potassium, le glycogène, l'amidon, l'inuline et le D-lyxose.

La ML12 est la seule souche qui n'utilise pas le L-sorbose et le L-xylose.

Les isolats ML04, ML07 et MD13 n'utilisent pas l'amygdaline et le dulcitol, et ML01, ML07 et MD03 n'utilisent pas le D-fucose.

En basant sur ces résultats, nous pouvons déduire que nos isolats sont capables d'utiliser une large gamme d'hydrates de carbone (plus 38 substrats carbonés sur un total de 49).

D'autre part, ces résultats montrent aussi que les isolats assimilent préférentiellement les mono- et les disaccharides.

En vue d'étudier la similarité phénotypique des isolats, nous avons procédé à une classification hiérarchique ascendante (CHA) basée sur les données obtenus des tests sur API 20 NE et API 50 CH.

La CHA est une méthode de classification automatique utilisée en analyse des données, dans notre cas ce sont les caractères phénotypique, cette méthode est basée sur une mesure de dissimilarité, elle permet de répartir les individus (les isolats) dans un certain nombre de classe.

Le résultat de cette analyse est présenté sous forme d'un dendrogramme d'UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Average) dans la fig. 39.

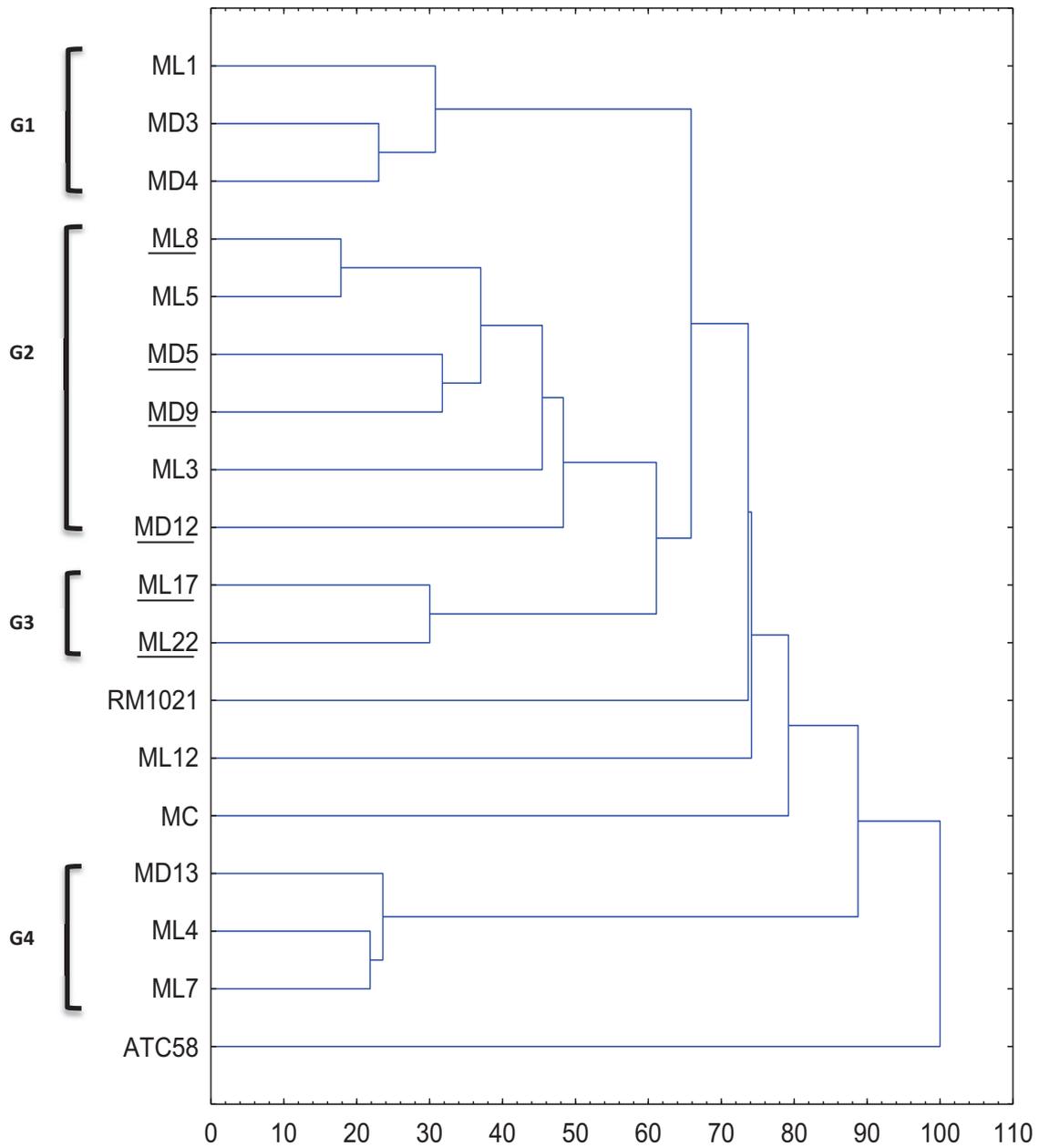


Fig. 39 : UPGMA : Caractères phénotypiques (API 2 0NE et API 50C H) des isolats de le série MD (*Medicago*) et ML (*Melilotus*) ; Rm1021 : *E. meliloti* 1021 ; MC : *M. ciceri* ; ATC58 : *A. tumefaciens*.

La première remarque à tirer de cette analyse est la grande diversité phénotypique de ces isolats bien que leurs caractères morphologiques (aspect de colonies et cellules) et culturels soient presque identiques.

Le phénoگرامme de la fig. 39 montre que les 15 isolats sont répartis sur quatre groupes.

Le premier groupe inclut trois isolats ; MD03 et MD04 de *Medicago* et ML01 de *Melilotus* avec plus de 70 % de similarité phénotypique. Ces isolats présentent une réaction négative avec les substrats D-lyxose, D-fucose, l'inuline, l'amidon et le gluconate potassium.

Le deuxième groupe est composé de six isolats ML03, ML05, ML08, MD05 ; MD09 et MD12 avec plus de 50 % d'identité. A l'opposé du premier groupe, ces derniers sont capables d'utiliser le D-lyxose, le D-fucose, l'amidon et le gluconate de potassium. Les isolats de ce groupe n'utilisent pas l'inuline.

Le troisième groupe est composé de la ML17 et de la ML22. Ces isolats assimilent le D-lyxose, le D-fucose et le gluconate de potassium (comme le deuxième groupe). Ils sont incapables d'utiliser l'inuline et l'amidon ce qui est semblable au premier groupe.

Le quatrième groupe est composé de trois isolats ML04, ML07 et MD13. Ce groupe comprend les isolats présentant un résultat négatif pour le dulcitol, l'amygdaline et le gluconate de potassium. Ces isolats ont par contre assimilé l'inuline.

L'isolat ML12 est classé seul comme le cas des souches de référence (*Ensifer meliloti* 1021, *Mesorhizobium ciceri* M4 et *Agrobacterium tumefaciens* C58).

L'isolat ML12 n'a pas assimilé l'inuline qui est le cas des souches des groupes 1 et 3.

De même, cette souche n'a pas utilisé les trois substrats MD-Mannopyranoside, le MD-Glucopyranoside et le potassium 5-cétogluconate comme les autres 14 isolats testés.

En outre, la ML12 est la seule souche (parmi les 15 testés) qui a montré un résultat négatif avec le L-sorbose et le L-xylose.

En d'autre part, la ML12 a été capable d'assimiler tous les substrats restant (soit un total de 42 substrats).

Les isolats soulignés sur le graphe (ML08, ML17, ML22, MD05, MD09 et MD12) sont sélectionnés pour faire l'objet de la caractérisation génotypique.

10. Caractérisation phylogénétique des isolats : Séquençage et analyse phylogénétique du gène de l'ARNr 16S

L'analyse des séquences de l'ADN ribosomal 16S est une technique largement utilisée pour définir la position taxonomique et tracer l'historique de l'évolution des rhizobia (Shamseldin et al. 2013; Gnat et al. 2014).

Dans le but de déterminer la position taxonomique des isolats symbiotes de *Medicago littoralis* et *Melilotus indicus* par rapport aux autres rhizobia, les gènes de l'ARN ribosomal 16S (environ 1400 pb de taille) ont été amplifiés en utilisant des amorces spécifiques fD1 et rD1, et les amplicons obtenus sont séquencés.

En se basant sur les caractères phénotypiques et symbiotiques, six isolats (MD05, MD09 et MD12 de *Medicago littoralis* et ML08, ML17 et ML22 de *Melilotus indicus*) ont été sélectionnés pour la caractérisation génotypique.

Les séquences obtenues ont été déposées sur GenBank (voir annexe 4), et elles sont disponibles sous les codes d'accès montrés dans le tableau 27.

Tableau 27: Codes d'accès des séquences de l'ADNr 16S sur GenBank

Souches	Plante hôte d'origine	Taille de séquence (pb)	Code d'accès GenBank
ML08	<i>Melilotus indicus</i>	1042	KR476464
ML17	<i>Melilotus indicus</i>	1386	KR476465
ML22	<i>Melilotus indicus</i>	1398	KR476466
MD05	<i>Medicago littoralis</i>	1391	KR476467
MD09	<i>Medicago littoralis</i>	1391	KR476468
MD12	<i>Medicago littoralis</i>	1404	KR476469

Dans le but de rechercher l'homologie de nos souches, nous avons procédé à une analyse de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) des séquences des gènes de l'ARNr 16S des six isolats.

La recherche par le BLAST est une méthode utilisée en bio-informatique, elle permet de réaliser une comparaison entre les séquences des nucléotides des gènes de l'ARNr 16S.

Ce programme permet de retrouver rapidement dans les bases de données (NCBI), les séquences ayant des similitudes avec les séquences de nos souches.

La recherche préliminaire BLAST en utilisant la base de NCBI a montré une grande similarité entre les gènes d'ARNr 16S de nos souches et ceux des souches d'*Ensifer meliloti* avec 99 % d'identité (tableau 28).

Tableau 28: Analyse des résultats du séquençage partiel des gènes d'ARNr 16S des six isolats

Souches	BLAST (dans n.r. database)	Identité (%)	Codes d'accès (Genbank)	BLAST (dans 16SrRNA database)	Identité (%)	Codes d'accès (Genbank)
ML08	<i>Ensifer</i> sp. LILM4H41	99	DQ394805.2			
ML17	<i>Ensifer</i> sp. LILM4H41	99	DQ394805.2			
ML22	<i>Ensifer</i> sp. LILM4H41	99	DQ394805.2			
MD05	<i>Ensifer</i> sp. XJ22DR2	99	AB773226.1	<i>Ensifer meliloti</i> 1021	99	NR_074279.1
MD09	<i>Ensifer meliloti</i> W44	99	JF730142.1			
MD12	<i>Ensifer</i> sp. LILM4H41	99	DQ394805.2			

Les résultats du tableau 28 indiquent que les quatre souches (ML08, ML17, ML22 et MD12) sont identiques à 99 % à la souche *Ensifer* sp. LILMH41 (Mnasri et al. 2007). Il est à noter que cette dernière a été isolée des nodules de *Phaseolus vulgaris* cultivées dans les oasis de Rjim Maatoug en Tunisie.

Cette souche est donc isolée d'un environnement semblable à l'origine de nos isolats, elle présente aussi comme ces derniers une forte tolérance à la salinité (4 % de NaCl).

La souche MD05 est similaire d'*Ensifer* sp. XJ22DR2 (Ding 2013) à 99 %, cette souche est originaire des sols arides des déserts de Chine.

La souche MD09 présente une homologie de 99 % à la souche *Ensifer meliloti* W44 (Chen et Wei 2013) symbiotique du légumineuse *Astragalus* des régions aride de la Chine.

L'analyse comparative des séquences de l'ADNr 16S des six souches est représentée sous la forme d'arbre phylogénétique incluant les espèces types connus du genre *Ensifer* (fig. 40).

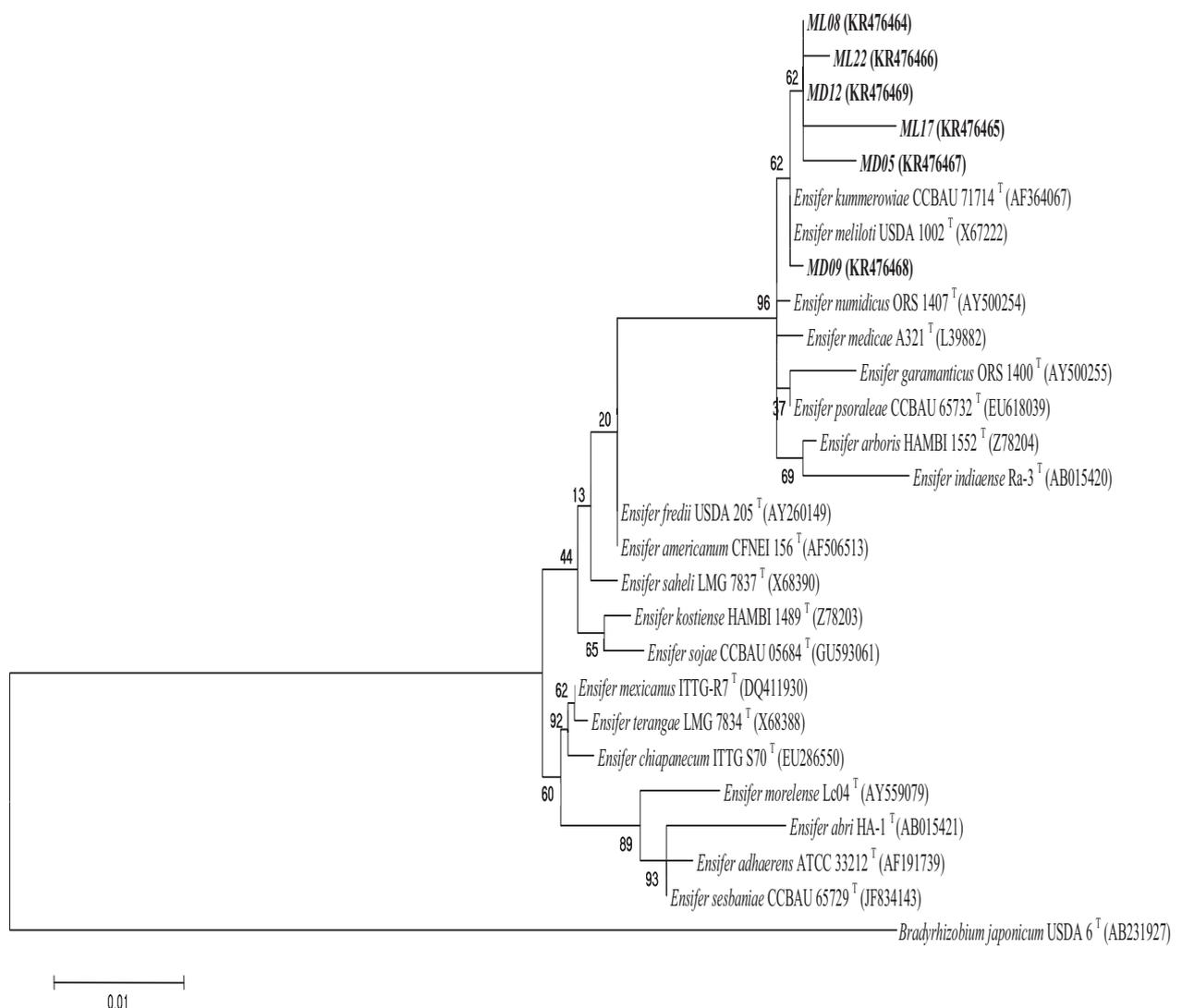


Fig. 40: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène ARNr 16S par la méthode de *Maximum likelihood* montrant la relation entre nos isolats (ML08, ML17, ML22, MD05, MD09 et MD12) et les souches types des autres rhizobia. Les codes d'accèsion en GenBank sont indiqués entre parenthèse

La fig.40 est un arbre phylogénétique qui montre les relations de parenté entre les espèces types des rhizobia du genre *Ensifer* dont ces dernières représentent les symbiotes majeurs des légumineuses *Medicago* et *Melilotus*. L'out groupe est représenté par l'espèce *Bradyrhizobium japonicum*.

Chacun des nœuds de l'arbre représente le niveau ou le pourcentage d'homologie entre ces espèces.

Les résultats du génotype montrent que les 6 isolats montrent une même affiliation phylogénétique, ils sont tous classés dans le même groupe.

En comparant les résultats du phénotype avec ceux du génotype nous pouvons remarquer que les isolats ML17 et ML22 qui ont présenté une grande similarité selon leurs caractères phénotypiques, ils apparaissent génétiquement un peu différents.

Les isolats MD05, MD09, MD12 et ML08 ont été classés dans le même groupe sur le phénogramme, alors que le phylogramme montre une grande diversité génétique au sein de ces souches.

La souche MD09 semble être la plus proche des espèces types de *Ensifer meliloti* et *Ensifer kummerowiae* parmi toutes nos souches.

La figure 40 montre que les espèces voisines de nos souches sont *Ensifer meliloti* USDA 1002, *Ensifer kummerowiae*, *Ensifer numidicus* et *Ensifer medicae*.

Les six souches ML08, ML17, ML22, MD05, MD09 et MD12 se situent dans le même groupe avec un taux de similarité de 96 %.

Cette analyse classe les 6 isolats sur le phylogramme dans une branche séparée avec les espèces types d'*Ensifer meliloti* et *Ensifer kummerowiae* avec 62 % de similarité. Ils sont aussi classés près des espèces d'*Ensifer numidicus* et *Ensifer medicae* avec 96 % d'identité.

Les résultats de cette analyse et ceux du BLAST montrent que nos isolats appartiennent à l'espèce d'*Ensifer meliloti* (taux de similarité de 62 % sur le phylogramme et 99 % selon le BLAST).

Elles pourraient néanmoins représenter de nouvelles espèces ou biovars, pour cela, il est important de séquencer les ITS ou le génome complet.

D'après l'analyse phylogénétique des séquences de l'ADN ribosomal 16S, nous pouvons remarquer que nos souches sont classées près des souches d'*Ensifer* isolées à partir des régions arides. *Ensifer numidicus* ORS 1407 et *Ensifer garamanticus* ORS 1400 ont été isolées du sol des régions arides du sud tunisien (Zakhia et al. 2007 ; Merabet et al. 2010).

De point de vue phénotypique, nos souches sont de grande similarité avec les espèces d'*Ensifer numidicus* et *Ensifer garamanticus*. Nos six isolats tolèrent au moins 2 % de NaCl et des températures jusqu'à 45°C qui est le même cas pour ces deux espèces.

Il est à noter que nos isolats ont présenté un spectre d'assimilation plus important que celui d'*Ensifer numidicus* et *Ensifer medicae*, ils sont capables d'utiliser environ 36 substrats sur 49.

Ensifer medicae a paru très proche de l'espèce d'*Ensifer numidicus* et de nos souches. Selon Merabet et al. (2010), les espèces voisines d'*Ensifer numidicus* sont *Ensifer medicae* et *Ensifer meliloti*. Ils rapportent que l'*Ensifer numidicus* se distingue d'*Ensifer medicae* par l'aptitude d'assimilation de différents substrats carbonés dont cette dernière utilise seulement 13 substrats, alors que Rome et al. (1996) a rapporté qu'*Ensifer medicae* assimile 25 substrats sur 49.

Pour *Ensifer kummerowiae*, l'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S indique que cette espèce est la plus proche de nos souches, mais d'un point de vue phénotypique les six souches se distinguent fortement de cette dernière.

Ensifer kummerowiae est isolée des nodules de *Kummerowia stipulacea* du nord de la Chine, ne tolère pas plus de 2 % de NaCl et une température de 40°C, elle ne pousse pas à pH inférieur à 5 et assimile une gamme limitée de substrats (Wei et al. 2008).

D'après ces caractères nous pouvons déduire que nos souches sont plus proches d'*Ensifer meliloti* que l'*Ensifer kummerowiae*.

Ces résultats concordent avec de nombreuses études qui rapportent que la majorité des légumineuses sauvages, en particulier des genres *Medicago* et *Melilotus*, sont nodulées par les bactéries qui appartiennent aux genres *Ensifer* et *Rhizobium* (Rome et al. 1996; Yan et al. 2000; Zahran 2001; Zribi et al. 2004; Badri et al. 2007; Thami-Alami et al. 2010 ; Rejjii et al. 2014).

D'après nos résultats nous pouvons déduire aussi que les rhizobia du groupe *Ensifer meliloti* constituent les symbiotes majeurs des légumineuses des genres *Medicago* et *Melilotus* des oasis du Sahara septentrional-est de l'Algérie.

Nos résultats sont en accord avec plusieurs travaux réalisés (Rome et al. 1996; Yan et al. 2000; Zahran 2001; Roumyntseva et al. 2002; Zribi et al. 2004; Badri et al. 2007; Thami-Alami et al. 2010) qui rapportent que les espèces des genres *Medicago* et *Melilotus* et notamment ceux du bassin méditerranéen, sont capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec les rhizobia de l'espèce *Ensifer meliloti*. Ces travaux rapportent aussi que ces légumineuses montrent une grande variation dans le pouvoir de nodulation et de fixation symbiotique d'azote par rapport à leur site ou localisation.

D'autre part, nos souches isolées du sol aride des oasis du Sahara algérien sont toutes classées dans le groupe d'*Ensifer meliloti*, ces résultats concordent de nombreuses études réalisées comme celles de Zahran (2001) ; Zakhia et al. (2004) ; Zribi et al. (2004) Merabet et al. (2006) ; Badri et al. (2007) ; Mnasri et al. (2007) ; Amrani et al. (2010) et Boukhatem et al. (2012). Ces études rapportent que les rhizobia de l'espèce *Ensifer meliloti* constituent les symbiotes majeurs des légumineuses des régions arides et semi arides.

CONCLUSION
GÉNÉRALE ET
PERSPECTIVES

Conclusion générale

La réduction biologique de l'azote atmosphérique en ammonium fournit environ 65 % de l'azote disponible dans la biosphère dont la majeure partie est apporté par la symbiose légumineuses-rhizobia. Dans le bassin méditerranéen, la culture des légumineuses occupe une place primordiale au niveau des agrosystèmes vu leurs intérêts agronomiques, économiques et nutritionnels qu'elles apportent via leur symbiose avec les rhizobia.

En Algérie, la salinité des sols et des eaux d'irrigation dans les écosystèmes arides et semi-arides (80 % de la superficie total du pays est classé comme aride et hyperaride) pose un grand problème au développement de l'agriculture dans ces régions.

Pour les cultures des légumineuses, une salinité élevée agit sur la survie et la prolifération des rhizobia au niveau de la rhizosphère, inhibe le processus d'infection et affecte directement le fonctionnement des nodules racinaires. Elle affecte ainsi la croissance des plantes, la photosynthèse et les besoins en azote, et par suite la productivité et le rendement.

L'objectif de notre travail est l'étude de la biodiversité des rhizobia symbiotiques des légumineuses indigènes (*Medicago littoralis* Rhode et *Melilotus indicus* (L.) All.) des palmeraies de Touggourt dans la vallée de l'Oued Righ au Sahara septentrionale-est de l'Algérie.

La région de Touggourt (vallée d'Oued Righ) appartient au climat hyper aride dont le sol est caractérisé par une forte salinité causée par l'eau d'irrigation chargé en sels.

Cette recherche a permis la caractérisation phénotypique de 40 isolats et de déterminer la position taxonomique de six souches en séquençant les gènes de l'ARNr 16S. Ceci conforte la pertinence du choix de cette thématique, car peu de travaux scientifiques sont menées pour étudier la diversité des bactéries symbiotiques des légumineuses sahariennes et moins encore celles des légumineuses sauvages des palmeraies de Touggourt.

La collection de rhizobia comprend 40 souches, toutes isolées des nodules de *Medicago littoralis* et *Melilotus indicus* récoltées des palmeraies de Touggourt. Ces isolats ont subi des tests d'infectivité et d'authentification par l'inoculation de leurs plantes hôtes et les résultats positifs obtenus confirment nos hypothèses à savoir que ce sont des symbiotes capables de noduler leur plantes-hôtes (*Melilotus* et *Medicago*).

Aussi, nous avons évalué la tolérance des 40 souches de la collection aux principaux facteurs de stress, tels que la salinité (le NaCl qui représente le sel le plus répandu dans le sol), le déficit hydrique, le pH et les températures élevées.

Les valeurs obtenus pour l'osmotolérance sont très intéressantes, elles peuvent aller jusqu'à 6 % de NaCl et à 25 % de PEG.

Les souches sont capables de croître sur une gamme assez large de pH allant de 4,5 à 9. Quant à la température, la tolérance s'étend jusqu'à 45°C.

Le pouvoir de survie des rhizobia sous les conditions défavorables du sol de la région d'étude affecte leur activité symbiotique et peut entraîner une nodulation insatisfaisante des légumineuses.

Concernant la résistance intrinsèque aux antibiotiques, la majorité des souches a montré une sensibilité totale à la tétracycline, la kanamycine et la rifampicine, alors qu'une forte résistance a été enregistrée vis-à-vis de la néomycine, l'érythromycine et l'acide nalidixique.

L'utilisation des différents substrats carbonés par les souches a montré un profil d'assimilation très important.

La méthode moléculaire adoptée pour évaluer la position taxonomique des souches est le séquençage du gène de l'ARNr 16S.

Six souches ont été sélectionnées selon leurs caractères phénotypiques et symbiotiques, leurs ADN génomiques ont été purifiés, une amplification et un séquençage du gène de l'ARNr 16S a été effectué.

La dimension et le degré de conservation de ce gène font de lui un marqueur phylogénétique idéal. Les résultats obtenus ont montré que nos souches sont génétiquement homogènes, elles sont classés dans le même cluster de ceux des souches types d'*Ensifer meliloti* avec 98 % de similitude mais le taux d'identité entre-elles est de 60 %. Les souches MD05 et MD09 se sont révélées toutefois plus rapprochées aux souches types d'*Ensifer meliloti*, *Ensifer numidicus* et *Ensifer medicae*.

Dans notre étude, vu que les souches ont été isolées à partir de deux espèces de légumineuses différentes (*Medicago littoralis* et *Melilotus indicus*), nous pouvons conclure que les rhizobia à croissance rapide "*Ensifer*" sont présentes dans les sols oasiens de la région de

Touggourt et leurs caractères présentés sont d'une grande importance pratique pour la production des inoculums.

Les résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives sur le plan appliqué et pourraient également servir de base pour des travaux ultérieurs, dont on peut noter :

- Une étude plus approfondie de la tolérance des souches aux différents stress environnementaux et de leur potentiel fixateur d'azote.
- L'utilisation de ces souches dans des essais d'inoculation sous serre puis au champ.
- Etude de la résistance des souches aux métaux lourds.
- L'étude de l'aptitude des souches à noduler d'autres légumineuses, surtout les espèces alimentaires sahariennes.
- La précision de la position taxonomique des symbiotes de *Medicago littoralis* et *Melilotus indicus* par le séquençage complet du gène de l'ARNr 16S et par d'autres techniques moléculaires tel que le séquençage des gènes de nodulation et l'hybridation ADN/ADN qui pourra préciser si ces souches constituent une nouvelle espèce parmi les rhizobia.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdel-Ghafar A S (1989) Aspect of Microbial Activities and Dinitrogen Fixation in Egyptian Desert Soils. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 3: 281-294.
- Abdelguerfi A, Abdelguerfi-Laouar M (2004) Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral : Diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen. *CIHEAM-Options Méditerranéennes* 62:29-41.
- Abdelguerfi A, Laouar M (1999) Autoécologie de légumineuses spontanées d'intérêt fourrager et /ou pastoral en Algérie. *CIHEAM-Options Méditerranéennes* 39: 97-101.
- Abdelguerfi A, Si Ziani Y, Kies N. and Ait Ouada M (1996) From autoecology to variability of medics in Algeria: synthesis is trial of works realized at the National Agronomic Institute - El Harrach. *CIHEAM-Options Méditerranéennes* 18: 39-52.
- Abdel-Salam M S, Ibrahim S A, Abd-El-Halim M M, Badawy F M, Abo-Aba SEM (2010) phenotypic characterization of indigenous Egyptian Rhizobial strains for abiotic stresses performance. *J Am Sci* 6(9): 498-501.
- Abdel-Salam M A, El-Hadidy T (1971) Microbial seasonal changes under the dry farming system of the Mediterranean coastal zone. *Desert Institute Bulletin ARE* 21: 83-92.
- Abdel-Salam M A, Abdel-Malek Y, El-Hadidy T, Monib M (1967) Survey of specific groups of bacteria I the soils of the coastal area. *Desert Institute Bulletin ARE* 17: 63-79.
- Achour A, Acourene S, Allam A, Hafouda L (2011) Programme d'activités de la station. Institut National De La Recherche Agronomique D'algerie, Station De Touggourt : 5-8.
- Adesemoye A O, Egamberdieva D (2013) Beneficial Effects of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Improved Crop Production: Prospects for Developing Economies. In: *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity*. Eds Maheshwari D K et al. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p: 45-50.
- Ahnia H, BoulilaF, Boulila A, Boucheffa K, Durán D, Bourebaba Y, Salmi A, Imperial J, Ruiz-Argüeso T, Rey L (2014) *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 105:1121–1129.
- Al Sherif E A (2009) *Melilotus indicus* (L.) All. a salt-tolerant wild leguminous herb with high potential for use as a forage crop in salt-affected soils. *Flora* 204: 737-738.

- Al Sherif E A, Zahran HH, Atteya A M (2004) Nitrogen fixation and chemical composition of wild annual legumes at Beni-Suef governorate, Egypt. *Egyptian Journal of Biology* 6:32-38.
- Amrani S, Nazhat-Ezzaman N, Tej Bhatnagar T, Argandonña M, Nieto J J, Vargas C (2010) Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. In nurseries from Algeria. *Syst Appl Microbiol* 33: 44–51.
- Anonyme (2008) Légumineuses : Techniques Culturelles Simplifiées. N°48:12-22.
- Arbeille S, D'Ersu V G, et Koenig O (2000) Toutes les fleurs de Méditerranée. Edition Delachaux et Niestle S A, Lausanne, Paris.
- Asadi Rahmani H, Saleh-rastim N, Khavazi K, Asghazadeh A, Fewer D, Kiani S, Lindström K (2009) Selection of thermotolerant bradyrhizobial strains for nodulation of soybean (*Glycine max* L.) in semiarid regions of Iran. *World J. Microbiol Biotechnol*, 25: 591-600.
- Badri Y, Zribi K, Badri M, Huguet T, van Berkum P, Aouani M E (2007) Comparison of rhizobia that nodulate *Medicago laciniata* and *Medicago truncatula* present in a single Tunisian arid soil. *Can J Microbiol* 53: 277-283.
- Baillon H (1870) Histoire des plantes: 2: Connaracées et Légumineuses-mimosées, Légumineuses-Caesalpiniiées, Légumineuses-Papilionacées, Protéacées Lauracées, Eleagnacées et Myristicacées. Edité par Hachette. Paris, p : 24-56.
- Bala A, Murphy P J, Giller K. E. (2004) Classification of Tropical Tree Rhizobia Based on phenotypic characters forms Nested Clusters of phylogenetic Groups. *West African J Appl Ecol*, 6: 9-19.
- Battesti V (1998) Les relations équivoques, approches circonspectes pour une socio-écologie des oasis sahariennes. Thèse de doctorat. Université de Paris, soutenue le 28/09/1998, p : 21, 53, 54, 64, 75, 76.
- Berrada H, Fikri-Benbrahim K (2014) Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. *Br Microbiol Res J* 4(6): 616-639.
- Bessedik F, Saka H, Moussaoui B, Yakhou S (2000) Fusariose du palmier dattier : Dénombrement et évaluation des microorganismes des sols de différentes palmeraies du Touat indemnes de bayoud. *Recherche Agronomique*, 6, INRA: 69-75.
- Bladergroen M R, Spaink H S (1998) *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 353–359.

- Blamey M, Grey-Wilson C (2000) Toutes les fleurs de méditerranée. Edition Delachaux et Niestlé S A, Lausanne (Switzerland), Paris.
- Bogusz D, Franche C (1985) La Fixation Biologique de L'azote. L'Orstom et Les Recherches Fondamentales Microbiologie. Dakar L'OSTRON, N°23059.
- Boulila F, Depret G, Boulila A, Belhadi D, Benallaoua S, Laguerre G (2009) *Retama* species growing in different ecological–climatic areas of northeastern Algeria have an arrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. Syst Appl Microbiol 32 : 245–255.
- Boukhatem Z F, Domergue O, Bekki A, Chahinez Merabet C, Sekkour S, Bouazza F, Duponnois R, de Lajudie P, Galiana A (2012) Symbiotic Characterization And Diversity Of Rhizobia Associated With Native And Introduced *Acacias* In Arid And Semi-Arid Regions In Algeria. FEMS Microbiol Ecol: 1–14.
- Bouzar H, Jones J B, Bishop A L (1995) Simple Cultural Tests for Identification of *Agrobacterium* Biovars: Methods in Molecular Biology. In Gartland K M A, Davey Humana Totowa M R (eds) *Agrobacterium* Protocols. Vol 44. NJ, Inc Press, pp 9-13.
- Bromfield E S P, Tambong J T, Cloutier S, Prévost D, Laguerre G, van Berkum P, Tran-Thi T V, Assabgui R, Barran L R (2010) *Ensifer*, *Phyllobacterium* and *Rhizobium* species occupy nodules of *Medicago sativa* (alfalfa) and *Melilotus alba* (sweet clover) grown at a Canadian site without a history of cultivation. Microbiol 156: 505–520.
- Bruning B, Rozema J (2012) Symbiotic nitrogen fixation in legumes: Perspectives for saline agriculture. Environ Exp Bot, 2587: 1-10.
- Buer C S, Imin N, Djordjevic M A (2010) Flavonoids: New roles for old molecules. J Integr Plant Biol 52 : 98-111.
- Bryssine T, Toutain G (1970) Etude des sols des palmeraies : Evolution d'un sol de palmeraie par la culture et la fumure. Al Awamia 35: 93-82.
- Cacciari I, Di Mattia E, Quatrini P, Moscatelli M C, Grego S, Lippi D, De Paolis M R (2003) Réponses Adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux Stress. In Grouzis M, Le Floc'h E (eds) Un arbre au désert, *Acacia raddiana*, IRD, Paris, p : 183-200.
- Chaabena A, Abdelguerfi A (2007) Aperçu sur les cultures fourragères au Sahara septentrional est. Annales de la Faculté des Sciences et des Sciences de l'Ingénieur 1 (2): 18.

- Chaabena A, Abdelguerfi A (2001) Situation de la luzerne pérenne dans le Sahara et comportement de quelques populations locales et variétés introduites dans le sud-est du Sahara algérien. *CIHEAM-Options Méditerranéennes* 45:57-60.
- Chafi M H, Bensoltane A (2009) *Vicia faba* (L) A Source of Organic and Biological Manure for the Algerian Arid Regions. *World Journal of Agricultural Sciences* 5 (6): 698-706.
- Chaouche Bencherif M (2008) Touggourt ou la dynamique d'une ville aux sept ksour. *Science & Technologie* 28: 9-18.
- Chen W, Sun L, Lu J, Bi L, Wang E, Wei G (2013) Diverse nodule bacteria were associated with *Astragalus* species in arid region of northwestern China. *J Basic Microbiol* 55 : 121–128.
- Chenchouni H (2012) Diversité floristique d'un lac du Bas-Sahara algérien. *Acta Botanica Malacitana* 37 : 33-44.
- Chouaki S (2006) Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques. Institut national de la recherche agronomique d'Algérie (INRA) ; Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).
- Cohen M F, Sakihama Y, Yamasaki H (2001) Roles of Plant Flavonoïdes in Interactions with Microbes: from protection against pathogenes to the mediation of mutualism. *Recent Res. Devel. Plant Physiol*, 2: 157-173.
- Cointepas J P, El Fekih M, Pouget J M (1966) Légende des Cartes D'oasis Du Sud –Tunisien. République tunisienne : Secrétariat d'état au plan et à l'économie nationale : sous-secrétariat d'état à l'agriculture.
- Cooper J E (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology* 103:1355–1365.
- De Lajudie P, Dupuy N, Ndiaye A, Neyra M, Boivin C, Gillis M, Dreyfus B (1998) Acacia : nodulation et rhizobiums associés. 02: 360-375.
- Delarras C (1998) Microbiologie. In : 90 heures de travaux pratiques. Editer par Gaëtan Morin, p: 56, 57: 124 126.
- Ding L (2013) Phylogenetic analysis of the VBNC state bacteria isolated from the desert soils based on 16S rRNA gene sequences. GenBank, Nucleotide Database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB773226.1>

- Djedidi S, Yokoyama T, Ohkama-Ohtsu N, Chandra-Prasad-Risal C, Abdelly C, Hitoshi-Sekimoto H (2011) Stress Tolerance and Symbiotic and Phylogenetic Features of Root Nodule Bacteria Associated with *Medicago* Species in Different Bioclimatic Regions of Tunisia. *Microbes Environ* 26 (1): 36–45.
- Djennane A (1990) Les systèmes agricoles oasiens: Constat de situation des zones Sud des oasis algériennes. *Options Méditerranéennes. Séries A Mediterr Semin* 11: 29-32.
- Djili K, Daoud Y, Gaouar A, Beldjoudi Z (2003) La salinisation secondaire des sols au Sahara. Conséquences sur la durabilité de l'agriculture dans les nouveaux périmètres de mise en valeur. *Sci chang plan Sech* 14 (4): 241-6.
- Drevon J J, Abdelly C, Amarger N, Aouani E A, Aurag J, Jebara M, Gherbi H, Liuch C, Payre H, Schump O, Sifi B, Trabelsi M (2004) FABAMED Interdisciplinary Strategy to Improve Symbiotic Nitrogen Fixation of Legumes in the Mediterranean Basin. In Serraj R (Ed) *Symbiotic Nitrogen Fixation Prospects for Enhanced Application in Tropical Agriculture*, Oxford and IBH Publishing, New Delhi, pp 223-232.
- Dreyfus B, Garcia J L, 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.
- Dubost D (2002) *Ecologie, Aménagement et Développement Agricole des Oasis Algériennes*. Edition du Centre de Recherche Scientifique et Technologique sur les Régions Arides.
- Elbanna K, Elbadry M, Gamal-Eldin H (2009) Genotypic and phenotypic characterization of rhizobia that nodulate snap bean (*Phaseolus vulgaris L.*) in Egyptian soils. *Syst Appl Microbiol* 32(7): 522-530.
- Elboutahiri N, Thami-Alami I, Udupa S M (2010) Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiol* 10(15): 1-13.
- El-Fiki A A (2005) Genetic Diversity in Rhizobia Determined by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *J Agri Social Scien* 9 : 121-129.
- El Fekih M, Pouget M (1969) Les sols des oasis anciennes du sud tunisien. O.R.S.T.O.M. Collection de Référence n° 13392.

- El-Hadidy T (1960) Bacteriological and chemical changes due to addition of certain organic materials to Mediterranean calcareous soils. *Desert institute Bulletin* 26: 77-92.
- Escadafal R (2007) La surface des sols des régions arides : lien entre l'écologie de terrain et la télédétection: 56-61.
- Farissi M, Aziz F, Bouizgaren A, Ghoulam C (2014) La symbiose Légumineuses-rhizobia sous conditions de salinité : Aspect Agro-physiologique et biochimique de la tolérance. *Int J Innovation Scientific Res* 11(1): 96-104.
- Fawaz K M, El-Ghonemy A, Abdel-Ghaffar A S, Gomah A M (1976) Studies on the spacial and temporal variation in soil microflora in two ecological systems at Mariotis (Egypt). *Alexandria j Agric Res* 24: 167-174.
- Ferry M, Toutain M (1990) Concurrence et complémentarité des espèces végétales dans les oasis, *Options Méditerranéennes. Les systèmes agricoles oasiens. Séries A Mediterr Semin* 11: 261-270.
- Fitouri Dhane S, Ben Jeddi F, Zribi K, Rezgui S, Mhamdi R (2012) Effet de l'Inoculation par une souche osmotolérante de *Rhizobium sullivanii* sur la croissance et la production en protéine du sulla (*Sulla coronarium* L.) sous déficit hydrique. *J Appl Biosci* : 3642-3651.
- Floret C, Pontanier R (1982) L'aridité en Tunisie présaharienne. Climat, sol, végétation et aménagement. *Travaux et documents de l'ORSTOM n°150*, Paris.
- Foret Romaric (2004) *Dico de Bio*, édition de Doeck: 229, 230, 306, 350.
- Franche C, Lindström K. and Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 321: 35–59.
- Fraysse N, Couderc F, Poinot V (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–legume symbiosis. *Eur J Biochem* 270: 1365–1380.
- Garcia-Fraile P, Rivas R, Willems A, Peix A, Martens M, Eustoquio Martinez-Molina E, Mateos P F, Velázquez E (2007) *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov, isolated from sawdust of *Populus alba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 844–848.
- Gnat S, Wójcik M, Wdowiak-Wróbel S, Kalita M, Ptaszyńska A, Małek W (2014) Phenotypic characterization of *Astragalus glycyphyllos* symbionts and their phylogeny based on the 16S rDNA sequences and RFLP of 16S rRNA gene. *Antonie van Leeuwenhoek* 105: 1033–1048.

- Gough C (2009) *Medicago truncatula*, un modèle pour l'étude des endosymbioses racinaires. BIOFUTUR 298: 30-32.
- Graham P H (1992) Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. Can J Microbiol 38: 475-484.
- Hajjaji A (1990) Arboriculture, cultures maraîchères et de rente en zones oasiennes. Options Méditerranéennes sér. A /n° 11, les systèmes agricoles oasiens: 165-161.
- Hirsch A M (2001) Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) legume nodulation. Biotic interaction 19: 320-326.
- Janati A (1990) Les cultures fourragères dans les oasis. Options Méditerranéennes : Les systèmes agricoles oasiens. Séries A Mediterr Semin 11: 165-167.
- Janssens D, Kersters K, De Ley J (1983) The catabolism of 3-ketolactose in *Agrobacterium*. Syst Appl Microbiol 4(2): 155-168.
- Jebara M, Drevon J J, Aouani M E (2001) Effects of hydroponic culture system and NaCl on interactions between common bean lines and native rhizobia from Tunisian soils. Agron 21: 601-605.
- Jeder H, de Lajudie P, Dreyfus B, Le Floc'h E, Behaeghe T, Zaafouri M. S, Akarimi N (1996) Etude de la nodulation pastorales autochtones des régions arides de Tunisie. Nodulation des légumineuses pastorales 9: 3-10.
- John M, Schmidt J, Wienekel U, Kondorosil E, Kondorosil A, Schell J (1985) Expression of the nodulation gene *nodC* of *Rhizobium meliloti* in *Escherichia coli*: role of the nod C gene product in nodulation. EMBO Journal 10: 2425-2430.
- Jordan D C (1984) *Rhizobiaceae*. In: Krieg N R, Holt J G (Eds) *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. The Williams and Wilkins Baltimore, p: 234-242.
- Jordan D C (1962) The Bacteroids of The Genus *Rhizobium*. Nuffield Fellowship 26: 119-141.
- Kersters K, Hinz K H, Hertle A, Segers A, Lievens A, Siegmann O, De Ley J (1984) *Bordetella avium* sp. nov., Isolated from the respiratory tracts of Turkeys and other birds. Inter J Syst Bacteriol 34: 56-70.

- Khaznadar M, Vogiatzakis I N, Griffiths G H (2009) Land degradation and vegetation distribution in Chott El Beida wetland, Algeria. *J Arid Environ* 73: 372-376.
- Koull K, Kherraze M H, Lakhdari K, Benzaoui T, Helimi S, Laouissat M S, Kherfi Y, Bougafla A, Mimouni F, Lakhdari K, Mezrag M, Benazzouz M T (2013) Eaux D'irrigation et salinisation des sols des perimetres irrigués dans la vallee de l'oued Righ. *J Alg Rég Arid* 12: 97-102.
- Le Houérou H N (1975) Problèmes et potentialités des terres arides de l'Afrique du Nord. Options Méditerranéennes. *Séries A Mediterr Semin* 26: 17-32.
- Long S R (1996) *Rhizobium* Symbiosis: Nod Factors in Perspective. *The Plant Cell*, Vol. 8: 1885-1898.
- Maâtallah J, Berraho E B, Muñoz S, Sanjuan J, Lluch C (2002) Phenotypic and molecular Characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *J Appl Microbiol* 93: 531-540.
- Mahdhi M, Nzoue A, De Lajudie P, Mars M (2008) Characterization of root-nodulating bacteria on *Retama raetam* in arid Tunisian soils. *Prog Nat Sci* 18: 43-49.
- Mahmood A, Athar M (2008) Cross inoculation studies: Response of *Vigna mungo* to inoculation with rhizobia from tree legumes growing under arid Environment. *Int J Environ Sci Tech* 5 (1): 135-139.
- Masson P, Gintzburger G (2000) Les légumineuses fourragères dans les systèmes de production méditerranéens: utilisations alternatives. *CIHEAM-Options Méditerranées* 32: 395-406.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes. *Trends in Microbiology* 17 (10): 458-466.
- Masson-Boivin C, Bontemps C, Golfier G, Gris-Liebe C, Talini L (2006) Détection et typage du gène nodC à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. *Les Actes du BRG*, 6: 97-110.
- Maureira-Butler I J, Pfeil B E, Muangprom A, Osborn T C, Doyle J J (2008) The Reticulate History of *Medicago* (*Fabaceae*). *Systematic Biology* 57(3): 466.
- Mavridou A, Barny M A, Poole P, Plaskitt K, Davies A E, Johnston A W B, Downie J A (1995) *Rhizobium leguminosarum* nodulation gene (*nod*) expression is lowered by an allelespecific mutation in the dicarboxylate transport gene *dctB*. *Microbiology* 141: 103-111.

- Merabet C, Martens M, Mahdhi M, Zakhia F, Sy A, Le Roux C, Domergue O, Coopman R, Bekki A, Mars M, Willems A, de Lajudie P (2010) Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 664–674.
- Merabet C, Bekki A, Benrabah N, Baba-Hamed Bey M, Bouchentouf L, Ameziane H, Rezki M. A, Domergue O, Cleyet-Marel J. C, Avarre J. C, Béna G, Bailly X. and de Lajudie P (2006) Distribution of *Medicago* Species and Their Microsymbionts in a Saline Region of Algeria, Arid Land. *Research and Management* 20 (3): 219-231.
- Mergaert P, Vaubert D, Györgyey J, Jahni G, Maunoury N, Chaparro Egaña C, Villarroel R, Kelemen Z, Kelemen K, Vinardell J M, Kondorosi A, Kondorosi E (2001) Utilisations d'arrays d'ADNc pour l'étude du développement des nodosités symbiotiques chez *Medicago truncatula*. *Ecole thématique Biologie végétale*: 1-7.
- Messar E M (1996) Options méditerranéennes : le secteur phœnicicole algérien. CIHEM et Estación Phoenix: 24.
- Michiels J, Verreth C, Vanderleyden J (1994) The effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl Environ Microbiol* 60: 1206-1212.
- Mnasri B, Mrabet M, Laguerre G, Aouani ME, Mhamdi R (2007) Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. mediterraneuse) of *Sinorhizobium meliloti*. *Arch Microbiol* 187 (1): 79-85.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C (2001) Nodulation of legumes by members of the β -subclass of *Proteobacteria*. *Letters to nature* 4: 11.
- Mtimet A, Belemlih A (2009) L'oasis. Union mondiale pour la nature (UICN), Programme pour l'Afrique du Nord : Projet Education et Conservation de la Biodiversité, Suisse.
- Murugesan S, Manoharan C, Vijayakumar R, Panneerselvam A (2010) Isolation and Characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the Root Nodules of Some Leguminous Plants. *Int J Microbiol Res* 1 (3): 92-96.
- Nogales J, Campos R, Ben Abdelkhalek H, Olivares J, Lluch C, Sanjuan J (2001) *Rhizobium tropici* Genes Involved in Free-Living Salt Tolerance are Required for the Establishment of Efficient

- Nitrogen-Fixing Symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact* 15 (3): 225–232.
- Oehrle N W, Karr D B, Kremer R J, Emerich D W (2000) Enhanced attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean through reduced root colonization of internally seedborne microorganisms. *Can J Microbiol* 46: 600–606.
- Ould El Hadj M, Hadj-Mahammed M, Zabeirou H (2003) Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est), *Courrier du Savoir* 03: 47-51.
- Palma F, Tejera N A, Lluch C (2013) Nodule Carbohydrate Metabolism and Polyols Involvement in the Response of *Medicago Sativa* to Salt Stress. *Environ Exp Bot* 85: 43-49.
- Peix A, Ramírez-Bahena M H, Velázquez E, Bedmar E J (2015) Bacterial associations with legumes. *CRC Crit Rev in Plant Sci* 34: 17-42.
- Poss R, Ruellan A, Blanchart E, Brauman A, Grimaldi M, Grünberger O, Barbiero L, Chaplot V, Monga O, Bernoux M (2010) Les sols des milieux vivants très fragiles. *SUDS en ligne : les dossiers thématiques de l'IRD*.
- Priefer U B, Aurag J, Boesten B, Bouhmouch I, Defezy R, Filali-Mltouf A, Miklis M, Moawad H, Mouhsin B, Prell J, Schlüter A, Senatore B (2001) Characterization of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. *J Biotechnol* 91: 223-236.
- Prin Y, Galiana A, Ducouso M, Dupuy N, De Lajudie P, Neyra M (1993) Les rhizobiums d'*Acacia* biodiversité et taxonomie. *Bois et Forêts des Tropiques* 238: 05-16.
- Prosperi J M, Guy P, Genier G, Angevain M (1995) Les luzernes ou le genre *Medicago*, In : Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. Editer par BRG et INRA, France: 131-137.
- Pujik P, Normand P (2009) La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofuture* 298 : 26.
- Quèzel P, Santa S (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editer par Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, France, p: 498, 501.
- Ramande F (2002) Encyclopédie de l'écologie et des sciences de l'environnement. 2^{ème} édition. DUNOD Paris.

- Rao N K, Hanson J, Dulloo M E, Ghosh K, Nowell D, Larinde M (2006) Manuel de manipulation des semences dans les banques de gènes. In : Manuels pour les banques de gènes (8). Bioversity International, Rome, Italie.
- Rejili M, Mahdhi M, Domínguez-Núñez J A, Mars M (2014) the phenotypic, phylogenetic and symbiotic characterization of rhizobia nodulating Lotus sp. in Tunisian arid soils. *Ann Microbiol* 64: 355–362.
- Rejili M, Ferchichi A, Mahdhi M, Mars M (2007) Natural Nodulation of Some Wild Legumes in the South Area of Tunisia. *Agricultural Journal* 2 (3) : 405-411.
- Remini B (2006) La disparition des Ghouts dans la région d'El Oued (Algérie) *Larhyss Journal* 5: 49-62.
- Riah N, Béna G, Djekoun A, Heulin K, de Lajudie P, Laguerre G (2014) Genotypic and symbiotic diversity of *Rhizobium* populations associated with cultivated lentil and pea in sub humid and semi-arid regions of Eastern Algeria. *Syst Appl Microbiol* 37: 368–375.
- Rigaud J, Puppo A (1975) Indole 3-acetic acid catabolism by soybean bactéroïdes. *J Gen Microbiol* 88: 223-228.
- Riou C (1990) Bioclimatologie des oasis. *Options Méditerranéennes : Les systèmes agricoles oasiens, Séries A Mediterr Semin* 11: 207- 208.
- Roche P, Maillet F, Plazanet C, Debellé F, Ferro M, Truchet G, Promé J K, Dénarié J (1996) The common nodABC genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc Natl Acad Sci* 93: 15305–15310.
- Rogers M E, Colmer T D, Frost K, Henry D, Cornwall D, Hulm E, Deretic J, Hughes S R, Craig A D (2008) Diversity in the genus *Melilotus* for tolerance to salinity and waterlogging. *Plant Soil* 304: 89-90.
- Rome S, Fernandez M P, Brunel B, Normand P, Cleyet-Marel J C (1996) *Sinorhizobium medicae* sp. nov, Isolated from Annual *Medicago* spp. *Int J Syst Bacteriol* 46 (4): 972-980.
- Roumyntseva M L, Andronov E E, Sharypova L A, Diammann-Kalinowski T, Keller M, Young J, Simarov B V (2002) Diversity of *Sinorhizobium meliloti* from the Central Asian Alfalfa Gene Center. *Appl Environ Microbiol* 68 (9): 4694-4697.
- Sadowsky M J, Keyser H H, Ben Bohlool B (1983) Biochemical Characterization of fast- and Slow-Growing Rhizobia That Nodulate Soybeans. *Int J Syst Bacteriol*: 716-722.

- Saharan B S, Nehra V (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research 11 : 1-4.
- Schultze M, Quiclet-Siret B, Kondorosi E, Vireliziert H, Glushka J N, Endre G, Géro S D, Kondorosi A (1992) *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. Proc Natl Acad Sci USA 89: 192-196.
- Serraj R, Adu-Gyamfi J, Rupela O P, Drevon J J (2004) Improvement of Legume Productivity and Role of Symbiotic Nitrogen Fixation in Cropping Systems: Overcoming the Physiological and Agronomic Limitations. In: Symbiotic Nitrogen Fixation Prospects for Enhanced Application in Tropical Agriculture. Edit: Serraj R. Oxford & IBH, New Delhi: 67-97.
- Shamseldin A, Moawad H, Abd El-Rahim W M, Sadowsky M J (2013) Near-full length sequencing of 16S rDNA and RFLP indicates that *Rhizobium etli* is the dominant species nodulating Egyptian winter Berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.) Syst Appl Microbiol 34: 234-242.
- Shamseldin A, Sadowsky M. J, El-Saadani M, Chung Sun An (2008) Molecular Biodiversity and Identification of Free Living *Rhizobium* Strains from Diverse Egyptian Soils as Assessed by Direct Isolation Without Trap Hosts. American-Eurasian J Agric Environ Sci 4 (5): 541-549.
- Shetta N D, Al-Shaharani T S, Abdel-Aal M (2011) Identification and Characterization of *Rhizobium* Associated with Woody Legume Trees Grown under Saudi Arabia Condition. Am J Agric Environ Sci 10 (3): 410-418.
- Shiferaw B (2004) Harnessing the Potentials of BNF for Poor Farmers: Technological, Policy and Institutional Constraints and Research Needs. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics: 03.
- Skerman P J (1982) Les légumineuses fourragères tropicales. Edité par Food & Agriculture Org (FAO), p : 40-49.
- Solsans M (2009) Saprophytic Actinomycetes Promote Nodulation in *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis in the Presence of High N, J. Plant Growth Regul 28: 106-114.
- Somasegaran P, Hoben H G (1985) Methods in Legume Rhizobium Technology. United States Agency for International Development (USAID).
- Souza-Moreira M F, Cruz L, Miana de Faria S, Marsh T, Martínez-Romero E, de Oliveira Pedrosa F, Maria Pitard R, Young J (2006) *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. Syst Appl Microbiol 29: 197-206.

- Steinkellner S, Lenzemo V, Langer I, Schweiger P, Khaosaad T, Toussaint J P, Vierheilig H (2007) Flavonoids and Strigolactones in Root Exudates as Signals in Symbiotic and Pathogenic Plant-Fungus Interactions, Review. *Molecules* 12: 1290-1306.
- Subramanian S, Stacey G, Yu O (2007) Distinct, crucial roles of flavonoids during legume Nodulation. *TRENDS in Plant Science* 12 (7): 282-284.
- Tabouche N, Achour S (2004) Etude De La Qualité Des Eaux Souterraines de la Région Orientale du Sahara Septentrional Algérien. *Larhyss J* 03: 99-113.
- Thami-Alami I, Elbouthiri N, Udupa SM (2010) Variability in natural population of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. *Options Méditerranéennes. Séries A. Mediterr. Semin.* 92: 265-269.
- Tian C F, Wang E T, Wu L G, Han T X, Chen W F, Gu C T, Chen W X (2008) *Rhizobium fabae* sp. nov, a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *Int J Syst Evolut Microbiol* 58: 2871–2875.
- Torche A, Benhizia H, Rosselli R, Romoli O, Zanardo M, Baldan E, Alberghini S, Tondello A, Baldan B, Benguedouar A, Squartini A, Benhizia Y (2014) Characterization of bacteria associated with nodules of two endemic legumes of Algeria, *Hedysarum naudinianum* and *H. perrauderianum*. *Ann Microbiol* 64:1065–1071.
- Toutain G (1974) Conservation des sols en palmeraies sahariennes et bordières au Sahara. *Options Méditerranéennes. Séries A Mediterr Semin* 25: 65-69.
- Unni S, Rao K K (2001) Protein and lipopolysaccharide profiles of a salt-sensitive *Rhizobium* sp. and its exopolysaccharide-deficient mutant. *Soil Biol Biochem* 33: 111-115.
- Wang L L, Wang E T, Liu J, Li Y, Chen W X (2006) Endophytic Occupation of Root Nodules and Roots of *Melilotus dentatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiol Ecol* 52: 436–443.
- Wei G H, Wang E T, Tan Z Y, Zhu M E, Chen W X (2008) *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 2231-2239.
- Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, Lane D J (1991) 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697–703.
- Willems A (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287: 3–14.

- Yan A M, Wang E T, Kan F L, Tan Z Y, Sui X H, Reinhold-Hurek B, Chen W X (2000) *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. In arid saline soils in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1887-1891.
- Young L M, Kuykendall L D, Martínez-Romero E, Kerr A, 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.
- Zahran H H (1997) Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Boil Fertil Soil* 25: 211-223.
- Zahran H H (1999) *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiol Mol Biol Rev* 63 (4): 968–989.
- Zahran H H (2001) Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J biotechnol* 91: 143-153.
- Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel J C, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P (2004) Characterisation of Wild Legume Nodulating Bacteria (LNB) in the Infra-arid Zone of Tunisia. *Syst Appl Microbiol* 27 : 380–395.
- Zhang X, Harper R, Karsist M, Lindstrom K (1991) Diversity of *Rhizobium* Bacteria Isolated from the Root Nodules of Leguminous Trees. *Int J Syst Bacteriol* 41: 104-113.
- Zribi K, Jeidi N, Mhamdi R, Aouani M E, Huguet T (2004) Diversité génétique et polymorphisme symbiotique de *Sinorhizobium meliloti* nodulant *Medicago truncatula* en sols tunisiens des régions arides. *Options Méditerranéennes. Séries A Mediterr Semin* 62: 149-152.

ANNEXES

Annexe 1

Tableau 1 : Données climatiques de la région d'étude (Touggourt) pour la période de 1996 à 2010

Mois	Janv	Fev	Mar	Avr	Mai	Juin	Juill	Août	Sept	Oct	Nov	Dec
T Minimale (°C)	5.1	6.4	10.1	13.3	18	23.2	25.4	25.3	21.3	18.3	16.8	5.6
T Maximale (°C)	16.9	19.6	22.3	27.1	31.8	36.8	38.4	40.3	30.1	27.9	23.2	18.8
T Moyenne (°C)	11	13	16.2	20.2	24.9	30	31.9	32.8	25.7	23.1	20	12.2
Précipitations en (mm)	10.8	5.3	11.4	5.4	4.7	1.8	00	00	3.5	5.3	8.4	5.3
Humidité relative en (%)	56.8	53.8	49	44.3	40.2	35.3	32.4	35	43.5	52.1	61.6	65.1
Vitesse du vent en (m/s)	2.7	3	3.4	4	4.1	3.9	3.2	3.1	2.8	2.7	2.5	2.1
E.T.P en mm	62.9	84.9	133.8	180.5	236.4	272.5	286.8	265.5	187.2	131.1	77.1	53.1

Source: INRA station de Touggourt

Tableau 2 : Composition physico-chimique des eaux des deux aquifères (CI et CT)

	PH	CE (mmho/cm)	R.S (mg/l)	NO3 (mg/l)	CO3 (mg/l)	SO4 (mg/l)	CL (mg/l)	K (mg/l)	Na (mg/l)	Mg (mg/l)	Ca (mg/l)
C.I	7.9	3.0	2230	3	70	700	510	37	275	136	168
C.T	7.9	6.5	5167	35	85	1365	1375	37	690	253	385

Source: INRA station de Touggourt. La nappe du continental intercalaire (C.I), La nappe du Complexe Terminal (C.T).

Annexe 2

Tableau 1 : Matrice de corrélation entre les variables de l'ACP à 28°C

	0	0,0001	0,01	0,025	0,035	0,045	0,06
0	1	0,888	0,510	-0,223	-0,420	-0,551	-0,590
0,0001	0,888	1	0,486	-0,091	-0,241	-0,394	-0,437
0,01	0,510	0,486	1	0,277	-0,197	-0,240	-0,239
0,025	-0,223	-0,091	0,277	1	0,586	0,216	0,218
0,035	-0,420	-0,241	-0,197	0,586	1	0,676	0,652
0,045	-0,551	-0,394	-0,240	0,216	0,676	1	0,943
0,06	-0,590	-0,437	-0,239	0,218	0,652	0,943	1

Au seuil de signification $\alpha=0,050$ on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de corrélation significative entre les variables. Autrement dit, la corrélation entre les variables est significative.

Tableau 2 : Matrice de corrélation entre les variables de l'ACP à 37°C

	0	0,0001	0,01	0,025	0,035	0,045	0,06
0	1	0,820	0,762	0,106	-0,199	-0,089	-0,127
0,0001	0,820	1	0,781	0,098	-0,218	-0,101	-0,084
0,01	0,762	0,781	1	0,192	-0,064	0,005	0,050
0,025	0,106	0,098	0,192	1	0,631	0,621	0,569
0,035	-0,199	-0,218	-0,064	0,631	1	0,892	0,702
0,045	-0,089	-0,101	0,005	0,621	0,892	1	0,784
0,06	-0,127	-0,084	0,050	0,569	0,702	0,784	1

Au seuil de signification $\alpha=0,050$ on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de corrélation significative entre les variables. Autrement dit, la corrélation entre les variables est significative.

Tableau 3 : Matrice de corrélation entre les variables de l'ACP à 40°C

	0	0,0001	0,01	0,025	0,035	0,045	0,06
0	1	0,861	0,596	0,083	-0,067	0,073	0,149
0,0001	0,861	1	0,640	0,125	0,017	0,139	0,176
0,01	0,596	0,640	1	0,342	0,163	0,171	-0,082
0,025	0,083	0,125	0,342	1	0,798	0,608	0,179
0,035	-0,067	0,017	0,163	0,798	1	0,767	0,245
0,045	0,073	0,139	0,171	0,608	0,767	1	0,430
0,06	0,149	0,176	-0,082	0,179	0,245	0,430	1

Au seuil de signification $\alpha=0,050$ on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de corrélation significative entre les variables. Autrement dit, la corrélation entre les variables est significative.

Tableau 4 : Matrice de corrélation entre les variables de l'ACP à 45°C

	0	0,0001	0,01	0,025	0,035	0,045	0,06
0	1	0,518	0,505	0,257	-0,217	-0,217	-0,217
0,0001	0,518	1	0,706	0,270	0,047	0,047	0,047
0,01	0,505	0,706	1	0,467	0,107	0,107	0,107
0,025	0,257	0,270	0,467	1	0,281	0,281	0,281
0,035	-0,217	0,047	0,107	0,281	1	1,000	1,000
0,045	-0,217	0,047	0,107	0,281	1,000	1	1,000
0,06	-0,217	0,047	0,107	0,281	1,000	1,000	1

Au seuil de signification $\alpha=0,050$ on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de corrélation significative entre les variables. Autrement dit, la corrélation entre les variables est significative.

Annexe 3

Tableau 1 : Caractères généraux et culturels des souches de références

Caractère	Souche		
	<i>E. meliloti</i> 1021	<i>M. ciceri</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Temps de croissance	72 h	72 h	48 h
Aspect des colonies	Lisse ; translucide ; de 2 à 3 mm de Ø	Lisse ; blanchâtre ; translucide ; de 2 à 3 mm de Ø	Lisse ; blanche opaque ; de 2 à 3 mm de Ø
Aspect microscopique des cellules	Courts bâtonnets	Courts bâtonnets	Bâtonnets de taille moyenne
Absorption de RG	Négatif	Négatif	Négatif
Croissance sur BBT	Acidifiant	Acidifiant	Acidifiant
Croissance sur GPA	Négative	Négative	Positive avec virage au jaune
Croissance sur acétamide	Non testé	Non testé	Non testé

Tableau 2 : Résultats des tests conventionnels sur galeries API 20 NE des souches de références

Test	Composants actifs	Réaction/enzyme	Souche		
			Rm1021	M4	C58
NO3	Potassium nitrate	Réduction des nitrates	+	+	+
TRP	L-tryptophane	Formation d'indole	-	-	-
GLU	D-glucose	Fermentation du glucose	-	+	-
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	-	-	-
URE	Urée	UREase	+	+	+
ESC	Esculine Citrate de Fer	Hydrolyse (β -glucosidase)	+	+	+
GEL	Gélatine	Hydrolyse (protéase)	-	-	-
PNPG	4-nitrophényl- β -dgalactopyranoside	β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β DGalactopyranosidase)	+	+	+
ARA	L-ARAbinose	/	+	+	+
MNE	D-MANnose	/	+	+	+
MAN	D-MANnitol	/	+	+	+
NAG	N-Acétyle-Glucosamine	/	+	+	+
MAL	D-MALtose	/	+	+	+
GNT	Potassium GlucoNaTe	/	+	+	+
CAP	Acide CaPrique	/	-	-	-
ADI	Acide aDIpique	/	+	-	+
MLT	Acide MaLTique	/	+	+	+
CIT	Trisodium CITrate	/	-	-	-
PAC	Acide PhénylACétique	/	-	-	-

Rm1021: *Ensifer meliloti*, M4: *Mesorhizobium ciceri*, C58: *Agrobacterium tumefaciens*

Annexe 4

Informations et séquences de nos souches sur GenBank

***Sinorhizobium* sp. ML08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: KR476464.1

LOCUS KR476464 1042 bp DNA linear BCT 12-MAY-2015

DEFINITION *Sinorhizobium* sp. ML08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION KR476464

VERSION KR476464.1 GI:818947038

KEYWORDS.

SOURCE *Sinorhizobium* sp. ML08

ORGANISM [Sinorhizobium sp. ML08](#)
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Sinorhizobium/Ensifer group; Sinorhizobium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1042)

AUTHORS Baba Arbi,S., Chekireb,D., Quatrini,P., Catania,V., Cheriet,D. and Ouarts, A.

TITLE Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All. indigenous in the Oasis of Touggourt (Oued Righ Valley) in the Northern Algerian Sahara

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1042)

AUTHORS Baba Arbi,S., Chekireb,D., Quatrini,P., Catania,V., Cheriet,D. an Ouarts, A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (04-MAY-2015) STEBICEF, University of Palermo, Viale delle Scienze Bldg.16, Palermo 90128, Italy

COMMENT Sequences were screened for chimeras by the submitter using Bellerophon3.
##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1042
/organism="Sinorhizobium sp. ML08"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="ML08"
/isolation_source="Oases of Touggourt"
/host="Melilotus indicus"
/db_xref="taxon:[1651129](#)"
/country="Algeria"

```

/collection_date="2012"
/collected_by="Baba Arbi Souad, Chekireb Djamel"
/note="PCR primers=fwd_name: fD1, rev_name: rD1"
rRNA <1..>1042
/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN
1 ctcctacggg aggcagcagt ggggaatatt ggacaatggg cgcaagcctg atccagccat
61 gccgcgtgag tgatgaaggc cctagggttg taaagctctt caccggtgaa gataatgacg
121 gtaaccggag aagaagcccg gctaacttcg tgccagcagc cgcgtaata cgaagggggc
181 tagcgtgttc ggaattactg ggcgtaaagc gcacgtaggc ggattgttaa gtgaggggtg
241 aatcccagg gctcaaccct ggaactgcct ttcatactgg caatctagag tccagaagag
301 gtgagtggaa ttccgagtgt agaggtgaaa ttcgtagata ttcggaggaa caccagtggc
361 gaaggcggct cactggtctg gaactgacgc tgaggtgcga aagcgtgggg agcaaacagg
421 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatgt tagccgtcgg gcagtttact
481 gttcgggtggc gcagctaacg cattaaacat tccgcctggg gagtacggtc gcaagattaa
541 aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcggtgagg catgtggttt aattcgaagc
601 aacgcgcaga accttaccag cccttgacat cccgatcgcg gatacagagag atcgtattct
661 tcagttcggc tggatcggag acaggtgctg catggctgct gtcagctcgt gtcgtgagat
721 gttgggttaa gtcccgaac gagcgcgaacc ctcgccctta gttgccagca tttagtgtgg
781 cactctaagg ggactgccgg tgataagccg agaggaaggt ggggatgacg tcaagtcctc
841 atggccctta cgggctgggc tacacacgtg ctacaatggg ggtgacagtg ggcagcgaga
901 ccgcgaggtc gagctaactc ccaaaagcca tctcagttcg gattgactc tgcaactcga
961 gtgcatgaag ttggaatcgc tagtaatcgc agatcagcat gctgcggtga atacgttccc
1021 gggccttgta cacaccgccc gt

//

```

***Sinorhizobium* sp. ML17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: KR476465.1

LOCUS KR476465 1386 bp DNA linear BCT 12-MAY-2015

DEFINITION *Sinorhizobium* sp. ML17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION KR476465

VERSION KR476465.1 GI:818947039

KEYWORDS.

SOURCE *Sinorhizobium* sp. ML17

ORGANISM [Sinorhizobium sp. ML17](#)
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Sinorhizobium/Ensifer group; Sinorhizobium.

REFERENCE 1(bases 1 to 1386)

AUTHORS Baba Arbi,S., Chekireb,D., Quatrini,P., Catania,V., Cheriet,D. and Ouartsy,A.

TITLE Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All. indigenous in the Oasis of Touggourt (Oued Righ Valley) in the Northern Algerian Sahara

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1386)

AUTHORS Baba Arbi,S., Chekireb,D., Quatrini,P., Catania,V., Cheriet,D.
and Quartsi,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (04-MAY-2015) STEBICEF, University of Palermo, Viale
delle Scienze Bldg.16, Palermo 90128, Italy

COMMENT Sequences were screened for chimeras by the submitter using
Bellerophon3.
##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1386
/organism="Sinorhizobium sp. ML17"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="ML17"
/isolation_source="Oases of Touggourt"
/host="Melilotus indicus"
/db_xref="taxon:1651130"
/country="Algeria"
/collection_date="2012"
/collected_by="Baba Arbi Souad, Chekireb Djamel"
/note="PCR_primers=fwd_name: fD1, rev_name: rD1"

rRNA <1..>1386
/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 tgcaagtcga ggcccccgca aggggagcgg ctgacgggtg agtaacgcgt tgggtatcta
61 cccttttcta cggaataacg aagggaaact tgtgctaata cgtatgagc ccttccgggg
121 aaagatttat cgggaaagga tgagcccgcg ttggattagc tagttggtgg ggtaaaggcc
181 taccaaggcg actatccata gctggtctga caggatgac aaccacattg ggactgaaac
241 acggcccaaa ctctacggg agggagccgt ggggaatatt ggacaatggg cgcaagcctg
301 atccatccgt gccgcgtgag tgatgaaggc cctagggttg taaaggtctt tcaccggtga
361 acataatgac ggtaaccgga gaagaagccc cggctaactt cgtgccagca gccgcggtaa
421 tacgaagggg gctagcgttg ttcggaatta ctgggcgtaa agcgcacgta ggcggattgt
481 taagtgaggg gtgaaatccc agggctcaac cctggaactg ctttcatac tggcaatcta
541 gagtccagaa gaggtgagtg gaattccgag tgtagaggtg aaattcgtag atattcggag
601 gaacaccagt ggcgaaggcg gctcactggt ctggaactga cgctgaggtg cgaaagcgtg
661 gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgaa tgttagccgt
721 cgggcagttt actgttcggt ggcgcagcta acgcattaaa cattccgcct ggggagtacg
781 gtcgcaagat taaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg
841 ttttaattga agcaacgcgc agaaccttac cagcccttga catcccgatc gcggatacga
901 gagatcgtat tcttcagttc ggctggatcg gagacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct
961 cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca accctcgccc ttagttgcca

```

1021 gcatttagtt gggcactcta aggggactgc cggtgataag ccgagaggaa ggtggggatg
1081 acgtcaagtc ctcatggccc ttacgggctg ggctacacac gtgctacaat ggtggtgaca
1141 gtgggcagcg agaccgcgag gtcgagctaa tctccaaaag ccattctcagt tcggattgca
1201 ctctgcaact cgagtgcattg aagttggaat cgctagtaat cgcagatcag catgctgcgg
1261 tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtt ggttctacce
1321 gaaggtagtg cgctaaccgc aaggaggcag ctaaccacgg tagggtcagc gactgggggtg
1381 aagtcg //

```

***Sinorhizobium* sp. ML22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: KR476466.1

```

LOCUS      KR476466 1398 bp DNA linear BCT 12-MAY-2015
DEFINITION Sinorhizobium sp. ML22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION  KR476466
VERSION    KR476466.1  GI:818947040
KEYWORDS.
SOURCE     Sinorhizobium sp. ML22
  ORGANISM Sinorhizobium sp. ML22
           Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales;
           Rhizobiaceae; Sinorhizobium/Ensifer group; Sinorhizobium.
REFERENCE  1(bases 1 to 1398)
  AUTHORS  Baba Arbi,S., Chekireb,D., Quatrini,P., Catania,V., Cheriet,D.
  and Ouarts,i,A.
  TITLE    Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated
           with Medicago littoralis Rhode and Melilotus indicus (L.) All.
           indigenous in the Oasis of Touggourt (Oued Righ Valley) in the
           Northern Algerian Sahara
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2(bases 1 to 1398)
  AUTHORS  Baba Arbi,S., Chekireb,D., Quatrini,P., Catania,V., Cheriet,D.
  and Ouarts,i,A.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (04-MAY-2015) STEBICEF, University of Palermo, Viale
           delle Scienze Bldg.16, Palermo 90128, Italy
COMMENT    Sequences were screened for chimeras by the submitter using
           Bellerophon3.
           ##Assembly-Data-START##
           Sequencing Technology : Sanger dideoxy sequencing
           ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
   source   1..1398
            /organism="Sinorhizobium sp. ML22"
            /mol_type="genomic DNA"
            /strain="ML22"
            /isolation_source="Oases of Touggourt"

```

```

/host="Melilotus indicus"
/db_xref="taxon:1651131"
/country="Algeria"
/collection_date="2012"
/collected_by="Baba Arbi Souad, Chekireb Djamel"
/note="PCR_primers=fwd_name: fD1, rev_name: rD1"
rRNA <1..>1398
/product="16S ribosomal RNA"

```

ORIGIN

```

1  cggcagctta cacatgcaag tcgagcgcgc cgcaagggga gcggcagacg ggtgagtaac
61  gcgtgggaat ctaccctttt ctacggaata acgcagggaa acttgtgcta ataccgatg
121 agcccttcg gggaaagatt tatcgggaaa ggatgagccc gcgttgatt agctagttag
181 tggggtaaag gcctaccaag gcgacgatcc atagctggtc tgagaggatg atcagccaca
241 ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc agtggggaat attggacaat
301 gggcgcaagc ctgatccagc catgccgcgt gaggatgaa ggccctaggg ttgtaaagct
361 ctttcaccgg tgaagataat gacggtaacc ggagaagaag ccccggctaa cttcgtgcca
421 gcagccgcgg taatacgaag ggggctagcg ttgttcggaa ttactgggcg taaagcgcac
481 gtaggcgatg tgtaagtga ggggtgaaat cccagggctc aaccctggaa ctgcctttca
541 tactggcaat cttagtcca gaagaggatg gtggaattcc gaggtagag gtgaaattcg
601 tagatattcg gaggaacacc agtggcgaag gcggtcact ggtctggaac tgacgctgag
661 gtgcgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat
721 gaatgttagc cgtcgggcag tttactgttc ggtggcgcag ctaacgcatt aacattccg
781 cctggggagt acggtcgcga gattaaaact caaaggaatt gacgggggccc cgcacaagcg
841 gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgcagaacct taccagccct tgacatcccg
901 atcgcggata cgagagatcg tattcttcag ttcggctgat cggggacagg tgctgcatgg
961 ctgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caaccctcgc
1021 ccttagttgc cagcatttag ttgggcactc taaggggact gccggtgata agccgagagg
1081 aaggtgggga tgacgtcaag tcctcatggc cttacgggc tgggctacac acgtgctaca
1141 atggtggtga cagtgggag cgagaccgag aggtcgagct aatctccaaa agccatctca
1201 gttcggattg cactctgcaa ctcgagtgca tgaagttgga atcgctagta atcgagatc
1261 agcatgctgc ggtgaatacg ttcccgggccc ttgtacacac cgcccgtcac accatgggag
1321 ttggttctac ccgaaggtag tcgctaacct caaggagcca gctaccctcg gttatggtca
1381 gcgactcgtg cgaagtcg //

```

***Sinorhizobium* sp. MD05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: KR476467.1

LOCUS KR476467 1391 bp DNA linear BCT 12-MAY-2015

DEFINITION *Sinorhizobium* sp. MD05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION KR476467

VERSION KR476467.1 GI:818947041

KEYWORDS.

SOURCE *Sinorhizobium* sp. MD05ORGANISM [Sinorhizobium sp. MD05](#)

Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Sinorhizobium/Ensifer group; Sinorhizobium.

REFERENCE 1(bases 1 to 1391)

AUTHORS Baba Arbi,S., Chekireb,D., Quatrini,P., Catania,V., Cheriet,D. and Ouartsi,A.

TITLE Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All. indigenous in the Oasis of Touggourt (Oued Righ Valley) in the Northern Algerian Sahara

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2(bases 1 to 1391)

AUTHORS Baba Arbi,S., Chekireb,D., Quatrini,P., Catania,V., Cheriet,D. and Ouartsi,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (04-MAY-2015) STEBICEF, University of Palermo, Viale delle Scienze Bldg.16, Palermo 90128, Italy

COMMENT Sequences were screened for chimeras by the submitter using Bellerophon3.

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1391

/organism="Sinorhizobium sp. MD05"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="MD05"

/isolation_source="Oases of Touggourt"

/host="Medicago littoralis"

/db_xref="taxon:1651126"

/country="Algeria"

/collection_date="2012"

/collected_by="Baba Arbi Souad, Chekireb Djamel"

/note="PCR_primers=fwd_name: fD1, rev_name: rD1"

rRNA <1..>1391

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 cttaccatgc agtcgagcgc cccgcaaggg gagcggcaga cgggtgagta acgcgtggga

61 atctaccctt ttctacggaa taacgcaggg aaacttgatg taataccgta tgagcccttc

121 gggggaaaga tttatcggga aaggatgagc ccgcgttgga ttagctagtt ggtggggtaa

181 aggcctacca aggcgacgat ccatagctgg tctgagagga tgatcagcca cattgggact

241 gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtgggga atattggaca atgggcgcaa

301 gcctgatcca gccatgccgc gtgagtgatg aaggccctag ggttgtaaag ctctttcacc

361 ggtgaagata atgacggtaa ccggagaaga agccccgct aacttcgtgc cagcagccgc

421 ggtaatacga agggggctag cgttgttcgg aattactggg cgtaaagcgc acgtaggcgg

481 attgttaagt gaggggtgaa atcccagggc tcaaccctgg aactgccttt catactggca
 541 atctagagtc cagaagaggt gagtggaatt ccgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt
 601 cggaggaaca ccagtggcga aggcggctca ctggctctgga actgacgctg aggtgcgaaa
 661 gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgaatgtta
 721 gccgtcgggc agtttactgt tcggtggggc agctaacgca ttaaaccatt cgccctgggga
 781 gtacggtcgc aagattaata ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtgagca
 841 tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgcagaac cttaccagcc cttgacatcc cgatcgcgga
 901 tacgagagat cgtattcttc agttcggctg gatcggagac aggtgctgca tggctgtcgt
 961 cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaatcct cgcccttagt
 1021 tgccagcatt cagttgggca ctctaagggg actgccggtg ataagccgag aggaagtggg
 1081 ggatgacgtc aagtcctcat ggccccttac gggctgggct acacacgtgc tacaatggtg
 1141 gtgacagtgg gcagcgagac cgcgaggctg agctaattct caaaagccat ctcaattcgg
 1201 attgcactct gcaactcgag tgcataaagt tggaaatcgt agtaatcgca gatcagcatg
 1261 ctgagggtgaa tacgttcccg gtcctgttac acaccgcccg tcacaccatg ggagttgggt
 1321 ctaccggaag gtagtcgcta acctcaagga gccagctacc ctggtatgg tcagcgactc
 1381 gtgcgaagtc g //

***Sinorhizobium* sp. MD09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: KR476468.1

LOCUS KR476468 1391 bp DNA linear BCT 12-MAY-2015
 DEFINITION *Sinorhizobium* sp. MD09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION KR476468
 VERSION KR476468.1 GI:818947042
 KEYWORDS.
 SOURCE *Sinorhizobium* sp. MD09
 ORGANISM [Sinorhizobium sp. MD09](#)
*Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales;
 Rhizobiaceae; Sinorhizobium/Ensifer group; Sinorhizobium.*
 REFERENCE 1(bases 1 to 1391)
 AUTHORS Baba Arbi,S., Chekireb,D., Quatrini,P., Catania,V., Cheriet,D.
 and Ouartsı,A.
 TITLE Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated
 with *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All.
 indigenous in the Oasis of Touggourt (Oued Righ Valley) in the
 Northern Algerian Sahara
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2(bases 1 to 1391)
 AUTHORS Baba Arbi,S., Chekireb,D., Quatrini,P., Catania,V., Cheriet,D.
 and Ouartsı,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-MAY-2015) STEBICEF, University of Palermo, Viale
 delle Scienze Bldg.16, Palermo 90128, Italy
 COMMENT Sequences were screened for chimeras by the submitter using
 Bellerophon3.

```

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..1391
                        /organism="Sinorhizobium sp. MD09"
                        /mol_type="genomic DNA"
                        /strain="MD09"
                        /isolation_source="Oases of Touggourt"
                        /host="Medicago littoralis"
                        /db_xref="taxon:1651127"
                        /country="Algeria"
                        /collection_date="2012"
                        /collected_by="Baba Arbi Souad, Chekireb Djamel"
                        /note="PCR_primers=fwd_name: fD1, rev_name: rD1"
     rRNA              <1..>1391
                        /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
     1 gctaccatgc agtcgagcgc cccgcaaggg gagcggcaga cgggtgagta acgcgtggga
    61 atctaccctt ttctacggaa taacgcaggg aaacttgtgc taataccgta tgagcccttc
   121 gggggaaaga tttatcggga aaggatgagc cgcgcttggga ttagctagtt ggtggggtaa
   181 aggcctacca aggcgacgat ccatagctgg tctgagagga tgatcagcca cattgggact
   241 gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtgggga atattggaca atgggcgcaa
   301 gcctgatcca gccatgccgc gtgagtgatg aaggccctag ggttgtaaag ctctttcacc
   361 ggtgaagata atgacggtaa cgggagaaga agccccggct aacttcgtgc cagcagccgc
   421 ggtaatacga agggggctag cgttgttcgg aattactggg cgtaaagcgc acgtaggcgg
   481 attgttaagt gaggggtgaa atcccagggc tcaaccctgg aactgccttt catactggca
   541 atctagagtc cagaagaggt gagtggaatt ccgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt
   601 cggaggaaca ccagtggcga aggcggctca ctggtctgga actgacgctg aggtgcgaaa
   661 gcgtagggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgaatgta
   721 gccgtcgggc agtttactgt tcggtggcgc agctaacgca ttaaaccatt cgccctggga
   781 gtacggtcgc aagattaaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtaggagca
   841 tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgcagaac cttaccagcc cttgacatcc cgatcgcgga
   901 tacgagagat cgtatccttc agttcggctg gatcggagac aggtgctgca tggctgtcgt
   961 cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct cgcccttagt
  1021 tgccagcatt cagttgggca ctctaaggga ctgccggtga taagccgaga ggaaggtggg
  1081 gatgacgtca agtcctcatg ggcccttacg ggctgggcta cacacgtgct acaatgggtg
  1141 tgacagtggg cagcgagacc gcgaggtcga gctaactcctc aaaagccatc tcagttcgga
  1201 ttgactctg caactcgagt gcatgaagtt ggaatcgcta gtaatcgag atcagcatgc
  1261 tgcggtgaat acgttcccgg gccttgta caaccgcccgt cacaccatgg gagttggttc
  1321 taccggaagg tagtgcgcta accgcaagga ggcagctaac ctcggtatgg tcagcgactg
  1381 ggggaagtcg a

```

//

Sinorhizobium sp. MD12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KR476469.1

LOCUS KR476469 1404 bp DNA linear BCT 12-MAY-2015

DEFINITION *Sinorhizobium* sp. MD12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION KR476469

VERSION KR476469.1 GI:818947043

KEYWORDS.

SOURCE *Sinorhizobium* sp. MD12

ORGANISM [Sinorhizobium sp. MD12](#)
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Sinorhizobium/Ensifer group; Sinorhizobium.

REFERENCE 1(bases 1 to 1404)

AUTHORS Baba Arbi,S., Chekireb,D., Quatrini,P., Catania,V., Cheriet,D. and Quartsi,A.

TITLE Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All. indigenous in the Oasis of Touggourt (Oued Righ Valley) in the Northern Algerian Sahara

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2(bases 1 to 1404)

AUTHORS Baba Arbi,S., Chekireb,D., Quatrini,P., Catania,V., Cheriet,D. and Quartsi,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (04-MAY-2015) STEBICEF, University of Palermo, Viale delle Scienze Bldg.16, Palermo 90128, Italy

COMMENT Sequences were screened for chimeras by the submitter using Bellerophon3.

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1404
/organism="Sinorhizobium sp. MD12"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="MD12"
/isolation_source="Oases of Touggourt"
/host="Medicago littoralis"
/db_xref="taxon:[1651128](#)"
/country="Algeria"
/collection_date="2012"
/collected_by="Baba Arbi Souad, Chekireb Djamel"
/note="PCR_primers=fwd_name: fD1, rev_name: rD1"

rRNA <1..>1404
/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 tggcggcagg cttaacacat gcaagtcgag cgccccgcaa ggggagcggc agacgggtga
61 gtaacgcgtg ggaatctacc cttttctacg gaataacgca gggaaacttg tgctaataacc
121 gtatgagccc ttcgggggaa agatttatcg ggaaaggatg agcccgcgtt ggattagcta
181 gttggtgggg taaaggccta ccaaggcgac gatccatagc tggctctgaga ggatgatcag
241 ccacattggg actgagacac ggcccaact cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgg
301 acaatgggcg caagcctgat ccagccatgc cgcgtgagtg atgaaggccc tagggttgta
361 aagctctttc accggtgaag ataatgacgg taaccggaga agaagccccg gctaacttcg
421 tgccagcagc cgcggttaata cgaagggggc tagcgttggt cggaattact gggcgtaaac
481 cgcacgtagg cggattgtta agtgaggggt gaaatcccag ggctcaacc tggaaactgcc
541 tttcactactg gcaatctaga gtccagaaga ggtgagtgga attccgagtg tagaggtgaa
601 attcgtagat attcggagga acaccagtgg cgaaggcggc tactcgtctt ggaactgacg
661 ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa
721 acgatgaatg ttagccgtcg ggagtttac tgttcggtgg cgcagctaac gcattaaaca
781 ttccgcctgg ggagtacggt cgcaagatta aaactcaaag gaattgacgg gggccccgac
841 aagcgggtga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgcag aaccttacca gcccttgaca
901 tcccgatcgc ggatacgaga gatcgtattc ttcagttcgg ctggatcggg gacaggtgct
961 gcatggctgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac
1021 cctcgccctt agttgccagc atttagttgg gcactctaag gggactgccg gtgataagcc
1081 gagaggaagg tggggatgac gtcaagtcct catggccctt acgggctggg ctacacacgt
1141 gctacaatgg tggtgacagt gggcagcgag accgcgaggt cgagctaata tccaaaagcc
1201 atctcagttc ggattgcaact ctgcaactcg agtgcatgaa gttggaatcg ctagtaatcg
1261 cagatcagca tgctgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca
1321 tgggagttgg ttctaccgga aggtagtgcg ctaaccgcaa ggaggcagct aacctcggta
1381 tggtcagcga ctgggggtgaa gtcg

//

Search

Alerts

My list

My Scopus

Journal Homepage

Symbiosis

Subject Area: Agricultural and Biological Sciences**Publisher:** Springer Netherlands**ISSN:** 0334-5114**Scopus Coverage Years:** 1973, 1985, 1987, from 1990 to 1991, from 1993 to Present

Journal Metrics

Scopus Journal Metrics offer the value of context with their citation measuring tools. The metrics below allow for direct comparison of journals, independent of their subject classification. To learn more, visit: www.journalmetrics.com.

SJR (SCImago Journal Rank) (2014) : 0.594**IPP (Impact per Publication) (2014) :** 1.391**SNIP (Source Normalized Impact per Paper) (2014) :** 0.759
 [Compare with other journals](#)

Follow this source

Receive emails when new documents are available in Scopus

SJR, IPP, and SNIP

SJR = SCImago Journal Rank is weighted by the prestige of a journal. Subject field, quality and reputation of the journal have a direct effect on the value of a citation. SJR also normalizes for differences in citation behavior between subject fields.

IPP = Impact per Publication (IPP) measures the ratio of citations per article published in the journal.

SNIP = Source Normalized Impact per Paper measures contextual citation impact by weighting citations based on the total number of citations in a subject field.

Open Access Journals

Journals covered by Scopus are indicated as Open Access if the journal is listed in the Directory of Open Access Journals (DOAJ) and/or the Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD).

For questions regarding Open Access Journals please see the [Content info page](#).

For questions regarding the Open Access Journal search options please see the [Scopus OA help file](#).

Documents available from

 [Articles in press](#) ?
Latest issue: Volume 66, Issue 2 (August 2015)

2015	26 documents
2014	45 documents
2013	50 documents
2012	57 documents
2011	48 documents
2010	59 documents
2009	59 documents
2008	41 documents
2007	43 documents
2006	36 documents
2005	56 documents
2004	42 documents
2003	39 documents
2002	26 documents
2001	42 documents
2000	33 documents
1999	51 documents
1998	45 documents
1997	35 documents
1996	29 documents
1995 and before	65 documents

[Top of page](#) ▲

About Scopus
[What is Scopus](#)
[Content coverage](#)
[Scopus Blog](#)
[Scopus API](#)

Language
[日本語に切り替える](#)
[切换到简体中文](#)
[切换到繁體中文](#)

Customer Service
[Help and Contact](#)
[Live Chat](#)

About
[Elsevier](#)
[Terms and Conditions](#)
[Privacy Policy](#)



Home

Journal Rankings

Journal Search

Country Rankings

Country Search

Compare

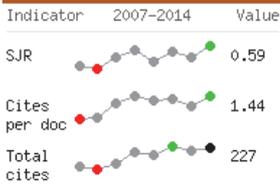
Map Generator

Help

About Us

Show this information in
your own website

Symbiosis



Display journal title

Just copy the code below and
paste within your html page:

<a href="http://www.scimagojr.com

Journal Search

Search query

in Journal Title

Exact phrase

Symbiosis

Country: [Netherlands](#)

Subject Area: [Agricultural and Biological Sciences](#)

Subject Category:

Category	Quartile (Q1 means highest values and Q4 lowest values)															
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Agricultural and Biological Sciences (miscellaneous)	Q1	Q1	Q2	Q1												

Publisher: [Springer Netherlands](#). Publication type: Journals. ISSN: 03345114, 18787665

Coverage: 1973, 1985, 1987, 1990-1991, 1993-2015

H Index: 34

Scope:

Symbiosis publishes results of original research contributing to the understanding of symbiotic interactions at the molecular, cellular and organismic levels. Symbiosis aims to introduce new or unknown symbioses for research in symbiology and intends to provide a central information point for this intriguing subfield to enhance interaction among researchers in its various sectors. Topics of particular interest are: Nutritional interactions, mutual regulatory and morphogenic effects, structural coadaptations, interspecific recognition and specificity, ecological adaptations, evolutionary consequences of symbiosis, culture and other specific methods used for symbiotic research. ([source](#))

Charts

Data

Related product



@scimago

SJR is developed by:



Powered by
Scopus

SJR indicator vs. Cites per Doc (2y)

Phenotypic and genotypic characterization of root nodules rhizobia of *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All. growing in the Oasis of Touggourt, Oued Righ Valley, in the Algerian Sahara

Souad Baba Arbi¹ · Djamel Chekireb¹ · Paola Quatrini² · Valentina Catania² · Dahbia Cheriet¹ · Akila Ouarts¹

Received: 8 October 2014 / Accepted: 4 August 2015 / Published online: 16 August 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Forty rhizobial strains were isolated from root nodules of *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) harvested from the sandy soils of Touggourt's oases in the Oued Righ Valley, Algerian Sahara. The isolates were studied for their cultural, biochemical and symbiotic effectiveness. All of them were fast-growing bacteria; utilized a wide range of carbon sources, produced abundant extracellular polysaccharides, tolerated high concentrations of NaCl (up to 2.5 %), grew at temperatures between 28 and 45 °C and at pH values between 4.5 and 9. The isolates were sensitive to the antibiotics kanamycin, tetracycline and rifampicin but showed resistance to neomycin and erythromycin. All the isolates induced the formation of effective nodules on their host plants. On the basis of the physiological, biochemical and symbiotic effectiveness, we selected six strains MD05, MD09, MD12, ML08, ML17 and ML22 for genotypic characterization. Phylogenetic analysis of the selected strains based on 16S ribosomal RNA gene showed that these strains of bacteria were affiliated to the *Ensifer meliloti* group.

Keywords Rhizobia · *Medicago* · *Melilotus* · Oasis soil · Phenotype · Genotype

✉ Souad Baba Arbi
souadbabaarbi@gmail.com

¹ Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology (LABM), Faculty of Sciences, Department of Biochemistry, University Badji Mokhtar Annaba, B.P. 12, Sidi Amar 23200, Annaba, Algeria

² Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies (STEBICEF), University of Palermo, Viale delle Scienze, Bldg 16, 90128 Palermo, Italy

1 Introduction

In Algeria, arid lands with a Saharan climate represent about 90 % of the total area of the country (Le Houérou 1975). The Algerian Sahara is characterized by the presence of particular regions called “oases” that represent biological diversity hotspots (Riou 1990; Chouaki et al. 2006). The most famous oases are those of Oued Righ Valley (Fig. 1) where more than 47 oases are located between 32°54' of latitude and 34°09' longitude. This valley has a hyper arid climate, with gritty soil characterized by a high salinity due to irrigation with artesian salty water (3 g/l). The chemical composition of these soils is variable but is generally very poor in nitrogen, phosphorous and potassium (Toutain 1974; Le Houérou 1975; Koull et al. 2013). Agriculture at these oases is characterized by small production units (Ferry and Toutain 1990) and the integration of fruit trees and tall crops to protect herbal plants against the strong sunlight. The oases of Oued Righ Valley have a beneficial microclimate due to the shade and the constant moisture provided by irrigation. These decrease the effect of the very hot Saharan climate (Riou 1990; Messar 1996).

The *Leguminosae* are one of three important families which are predominant in these agriculture units; the others being the *Poaceae* and the *Asteraceae*. *Medicago sativa* is the main annual fodder crop of the oases and occupies about 80 % of the land surface devoted to such crops and a third of the irrigated area (Janati 1990; Abdelguerfi et al. 1996; Chaabena and Abdelguerfi 2007; Chouaki et al. 2006; Chafi and Bensoltane 2009; Chaabena et al. 2011).

Plant productivity in these arid and semi-arid regions is low because of poor soil fertility (Toutain 1974; Le Houérou 1975; Djennane 1990; Zahran 1999; Priefer et al. 2001). Nitrogen is one of the main factors limiting plant growth, and soils are generally very poor on organic matter (Fitouri Dhane et al.

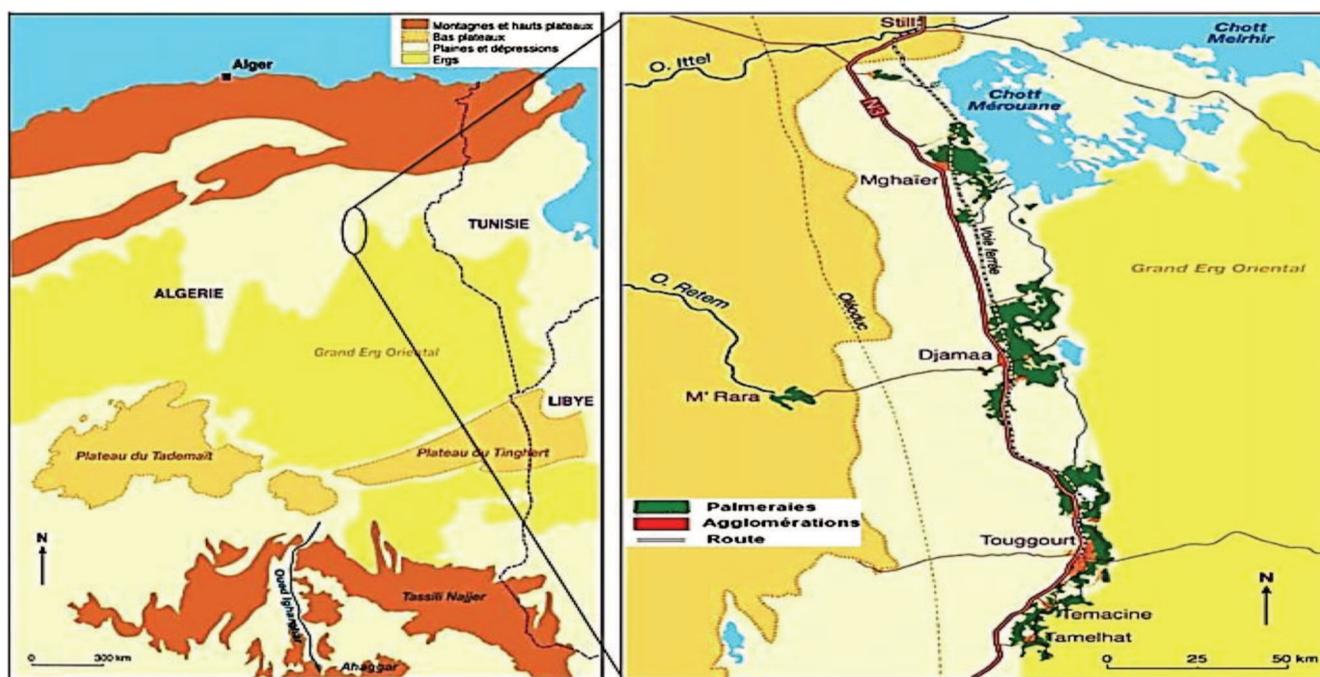


Fig. 1 The Geographic location of the oases of Oued Righ Valley

2012; Palma et al. 2013). Biological Nitrogen Fixation (BNF) is the sustainable source of nitrogen in the cropping systems (Serraj et al. 2004) and *Rhizobium*-legume symbioses provide soil enrichment (Zahran 1999, 2001). In Algeria, studies on rhizobia-legume symbiosis have only been completed in northern regions of the country while others have been carried out in the arid regions of Tunisia (Zakhia et al. 2004; Mnasri et al. 2007a, b; Djedidi et al. 2011; Rejjii et al. 2014), Morocco (Maâtallah et al. 2002; Thami-Alami et al. 2010) and Egypt (Zahran 1997; Abdel-Salam et al. 2010).

Rhizobia associated with wild legumes in the oases of Touggourt have not previously been investigated and the present work was carried out to study rhizobial strains associated with two indigenous legumes; *Medicago littoralis* and *Melilotus indicus* growing in salty soils of Touggourt's oases. The phenotypic characterization of these strains was conducted to evaluate their capacity to grow under environmental stresses which include high temperature, salinity, drought and pH. The phylogenetic positions of our strains were determined by an analysis of the 16S rRNA gene.

2 Materials and methods

2.1 Plant material

The wild legumes *Medicago littoralis* and *Melilotus indicus* were collected from the oases of Touggourt in Oued Righ Valley.

2.2 Isolation of rhizobia

The nodules were surface-sterilized with sodium hypochlorite (2 %) for 4 min and rinsed five times with sterile water; then the nodules were crushed with glass rod in a sterile test tube. One loopful of the nodule content suspension was streaked on yeast extract mannitol agar medium (YEMA) containing Congo red dye and incubated at 28 °C until colonies achieved a maximum size (Somasegaran and Hoben 1985).

After incubation for 3 to 5 days at 28 °C; single colonies were selected and transferred several times on YEMA medium. Isolates were purified and maintained on YEMA medium and conserved at -20 °C in YEMB-glycerol (yeast extract mannitol broth supplemented with 20 % glycerol) until use (Somasegaran and Hoben 1985; Shetta et al. 2011).

2.3 Rhizobia presumptive tests

The absorption or not of the Congo Red dye (CR) and the production of acid or alkali by the isolates was estimated after 3 days of growth respectively on YEMA supplemented with CR (0.0025 %) and on YEMA supplemented with Bromothymol blue (BTB 0.0025 %) (Somasegaran and Hoben 1985; Shetta et al. 2011). *Ensifer meliloti* strain 1021, *Mesorhizobium ciceri* (M4) and *Agrobacterium tumefaciens* C58 were utilized as reference strains for the phenotypic tests. All the tests were done with suspension of isolates at the exponential growth phase.

2.4 Temperature and salt tolerance assays

The effect of the temperature and the tolerance to different concentrations of NaCl were determined by inoculating the isolates on YEMA medium supplemented with NaCl at different concentrations (*w/v*), 2.5; 3.5; 4.5 and 6.0 %. The plates were incubated at four different temperatures (28; 37; 40 and 45 °C) for 7 days (Maâtallah et al. 2002; Djedidi et al. 2011).

2.5 pH tolerance

The tolerance of isolates to large range of pHs (4.5; 5.5; 6.8; 8 and 9) was determined on YEMA medium. The plates were incubated for 3 days at 28 °C (Thami-Alami et al. 2010).

2.6 Tolerance to drought stress

The isolates were suspended in 1 ml of PEG 4000 solutions at final concentrations: 0; 10; 15; 20 and 25 % (*w/v*) and then 10 µl of each suspension were used for inoculating YEMA plates. The plates were incubated at 28 °C for 3 days; the tolerance was estimated by measuring the growth of isolates on plates at different concentrations of PEG 4000.

2.7 Intrinsic antibiotic resistance

In a first protocol, the test was performed by using antibiotics discs. A volume of 0.5 ml of an exponential culture of the isolates was spread on the surface of the YEMA plates; the plates were dried for 30 min and we put the antibiotics discs on the surface of the plates : Streptomycin (30 µg); ampicillin (30 µg); chloramphenicol (30 µg); tetracycline (30 µg); nalidixic acid (30 µg); kanamycin (30 µg). After 3 to 5 days of incubation at 28 °C, the inhibition zones were measured (Rome et al. 1996; Elbanna et al. 2009).

In a second protocol, filter-sterilized antibiotics were added aseptically to sterile YEM medium to give a final concentrations of rifampicin (30 µg/ml); erythromycin (30 µg/ml) and neomycin (30 µg/ml) (Somasegaran and Hoben 1985). Plates were incubated at 28 °C, after 3 days, results were recorded by the absence or the presence of bacterial growth (Shetta et al. 2011; Thami-Alami et al. 2010; Zhang et al. 1991).

2.8 Plant nodulation test

The ability of isolates to nodulate their host plants was tested. Seeds were hand-sorted for size uniformity and for absence of damages, surface-disinfected by soaking in sodium hypochlorite (2.5 %) for 10 min and rinsed several times with sterile distilled water, then left to germinate in the dark (Somasegaran and Hoben 1985; Amrani et al. 2010).

The nodulation tests were done using pots pre-filled with sterile sand. At least three seeds were used per pot for each

isolate tested (Abdel-Salam et al. 2010). The suspensions were prepared using isolates at the exponential growth phase. One ml of each suspension was used to inoculate young plants of *Medicago* and *Melilotus*. The plants were kept under natural conditions and watered with the solution of Rigaud and Puppo (Priefer et al. 2001; Djedidi et al. 2011). After 6 to 8 weeks of plant growth, the presence or absence of nodules on the roots was recorded. The efficiency of the nodules was estimated by the presence of red pigment (leghemoglobin) inside the nodules (Djedidi et al. 2011). The plants were dried at 50 °C after separating roots from aerial parts.

2.9 Test of 3-ketolactose

The determination of 3-ketolactase enzyme activity allows distinguishing between *Agrobacterium* and other rhizobial strains (Murugesan et al. 2010). Isolates were cultivated on nutrient glucose agar medium (NGA) for 48 to 72 h (Bouzar et al. 1995) and then suspensions were prepared with colonies grown on NGA. Drops of 10 µl were putted on lactose agar medium (LAM) with lactose (1 %), yeast extract (0.1 %), and agar (2 %). Three isolates per plate were tested. After incubation at 28 °C for 48 to 72 h, the plates were flooded with a thin layer of Benedict's reagent (Bouzar et al. 1995). The presence of 3-ketolactose in the medium was assessed by the formation of a yellow ring of cuprous oxide around the rhizobial colony after 15 to 20 min.

2.10 Biochemical and auxanographic tests

API 20NE and API 50CH are standardized systems, API 20 NE system combining 20 tests for identification of gram-negative rod and API 50CH gallery consists of 50 tests used for the study of carbohydrate metabolism. API 20 NE tests, the inoculation was done as recommended by the manufacturers (Shetta et al. 2011). The ability of isolates to metabolize carbohydrates was tested by using API 50 CH gallery (BioMérieux, France) as described by Kersters et al. (1984). After inoculation, galleries were incubated at 28 °C; the results were scored every day for 7 days.

2.11 Statistical analysis

The Principal Component Analysis (PCA) was performed to examine the relationships between the tolerance of isolates *in vitro* to both high temperature and salinity. Computations and graphical display were made using the XLSTATM software package (version 2004. 7. 5. 2, Addinsoft, Paris, France, <http://www.xlstat.com>). A computer cluster analysis of 206 phenotypic variables was carried out using STATISTICA 7.0 software package and a phenogram was constructed by the Unweighted Pair Group Method with Average (UPGMA) clustering method.

2.12 Genomic DNA extraction and phylogenetic analysis of rRNA genes

Genomic DNA was extracted using QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Düsseldorf, Germany) according to the manufacturer's instructions. The bacterial 16S rRNA gene fragment was amplified using the bacterial universal primers fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al. 1991). The amplification reaction mixture consisted of 1x PCR reaction buffer, 100 nM of each primer, 200 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate, 0.25 Units Hot Star Taq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) and 20 ng of bacterial DNA.

The PCR program consisted of an initial step activation of the enzyme at 95 °C for 15 min, followed by a step of denaturation at 95 °C for 15 min; 30 cycles of denaturation for 1 min at 95 °C, annealing for 1 min at 55 °C and elongation for 1.5 min at 72 °C, followed by a final elongation step at 72 °C for 7 min. The amplicons were gel-purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and bidirectionally sequenced using primers rD1 and fD1. A single strand sequence was obtained for the strain ML08.

The 16S rRNA gene sequences were subjected to a NCBI nucleotide and 16S rRNA gene BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to identify sequences of the highest similarity. Phylogenetic analysis was inferred using the Maximum-likelihood method and bootstrap support for each node was evaluated with 1000 replicates. The multiple sequence alignment of nucleotide sequences for creating Maximum-likelihood was inferred using free software MEGA 5.2.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA gene are from KR476464 to KR476469.

3 Results

3.1 Rhizobial isolation

In this study, 40 strains were isolated from nodules of the wild legumes *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All. plants harvested from the field of Touggourt's Oases. Respectively, 15 isolates were from nodules of *M. littoralis* Rhode (MD1 to MD15) and 25 were from nodules of *M. indicus* (L.) All. (ML1 to ML25). All these isolates were

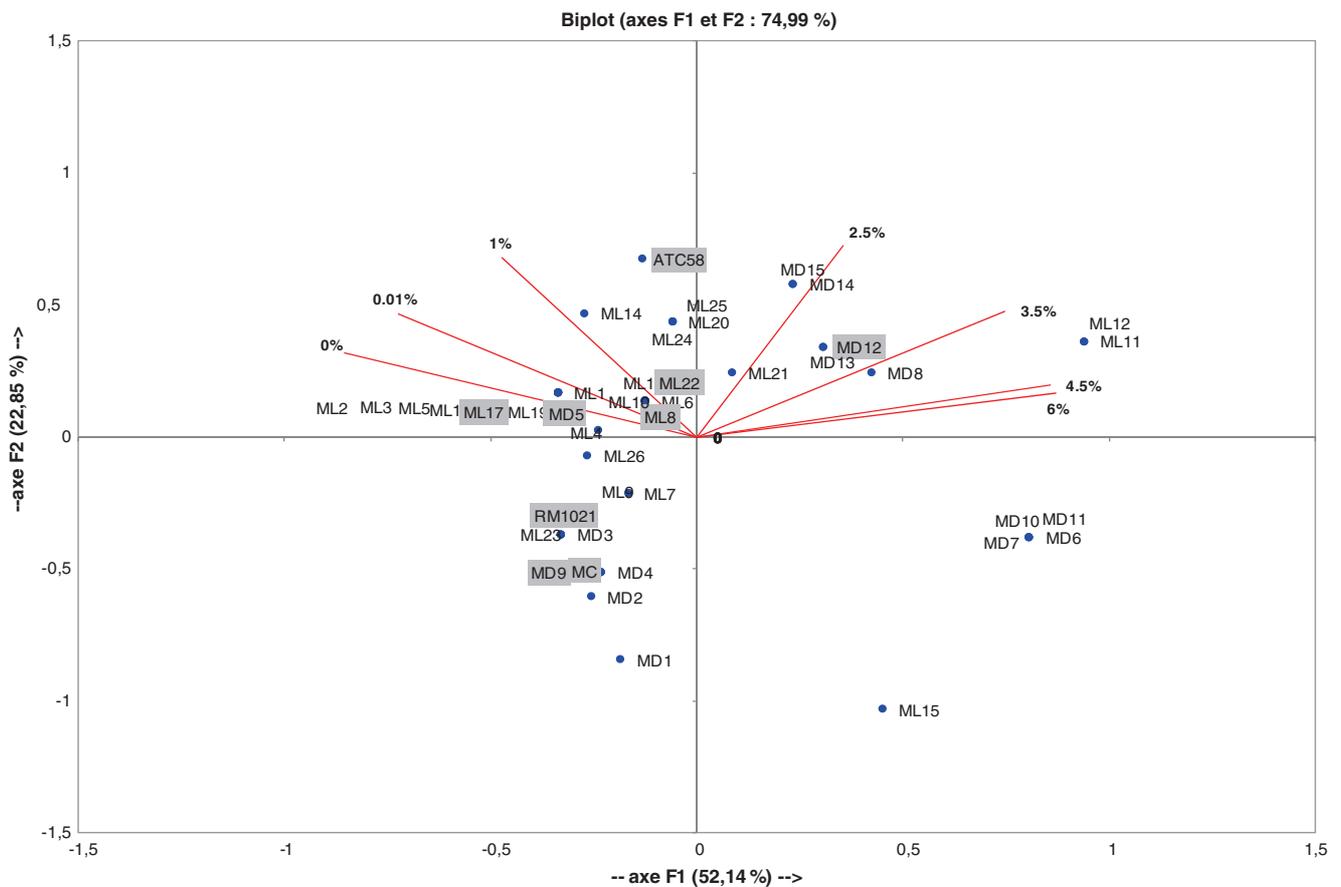


Fig. 2 PCA showing the relationship between tolerance of isolates to NaCl and their growth at 28 °C. RM1021: *E. meliloti* 1021, MC: *M. ciceri*, ATC58: *A. tumefaciens*. In grey isolates 16S rRNA sequenced and references strains

fast growing bacteria (72 h), with smooth, semi-translucent circular colonies and produced abundant quantity of polysaccharide. The diameter of the colonies varied between 3 and 4 mm after 3 days of incubation. The colonies of two isolates from *M. indicus* were yellow, smooth with 1 to 2 mm of diameter after 3 days of incubation and did not produce polysaccharide.

3.2 Phenotypic characterization

3.2.1 *Rhizobia* presumptive tests

None of the isolates absorbed Congo red dye and nearly all (97 %) caused a reduction in the pH of the medium during growth. The growth of isolates ML11, ML12, ML15 and MD07 slightly increased the pH of the medium.

3.2.2 Salt and high temperature tolerance

All of the isolates grew at temperatures between 28 and 40 °C and 98 % of them tolerated temperatures up to 45 °C. The reference strain isolates *Ensifer meliloti* strain 1021;

Mesorhizobium ciceri and *Agrobacterium tumefaciens* C58 were also able to grow at these temperatures.

The ability of isolates to tolerate NaCl was examined and the results show that 100 % of the isolates grow at low concentrations of NaCl (0.01 % w/v). Ninety eight percent of the isolates tolerated 1 % NaCl, 87 % 2.5 %, 75 % at 3.5 % and 52.5 % at 4.5 %. Only 45 % of the isolates tolerated high salinity (6 %). In comparison, *A. tumefaciens* C58, *E. meliloti* 1021 and *M. ciceri* did not tolerate more than 1 % of NaCl. The Principal Component Analysis graphs (PCA), showed that the direction of axis variables reflected tolerance to different concentrations of NaCl (Figs. 2, 3, 4 and 5).

Analysis of the combined effects of temperature and NaCl showed that temperatures between 30 and 37 °C improve the salt tolerance of isolates. Figures 2 and 3 show that the number of tolerant isolates varied, from 13 at 28 °C to 19 at 37 °C. Indeed, the optimal temperature of growth for our isolates was about 30 °C. It was interesting that incubation of isolates at high temperatures (40 and 45 °C) decreased the salt tolerance of isolates. At 40 °C, only 8 isolates showed a weak growth at 4 % of NaCl (Figs. 4 and 5), while at 45 °C isolates

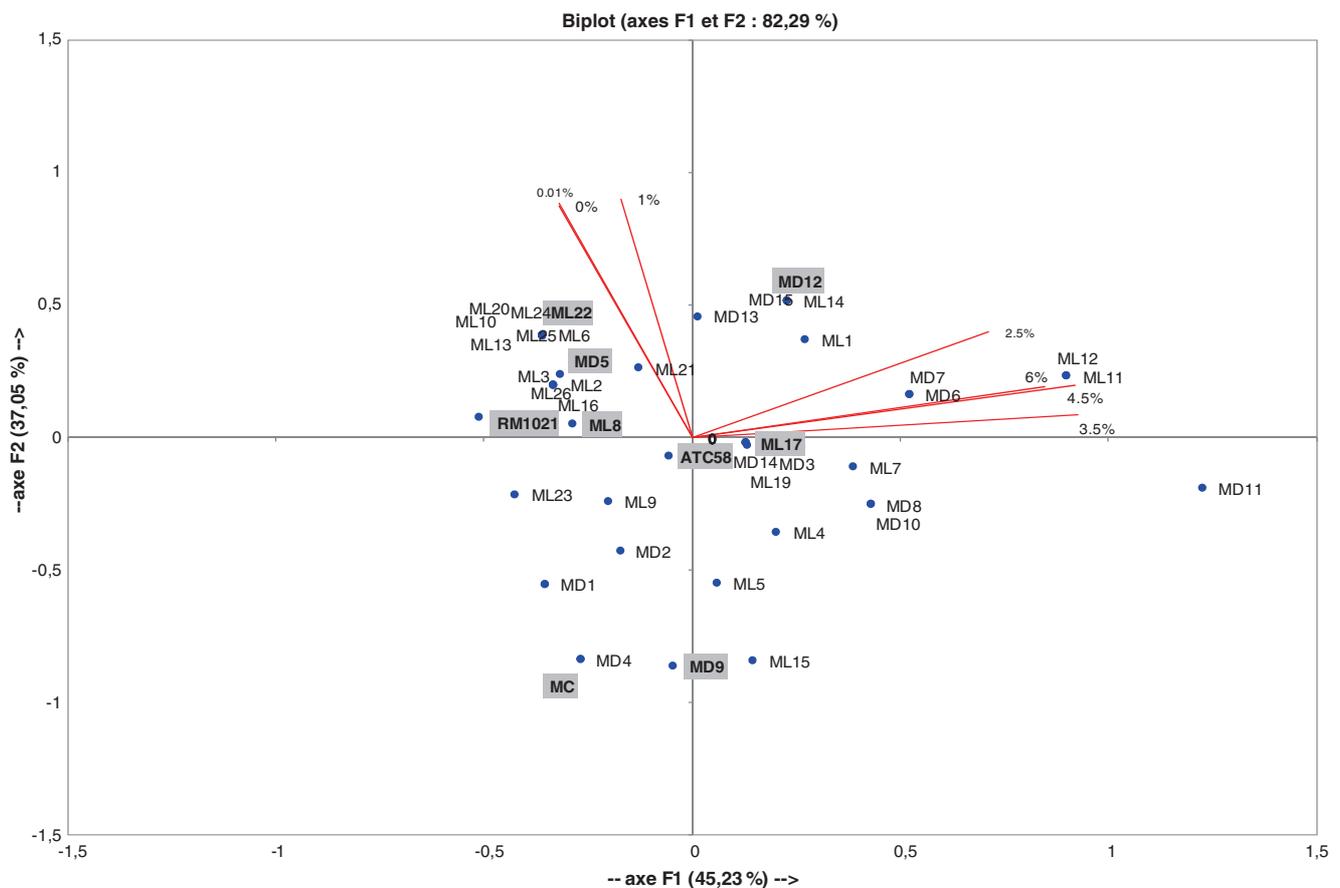


Fig. 3 PCA showing the relationship between tolerance of isolates to NaCl and their growth at 37 °C. RM1021: *E. meliloti* 1021, MC: *M. ciceri*, ATC58: *A. tumefaciens*. In grey isolates 16S rRNA sequenced and references strains

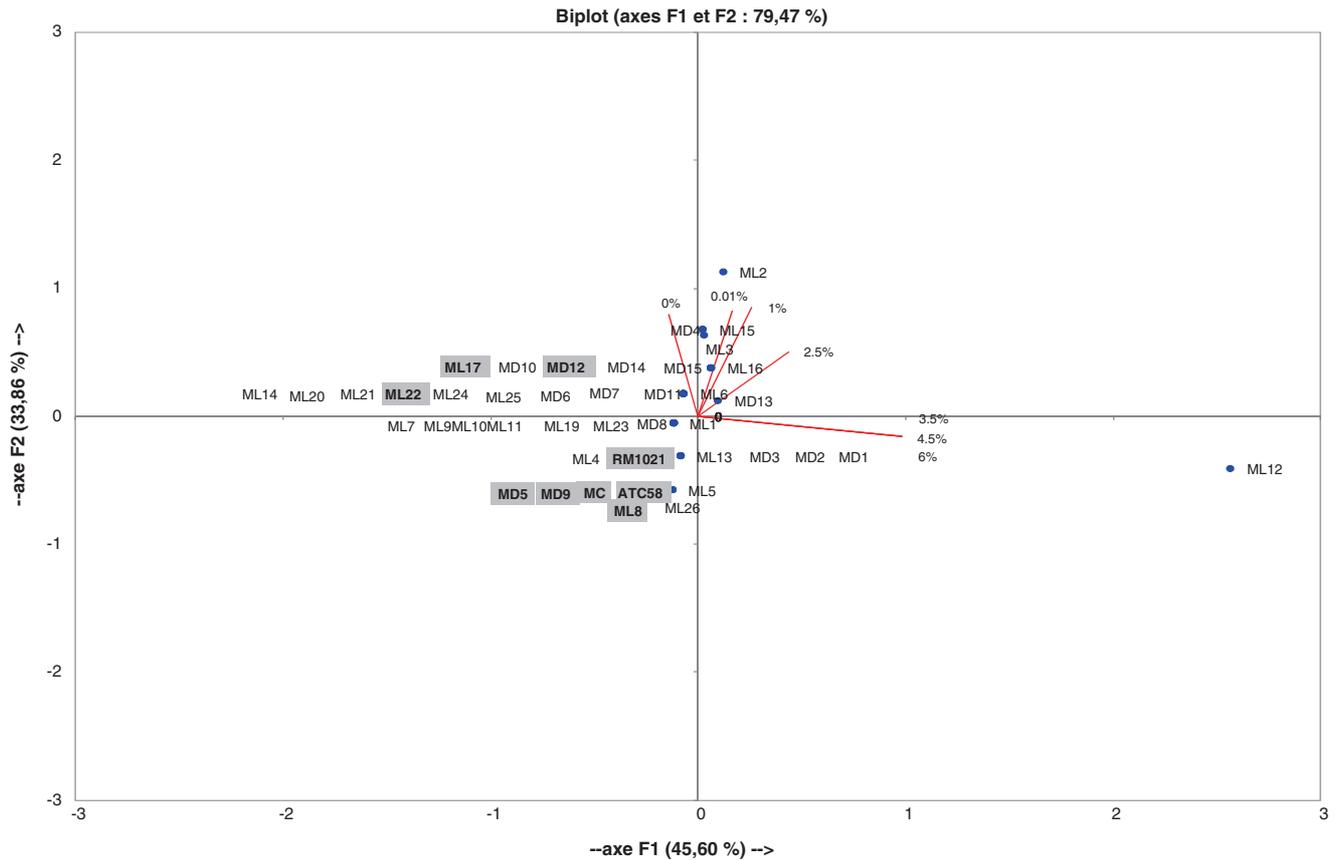


Fig. 5 PCA showing the relationship between tolerance of isolates to NaCl and their growth at 45 °C. RM1021: *E. meliloti* 1021, MC: *M. ciceri*, ATC58: *A. tumefaciens*. In grey isolates 16S rRNA sequenced and references strains

3.2.6 Test of 3-ketolactose

The 3-ketolactose enzyme activity distinguishes between *Agrobacterium* species and other rhizobial strains. We did not observe any 3-ketolactose enzyme activity in any of the isolates tested and concluded that the MD and ML isolates do not belong to the *Agrobacterium* group.

3.2.7 Carbohydrates assimilation

Fifteen isolates, nine ML and six MD, and *E. meliloti* 1021, *M. ciceri* and *A. tumefaciens* C58 were selected for phenotypic characterization by API20NE and API50CH tests. A total of 49 substrates were tested for the study of the carbohydrate metabolism. The analysis of phenotypic characters is presented as a dendrogram of dissimilarity in Fig. 8 which shows that the isolates comprise four groups. Group 1 includes ML1, MD3 and MD4; group 2 includes ML3, ML5, ML8, MD9 and MD12; group 3 includes ML17 and ML22 and the group 4 includes ML4, ML7 and MD13. The reference strains *E. meliloti* 1021, *M. ciceri*, *A. tumefaciens* C58 as well as the isolate ML12 constitute a single group and were used to confirm the phenotypic characterization.

3.3 Phylogenetic analysis of partial 16S rRNA genes

Based on the physiological characters and results of symbiotic effectiveness tests, six isolates (MD05, MD09 and MD12 from *Medicago littoralis*, ML08, ML17 and ML22 from *Melilotus indicus*) were selected for further genotypic characterization (Table 1). Genomic DNA extract were amplified by PCR using universal primers fD1 and rD1 and the amplicons obtained were sequenced. The sequences were BLAST analyzed and the results showed clearly that our isolates belong to the *Ensifer* group with 99 % identity (Table 2). The phylogenetic tree built from 16S rRNA genes sequences (Fig. 9) showed that all the six isolates were clustered with the *Ensifer meliloti* type strain and neighbor species.

4 Discussion

Legume species, within the genera *Medicago* and *Melilotus*, are important as foliage and as a source of green manure, they are naturally distributed or cultivated in many regions of the world within arid regions (Yan et al. 2000; Chouaki et al. 2006; Bruning and Rozema 2012; Palma et al. 2013). Wild legumes

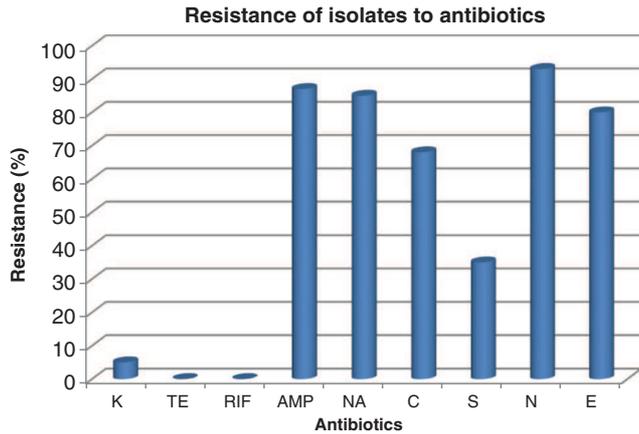
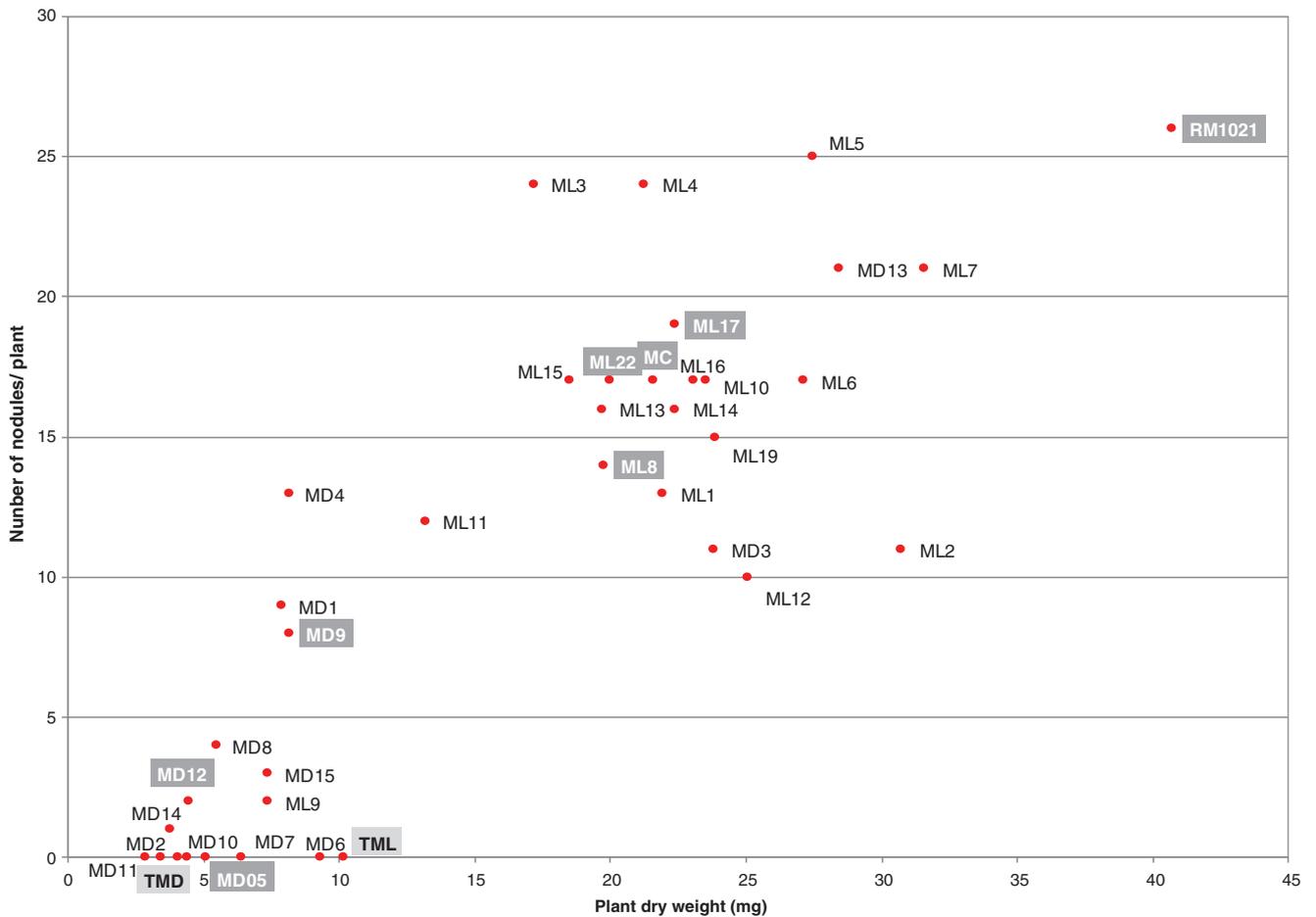


Fig. 6 The antibiotic resistance of isolates, *K* kanamycin, *TE* tetracycline, *RIF* rifampicin, *AMP* ampicillin, *NA* nalidixic acid, *C* chloramphenicol, *S* streptomycin, *N* neomycin, *E* erythromycin

often have a higher nitrogen fixing activity and are more tolerant to stress conditions than crop legumes. They are also better able to establish symbiotic relationships (Zahran 2001; Serraj et al. 2004; Bruning and Rozema 2012; Palma et al. 2013).

Our objective was to characterize the nitrogen fixing bacteria associated with two wild legumes *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All., collected in the arid regions in Algeria, for which there are few data in the literature. We studied 40 isolates from saline soils of Touggourt oases in the Algerian Sahara. All our rhizobia strains isolated from *Medicago* nodules, and most from *Melilotus* nodules had typical colony and growth characteristics, when grown on standard YEMA medium (Somasegaran and Hoben 1985). Rhizobia generally do not absorb Congo red dye when plates are incubated in the dark. The fast-growing rhizobia that nodulated *Medicago* and *Melilotus* also showed the usual acidification of the culture medium. (Somasegaran and Hoben 1985; Shetta et al. 2011).

In arid regions, high soil temperature affects both the free-living and symbiotic rhizobia (Zahran 1999). For most of rhizobia, the optimum temperature range for growth is 28 to 31 °C. Many are unable to grow at 38 °C (Zahran 2001; Priefer et al. 2001; Cacciari et al. 2003; Thami-Alami et al. 2010; Shetta et al. 2011). In the present study 98 % of our isolates were able to grow at 45 °C. These strains were isolated



from a hot arid region which suggests that temperature tolerance is correlated with the isolation site. Indeed, Rejii et al. (2014) identified *Ensifer* species from wild lotus nodules in arid Tunisian soil that were able to grow between 35° and 42 °C.

Salinity is a serious threat to agriculture in arid and semi-arid regions (Le Houérou 1975; Djennane 1990; Zahran 2001; Palma et al. 2013). Nearly 40 % of the world’s land surface can be categorized as having potential salinity problems, most of these areas are confined to the tropics and Mediterranean region (Toutain 1974; Le Houérou 1975; Djennane 1990; Zahran 1997; Koull et al. 2013). Successful rhizobia-legumes symbiosis under salt stress requires the selection of salt tolerant rhizobia. It has been found that fast-growing strains are more tolerant than slow-growing rhizobia (Zahran 1999; Cacciari et al. 2003; Thami-Alami et al. 2010). Our results showed a strong relationship between the tolerance (*in vitro*) of isolates to salt and high temperature conditions which was clearly confirmed by the PCA study. Most of our strains appear to be tolerant to more than 2 % NaCl, the highest level of tolerance reported for most strains by Priefer et al. (2001); Maâtallah et al. (2002); Cacciari et al. (2003); Mnasri et al. (2007a) and Rejii et al. (2014). This may be different from the level of tolerance exhibited in nature when plants are irrigated by water

with increased salt levels, (Djennane 1990; Tabouche and Achour 2004; Koull et al. 2013). Rhizobia associated with *Medicago* and *Melilotus* are usually able to grow in presence of more than 2 % NaCl (Rome et al. 1996; Yan et al. 2000; Thami-Alami et al. 2010; Djedidi et al. 2011). However, the *in vitro* tolerance of rhizobial strains to NaCl in pure culture was not correlated with the salinity of the soils from which they were isolated (Boukhatem et al. 2012). There was also no correlation between laboratory assays and isolation conditions. This could be due to the fact that rhizobia are located in microniches at the rhizospheric level and are inside nodules, and thus are protected.

Analysis of the combination between temperature and salt stress results showed that only one isolate, ML12, survived at both of 45 °C and more than 3 % of NaCl. This may reflect the fact that oases have a distinctly different temperature and humidity from the arid hot surrounding areas. Djedidi et al. (2011) found that the frequency of resistance to both stresses is low among isolates. With respect to water stress, we found that all of the ML and MD isolates were drought-tolerant. Amrani et al. (2010) reported the good correlation between salt and drought stress, and that halotolerant strains were also tolerant to PEG, suggesting common osmo-adaptation mechanisms.

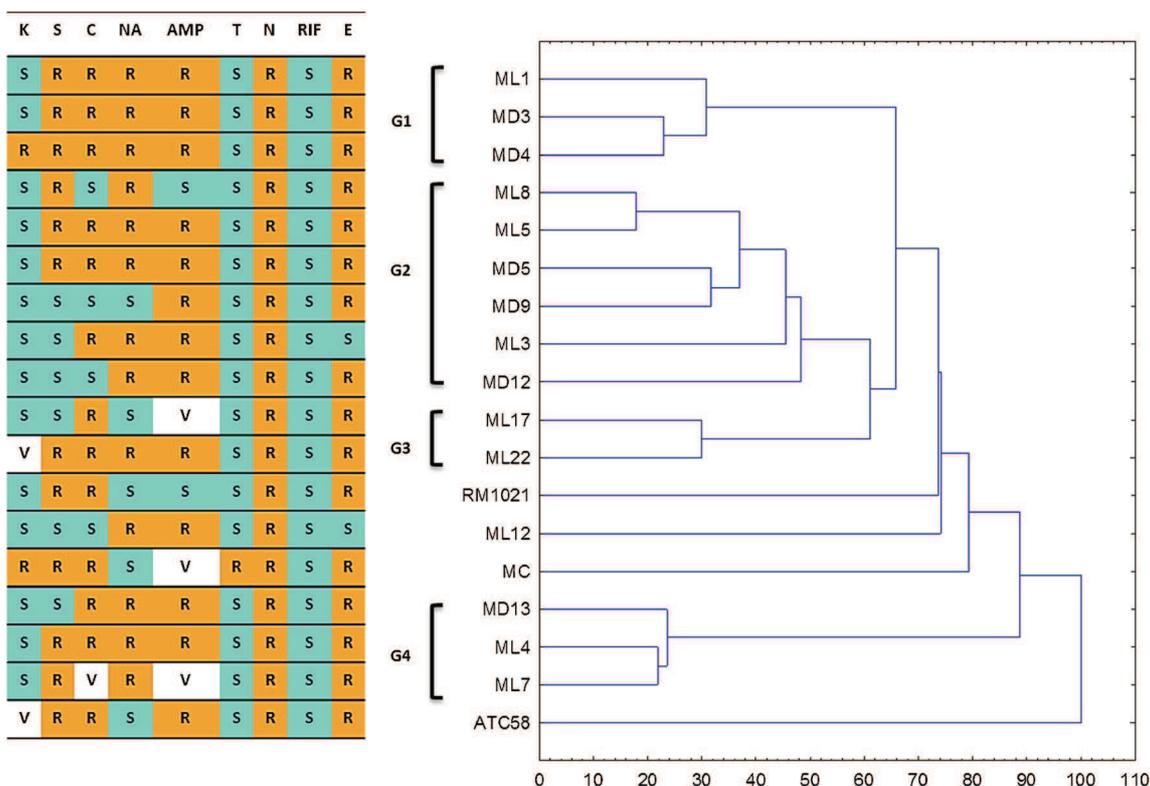


Fig. 8 UPGMA dendrogram of phenotypic characters of MD and ML root-nodulating isolates and their resistance/sensitivity profile to antibiotics: K Kanamycin, TE tetracycline, RIF rifampicin, AMP

ampicillin, NA nalidixic acid, C chloramphenicol, S streptomycin, N neomycin, E erythromycin, S sensitive, R resistant, V variable

Table 1 The origin of the strains with respect to plants and accession numbers

Strains	Original host plant	Sequence length (bp)	GenBank Accession number
ML08	<i>Melilotus indicus</i>	1042	KR476464
ML17	<i>Melilotus indicus</i>	1386	KR476465
ML22	<i>Melilotus indicus</i>	1398	KR476466
MD05	<i>Medicago littoralis</i>	1391	KR476467
MD09	<i>Medicago littoralis</i>	1391	KR476468
MD12	<i>Medicago littoralis</i>	1404	KR476469

In the present study, ML and MD isolates were tolerant of pH and grew on media ranging from 4.5 to 9. This agrees with Thami-Alami et al. (2010) who reported that some fast-growing *E. meliloti* strains, isolated from semi-arid soils of Morocco were able to grow normally at pH 3.5. Low pH appears to be a major factor limiting survival and activity of microorganisms in soils (Maâtallah et al. 2002; Shetta et al. 2011). Fast-growing rhizobia strains are generally considered to be less tolerant to acidic pH than the slow growing strains (Yan et al. 2000; Priefer et al. 2001) although there are some exceptions (Zahran 1999). In addition, Somasegaran and Hoben (1985) reported that fast-growing rhizobia could metabolize a wider range of carbon substrates than slow-growing strains. Carbohydrate utilization assays indicated that our isolates are able to use 44 of 49 carbohydrate sources tested, and may be able to produce important enzymes. The utilization of L-glutamine was a characteristic that can distinguish between strains of *Rhizobium* and *Ensifer* (Hartmann et al. 2006; Shetta et al. 2011).

Fast-growing rhizobia are more sensitive to antibiotics (Jordan 1984). In the present study, ML and MD isolates which are fast-growers and showed sensitivity tetracycline and rifampicin. However, they showed a high resistance to chloramphenicol, nalidixic acid, ampicillin, neomycin and erythromycin. Bromfield et al. (2010) report that *E. meliloti* strains are susceptible to about 5 µg of kanamycin and tetracycline, but could resist more than 50 µg of erythromycin and 20 µg of nalidixic acid. Elbouthiri et al. (2010) noted that *E. meliloti* and *E. medicae* from Morocco soils were resistance to chloramphenicol (up than 25 µg/l).

ML and MD isolates were able to infect their host plant and to fix atmospheric nitrogen, but we observed that the number of nodules formed by our strains are relatively low than *Ensifer meliloti* 1021, *Mesorhizobium ciceri*. Zahran (2001) suggested that rhizobia strains surviving under heat stress may lose their infectivity, due to plasmid curing or to alterations in cellular polysaccharides necessary for infection. High soil temperature (35–40 °C) usually results in the formation of ineffective nodules. Jebara et al. (2001) reported that plant growth and symbiotic efficiency in sand culture, were 5 to 8 time lower than that in hydro-aeroponic culture. The establishment and activity of legumes-rhizobia symbiosis *in natura* is particularly sensitive to environmental constraints (Zahran 1999, 2001; Drevon et al. 2004; Serraj et al. 2004; Bruning and Rozema 2012; Palma et al. 2013).

Remarkably, *E. meliloti* isolates showed a broader host-range among wild legumes species and we found that *Melilotus indicus* represent one of the best host traps to isolate rhizobial strains which display high abiotic stress resistance in oases soils. The osmotolerance, fast growth and nitrogen fixation efficiency suggests that ML and MD isolates may be good candidates as biofertilizers and provide promising strains for developing inoculants.

Analysis of 16S rDNA sequences is widely used to define the taxonomic position and trace the evolutionary history of nodule bacteria (Shamseldin et al. 2013; Gnat et al. 2014). In order to clarify the taxonomic status and the phylogenetic relationship of *M. littoralis* and *M. indicus* nodules isolates and other rhizobia, PCR amplification and sequencing of nearly full-length 16S rRNA gene (about 1400 bp) of six

Table 2 The Sequence analysis of partial 16S rRNA gene of six isolates from nodules of *Medicago* and *Melilotus* plants

Isolates	BLAST best match (n.r. database)	Identity (%)	GenBank Accession number	BLAST best match (16SrRNA database)	Identity (%)	GenBank Accession number
ML08	<i>Ensifer</i> sp. LILM4H41	99	DQ394805.2	<i>Ensifer meliloti</i> strain 1021	99	NR_074279.1
ML17	<i>Ensifer</i> sp. LILM4H41	99	DQ394805.2			
ML22	<i>Ensifer</i> sp. LILM4H41	99	DQ394805.2			
MD05	<i>Ensifer</i> sp. XJ22DR2	99	AB773226.1			
MD09	<i>Ensifer meliloti</i> strain W44	99	JF730142.1			
MD12	<i>Ensifer</i> sp. LILM4H41	99	DQ394805.2			

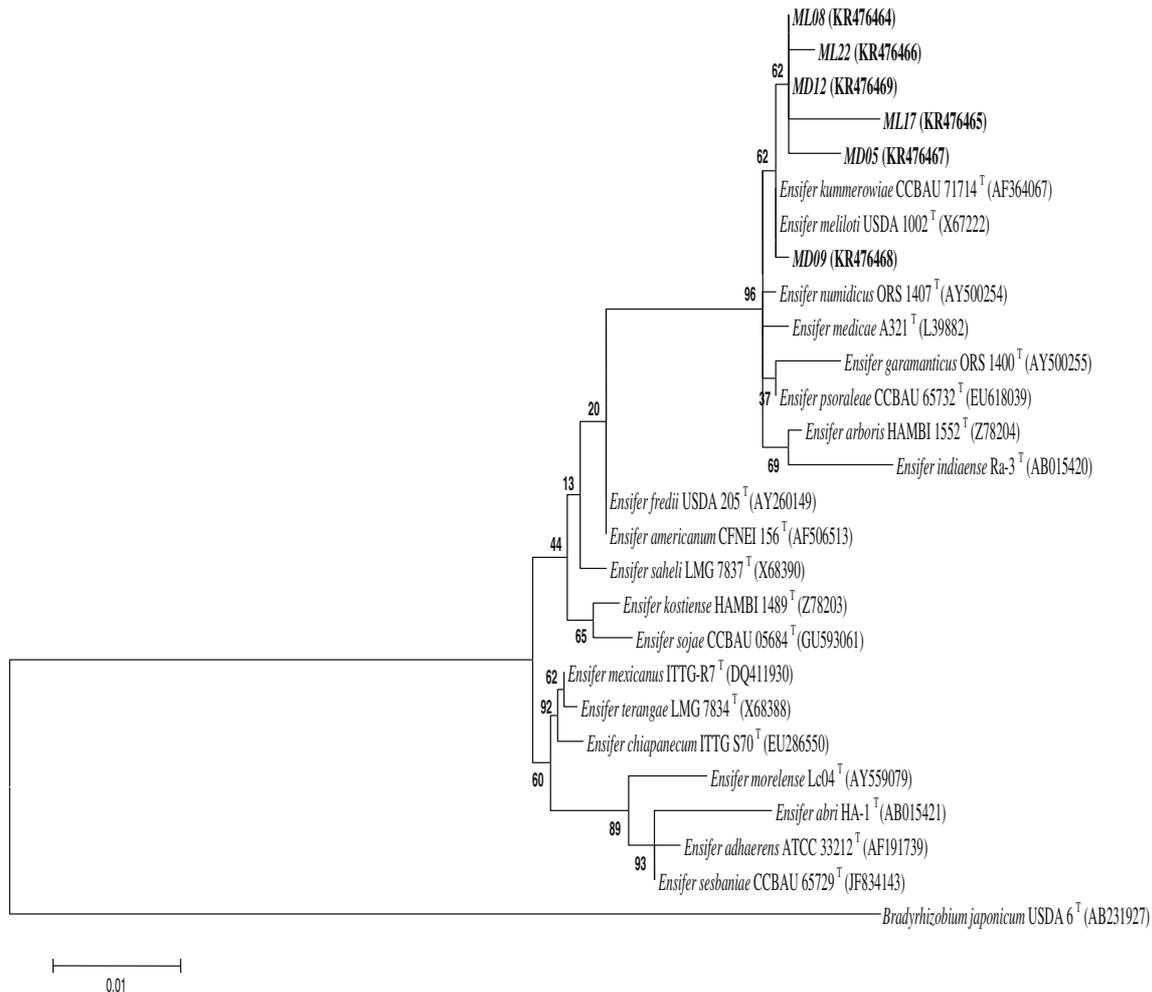


Fig. 9 The maximum likelihood phylogenetic tree showing the relationships of the 16S rRNA gene sequences of ML07, ML08, ML22, MD05, MD09 and other species of rhizobia

symbionts were performed. The comparative 16S rRNA gene sequence analysis of *M. littoralis* and *M. indicus* nodule isolates indicate that they are grouped on the phylogram into a separate cluster with known *E. meliloti* strains with more than 95 % of similarity. The type strains *E. meliloti* USDA 1002 and *E. kummerowiae* were localized on the phylogram between our strains suggesting that they belong to one of this species. The preliminary results the blast shows clearly that our isolates belong to the *Ensifer meliloti* but they could also be a new species. More research is needed to confirm this result. Our strains clustered near to the *Ensifer* strains that have been isolated from neighboring regions with similar environments, e.g. *E. numidicus* ORS 1407 and *E. garamanticus* ORS 1400, which were isolated from Tunisian soil (Merabet et al. 2010). Rome et al. (1996); Yan et al. (2000); Zahran (2001); Zribi et al. (2004); Badri et al. (2007). It appears that the majority of wild legumes are nodulated by strains belonging to *Ensifer* and *Rhizobium* genus and few by *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium* (Thami-Alami et al. 2010; Rejii et al.

2014). The wild legumes particularly *Medicago* and *Melilotus*, show a great variation in nodulation and nitrogen fixation ability in relation to location (Zahran 2001).

In conclusion, we showed that *Melilotus indicus* and *Medicago littoralis* nodule bacteria, from the oases of Touggourt, were grouped within the *Ensifer meliloti* cluster. Our study provides the basis for further research on the phylogeny of rhizobial strains nodulating wild legumes in Sahara oases of Algeria and we suggest that these strains could be used as inoculants to improve plant growth and nitrogen fixation in arid lands. These strains may represent new genospecies that need further characterization to assess their taxonomical status.

References

- Abdelguerfi A, Ait Ouada M, Kies N, Si Ziani Y (1996) From autoecology to variability of medics in Algeria: synthesis trial of

- works realized at the National Agronomic Institute - El Harrach. Options Méditerranée Sér A Méditerranée Semin 18:39–52
- Abdel-Salam MS, Ibrahim SA, Abd-El-Halim MM, Badawy FM, Abo-Aba SEM (2010) phenotypic characterization of indigenous Egyptian Rhizobial strains for abiotic stresses performance. J Am Sci 6(9):498–501
- Amrani S, Nazhat-Ezzaman N, Tej Bhatnagar T, Argandoña M, Nieto JJ, Vargas C (2010) Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. In nurseries from Algeria. Syst Appl Microbiol 33:44–51
- Badri Y, Zribi K, Badri M, Huguet T, van Berkum P, Aouani ME (2007) Comparison of rhizobia that nodulate *Medicago laciniata* and *Medicago truncatula* present in a single Tunisian arid soil. Can J Microbiol 53:277–283
- Boukhatem ZF, Domergue O, Bekki A, Chahinez Merabet C, Sekkour S, Bouazza F, Duponnois R, de Lajudie P, Galiana A (2012) Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. FEMS Microbiol Ecol:1–14
- Bouzar H, Jones JB, Bishop AL (1995) Simple Cultural Tests for Identification of *Agrobacterium* Biovars: Methods in Molecular Biology. In: Gartland KMA, Davey Humana Totowa MR (eds) *Agrobacterium* Protocols, vol 44. Inc Press, NJ, pp 9–13
- Bromfield ESP, Tambong JT, Cloutier S, Prévost D, Laguerre G, van Berkum P, Tran-Thi TV, Assabgui R, Barran LR (2010) *Ensifer*, *Phyllobacterium* and *Rhizobium* species occupy nodules of *Medicago sativa* (alfalfa) and *Melilotus alba* (sweet clover) grown at a Canadian site without a history of cultivation. Microbiology 156:505–520
- Bruning B, Rozema J (2012) Symbiotic nitrogen fixation in legumes: perspectives for saline agriculture. Environ Exp Bot 258:1–10
- Cacciari I, Di Mattia E, Quatrini P, Moscatelli MC, Grego S, Lippi D, De Paolis MR (2003) Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress. In: Grouzis M, Le Floch E (eds) Un arbre au désert, *Acacia raddiana*. IRD, Paris, pp 183–200
- Chaabena A, Abdelguerfi A (2007) Aperçu sur les cultures fourragères au sahara septentrional est. Annu Fac Sci Sci Ingé 1(2):13–20
- Chaabena A, Laouar M, Guediri O, Benmoussa A, Abdelguerfi A (2011) Quelques populations sahariennes de luzerne pérenne (*Medicago sativa* L.) face à un stress hydrique. Rev Bio Res 1(2):36–48
- Chafi MH, Bensoltane A (2009) *Vicia faba* (L), a source of organic and biological manure for the Algerian arid regions. World J Agric Sci 5(6):698–706
- Chouaki S, Bessedik F, Chebouti A, Maamri F, Oumata S, Khaldoun S, Hamana M-F, Douzene M, Bellah F, Kheldoun A (2006) Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques. Institut national de la recherche agronomique d'Algérie (INRA) et l'Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), pp 9–10
- Djedidi S, Yokoyama T, Ohkama-Ohtsu N, Chandra-Prasad-Risal C, Abdelly C, Hitoshi-Sekimoto H (2011) Stress tolerance and symbiotic and phylogenetic features of root nodule bacteria associated with *Medicago* species in different bioclimatic regions of Tunisia. Microbes Environ 26(1):36–45. doi:10.1264/jsme2.ME10138
- Djennane A (1990) Les systèmes agricoles oasiens: constat de situation des zones sud des oasis algériennes. Options Méditerranée Sér A Méditerranée Semin 11:29–32
- Drevon JJ, Abdelly C, Amarger N, Aouani EA, Aurag J, Jebara M, Gherbi H, Liuch C, Payre H, Schump O, Sifi B, Trabelsi M (2004) FABAMED interdisciplinary strategy to improve symbiotic nitrogen fixation of legumes in the Mediterranean basin. In: Serraj R (ed) Symbiotic nitrogen fixation prospects for enhanced application in tropical agriculture. Oxford and IBH Publishing, New Delhi, pp 223–232
- Elbanna K, Elbadry M, Gamal-Eldin H (2009) Genotypic and phenotypic characterization of rhizobia that nodulate snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Egyptian soils. Syst Appl Microbiol 32(7):522–530
- Elboutahiri N, Thami-Alami I, Udupa SM (2010) Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. BMC Microbiol 10(15):1–13
- Ferry M, Toutain M (1990) Concurrence et complémentarité des espèces végétales dans les oasis. Options Méditerranée Sér A Méditerranée Semin 11: 261–270
- Fitouri Dhane S, Ben Jeddi F, Zribi K, Rezgui S, Mhamdi R (2012) Effet de l'inoculation par une souche osmotolerante de *Rhizobium sullae* sur la croissance et la production en protéine du sulla (*Sulla coronarium* L.) sous déficit hydrique. J Appl Biosci 51:3642–3651
- Gnat S, Wójcik M, Wdowiak-Wróbel S, Kalita M, Ptaszyńska A, Małek W (2014) Phenotypic characterization of *Astragalus glycyphyllos* symbionts and their phylogeny based on the 16S rDNA sequences and RFLP of 16S rRNA gene. Antonie Van Leeuwenhoek 105: 1033–1048. doi:10.1007/s10482-014-0163-y
- Hartmann AM, Rodriguez-Navarro DN, Temprano Vera F, Cleyet-Marel J-C, Priny G, Fernández-López M, Toro N, Moëne-Loccoz Y (2006) Nodulating Symbiotic Bacteria and Soil Quality. In: Bloem J, Hopkins D W, Benedetti A (eds) Microbiological methods for assessing soil quality. pp 231–234
- Janati A (1990) Les cultures fourragères dans les oasis. Options Méditerranée A1:165–167
- Jebara M, Drevon JJ, Aouani ME (2001) Effects of hydroponic culture system and NaCl on interactions between common bean lines and native rhizobia from Tunisian soils. Agronomy 21:601–605
- Jordan DC (1984) *Rhizobiaceae*. In: Krieg N R, Holt J G (Eds) *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. The Williams and Wilkins Baltimore, pp 234–242
- Kerstens K, Hinz KH, Hertle A, Segers P, Lievens A, Siegmann O, De Ley J (1984) *Bordetella avium* sp. Nov., Isolated from the respiratory tracts of Turkeys and other birds. Int J Syst Bacteriol 34(1):56–70
- Koull K, Kherraze MH, Lakhdari K, Benzaoui T, Helimi S, Laouissat MS, Kherfi Y, Bougafla A, Mimouni F, Lakhdari K, Mezrag M, Benazzouz MT (2013) Eaux d'irrigation et salinisation des sols des périmètres irrigués dans la vallée de l'oued righ. J Alg Rég Arid 12:97–102
- Le Houérou HN (1975) Problèmes et potentialités des terres arides de l'Afrique du Nord. Options Méditerranée Sér A Méditerranée Semin 26:17–32
- Maâtallah J, Berraho EB, Muñoz S, Sanjuan J, Lluch C (2002) Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. J Appl Microbiol 93:531–540
- Merabet C, Martens M, Mahdhi M, Zakhia F, Sy A, Le Roux C, Domergue O, Coopman R, Bekki A, Mars M, Willems A, de Lajudie P (2010) Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 60:664–674
- Messar EM (1996) Le secteur phœnicicole algérien. Options méditerranéennes CIHEM and Estación Phoenix, 24
- Mnasri B, Aouani ME, Mhamdi R (2007a) Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. Soil Biol Biochem 39:1744–1750
- Mnasri B, Mrabet M, Laguerre G, Aouani ME, Mhamdi R (2007b) Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. mediterraneense) of *Sinorhizobium meliloti*. Arch Microbiol 187(1):79–85. doi:10.1007/s00203-006-0173-x
- Murugesan S, Manoharan C, Vijayakumar R, Panneerselvam A (2010) Isolation and characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the

- root nodules of some leguminous plants. *Int J Microbiol Res* 1(3): 92–96
- Palma F, Tejera NA, Lluch C (2013) Nodule carbohydrate metabolism and polyols involvement in the response of *Medicago Sativa* to salt stress. *Environ Exp Bot* 85:43–49
- Priefer UB, Aurag J, Boesten B, Bouhmouch I, Defezzy R, Filali-Mltouf A, Miklis M, Moawad H, Mouhsin B, Prell J, Schlüter A, Senatore B (2001) Characterization of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. *J Biotechnol* 91:223–236
- Rejji M, Mahdhi M, Domínguez-Núñez JA, Mars M (2014) the phenotypic, phylogenetic and symbiotic characterization of rhizobia nodulating *Lotus* sp. in Tunisian arid soils. *Ann Microbiol* 64: 355–362. doi:10.1007/s13213-013-0670-5
- Riou C (1990) Bioclimatologie des oasis. *Options Méditerran Sér A Mediterr Semin* 11:207–208
- Rome S, Fernandez MP, Brunel B, Normand P, Cleyet-Marel J-C (1996) *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int J Syst Bacteriol* 46(4):972–980
- Serraj R, Adu-Gyamfi J, Rupela O P, Drevon J J (2004) Symbiotic Nitrogen Fixation: Prospects for Enhanced Application in Tropical Agriculture. In: Serraj R (ed) *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*. Oxford and IBH Publishing, pp 67–97
- Shamseldin A, Moawad H, Abd El-Rahim WM, Sadowsky MJ (2013) Near-full length sequencing of 16S rDNA and RFLP indicates that *Rhizobium etli* is the dominant species nodulating Egyptian winter Berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.). *Syst Appl Microbiol*. doi:10.1016/j.syapm.2013.08.002
- Shetta ND, Al-Shaharani TS, Abdel-Aal M (2011) Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. *Am J Agric Environ Sci* 10(3): 410–418
- Somasegaran P, Hoben HG (1985) *Methods in Legume Rhizobium Technology*. United States Agency for International Development (USAID), pp 69–70
- Tabouche N, Achour S (2004) Etude de la qualité des eaux souterraines de la région orientale du Sahara septentrional algérien. *Larhyss J* 03: 99–113
- Thami-Alami I, Elbouthahiri N, Udupa SM (2010) Variability in natural population of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. *Options Méditerran Sér A Mediterr Semin* 92:265–269
- Toutain G (1974) Conservation des sols en palmeraies sahariennes et bordières au Sahara. *Options Méditerran Sér A Mediterr Semin* 25: 65–69
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703
- Yan AM, Wang ET, Kan FL, Tan ZY, Sui XH, Reinhold-Hurek B, Chen WX (2000) *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. In arid saline soils in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1887–1891
- Zahran HH (1997) Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol Fertil Soils* 25:211–223
- Zahran HH (1999) *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(4):968–989
- Zahran HH (2001) Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J Biotechnol* 91: 143–153
- Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel J-C, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P (2004) Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst Appl Microbiol* 27:380–395
- Zhang X, Harper R, Karsist M, Lindstrom K (1991) Diversity of rhizobium bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *Int J Syst Bacteriol* 41(1):104–113
- Zribi K, Jeidi N, Mhamdi R, Aouani ME, Huguet T (2004) Diversité génétique et polymorphisme symbiotique de *Sinorhizobium meliloti* nodulant *Medicago truncatula* en sols tunisiens des régions arides. *Options Méditerran Sér A Mediterr Semin* 62:149–152