

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الجيلالي بونعامة خميس مليانة
Université Djilali Bounaama Khemis Miliana
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de : Biologie



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention d'un diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Spécialité: Microbiologie Appliquée

**Isolement et caractérisation des bactéries nodulantes le pois chiche en
vue de la production d'inoculum**

Présenté par :

Melle: Afkir Meriem

Melle: Benharket Amina

Melle: Mokaddem Imane

Soutenu le:

Devant le jury:

Présidente : Mme. Zaouadi Nesrine.

Promoteur : M. Lazali Mohamed.

Examineur : Mme. Mostefa Sari Fouzia.

MAA (U. D.B de khemis Miliana)

MCA (U.D.B DE Khemis Miliana)

MAA (U.D.B DE Khemis Miliana)

Année universitaire : 2019/2020

Remerciement

Au terme de ce modeste travail de recherche, nous remercions d'abord Dieu, le tout puissant, qui nous a donné la force et le courage pour poursuivre nos études.

Nous voudrions remercier tous ceux qui nous ont accordé leur aide et leurs encouragements.

En premier lieu, nos remerciements vont à notre encadreur Mr : Lazali Mohamed d'avoir acceptée de nous prendre en charge pour réaliser ce mémoire. Sans ses orientations et ses Suggestion les plus inestimables, ce mémoire n'aurait jamais pu voir le jour.

Mes remerciements sont aussi adressés aux membres du jury, Madame la présidente Mme : Zaouadi Nesrine et l'examineur Mme: Mostefa Sari Fouzia qui ont pris de leur temps pour lire ce manuscrit, avec leurs remarques pertinentes.

Enfin, nos remerciements vont également à toute personne acceptant de nous lire ce présent, de nous corriger et de nous conseiller.

Dédicace

*Avant de dédier ce travail je tiens à remercier Allah le tout
Puissant qui nous a permis de mener à bien ce
modeste travail*

*A mes très chers parents que j'admire, qui voulaient tout le temps
que je pousse mes études jusqu'au bout avec un soutien incontestable.*

A mes sœurs (Ghania, Soumia, Nadjet, Chaima)

*A mes amies (Hassina, Noura, Fatiha, Rania, Bochra, Meriem,
Newara, Amina) pour leur soutien et leur aide.*

Je tiens à remercier la famille Hamdani pour leur soutien morale.

A mon oncle Ahmed qui a été un 2ème père pour moi.

A mes cousines (Asma, Hafsa, Asia, Rihab)

A mes cousins (Aissa, Hamza, Mohamed, Abd El Madjide)

Imane

Dédicace

A mon très cher père

Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, Et ses encouragements. Que ce travail, soit pour vous, un faible témoignage de ma Profonde affection et tendresse.

*Qu'ALLAH le tout puissant te préserve, t'accorde
Santé, bonheur et te protège de tout mal.*

A ma très chère mère

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours.

Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Qu'ALLAH te protège et te donne la santé, le bonheur et longue vie.

A mes soeurs: Asma, Insaf, Maram

A mon frère: Yacin

A Bakhta une personne qui a une place spéciale dans mon cœur, une grande soeur, une amie Qui a été à mes côtés tous au long de cette année qui a partagé avec moi beaucoup de choses.

En particulier à mon Fiancé Yousef qui a toujours vieilli à me soutenir.

A mes amis : Imane, Amina, Soumia.

Meriem

Dédicace

Avant de dédier ce travail je tiens à remercier le tout Puissant qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail.

La prunelle de mes yeux, l'espoir de ma vie, celle qui m'a entourée de son amour et de sa tendresse, qui m'a supportée et sacrifiée et m'a aidée dans les pires moments, car tu as toujours cru en moi, à ma chère mère Que Dieu la garde, je suis que je suis maintenant ; merci maman.

A celui qui m'a toujours appris comment réfléchir avant d'agir, à celui qui m'a soutenu tout au long de ma vie scolaire, à celui qui n'a jamais épargné un effort pour mon bien, mon cher père, Que Dieu me le garde.

A ma chère sœur (fatiha), Leur soutien m'a beaucoup aidé.

A mes frères (mokhtar, belkacem, abd el hamid , mohammed islam),

A mes cousins et mes cousines spécialement Amel, mes ancêtres et mes tantes maternels et paternels.

Particulièrement ma belle trinôme : Imane et Meriem.

Aux merveilleux amis:(Souhila, Djahida, Aicha, Karima, Rabiaa, Zahra, Fatima, Hafidha, Lobna)

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail; qu'ils trouvent ici la traduction de notre gratitude et de notre reconnaissance.

Amina

Résumé

La symbiose rhizobia-légumineuses est un processus naturel, qui peut avantagée la plante par l'assimilation d'azote atmosphérique. En Algérie, le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est une légumineuse capable d'établir une interaction symbiotique avec les rhizobia. Cette interaction est très spécifique, impliquant deux genres bactéries: le *Mesorhizobium* ; qui induit des gros nodules effectifs et le *Sinorhizobium* qui donne des petits nodules non fixateur d'azote.

L'objectif de notre travail est de faire une synthèse bibliographique sur les travaux de recherches relatifs à la diversité des bactéries nodulant le pois chiche.

Mots clés: Pois chiche, symbiose, légumineuses, rhizobia, diversité.

Abstract

The symbiosis rhizobia-legumes are a natural process, which can benefit the plant by the assimilation of atmospheric nitrogen. In Algeria, chickpea (*Cicer arietinum* L) is a legume of establishing a symbiotic interaction with rhizobia. This interaction is very specific, involving two bacterial genus: *Mesorhizobium*, which induces large nodules and effective *Sinorhizobium*, which gives small nodules not fixing nitrogen. The objective of our work is to make a bibliographical synthesis on the research work relating to the diversity of bacteria nodulating chickpeas.

Key words: Chichpea, symbiosis, legumes, rhizobia, diversity.

ملخص

يعتبر التعايش بينالريزوبيوم و البقوليات ظاهرة طبيعية تزود النبتة بخاصية اكتساب الأزوت. و في الجزائر الحمص من البقوليات له القدرة على إقامة تفاعل مع الريزوبيا التكافلية وهذا التفاعل هو محدد جدا, ينطوي على اثنين من أنواع البكتيريا : الميزوريزوبيا , التي تكون في العقد الجذرية الكبيرة ر السينوريزوبيا تكون في العقد الجذرية لتثبيت النيتروجين الجوي . الهدف من عملنا هو عمل توليف بيبلوغرافي عن العمل البحثي المتعلق بتنوع البكتيريا التي تسبب الحمص.

كلمات مفتاحية: الحمص , تكافل , البقوليات, ريزوبيا, تنوع.

SOMMAIRE

Introduction	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	
1. Symbiose rhizobia-légumineuse	3
2. Macro-symbiote : Les légumineuse	3
2.1. Pois chiche (<i>Cicer arietinum</i> L.)	4
- Origine et historique	4
- Classification et taxonomie de pois chiche	4
- Types de pois chiche	5
- <i>Type Kabuli</i>	6
- <i>Type Desi</i>	6
- Production du pois chiche	6
- <i>Dans le monde</i>	6
- <i>En Algérie</i>	7
3. Micro-symbiote :Les rhizobia	8
3.1.Taxonomie des rhizobia	8
3.2. Classification des rhizobia	9
3.2.1. Classe des <i>-Proteobacteria</i>	10
- Genre <i>Rhizobium</i>	10
- Genre <i>Mesorhizobium</i>	10
- Genre <i>Ensifer</i> (formelement <i>Sinorhizobium</i>)	12
- Genre <i>Bradyrhizobium</i>	13
- Genre <i>Azorhizobium</i>	13
- Genre <i>Méthylobactérium</i>	14
- Genre <i>Devosia</i>	14
- Genre <i>Microvirga</i>	14
- Genres <i>Shinella</i> , <i>Ochrobactrum</i> , et <i>Phyllobacterium</i>	15
3.2.2. Classe des <i>-Proteobacteria</i>	16
- Genre <i>Burkholderia</i>	16
- Genre <i>Cupriavidus</i>	16
4. Diversité des rhizobia nodulant le pois chiche	16
5. La nodulation	18
5.1. Processus de nodulation	18

Sommaire

5.2. Mécanisme de la nodulation	19
- Mode d'infection	19
- Développement du nodule et maturation des bactéroïdes	19
6. Inoculation des légumineuses	20
6.1. Historique	20
6.2. Mode d'action d'un inoculum	20
6.3. Nécessité d'une inoculation	20
6.4. Sélection d'une souche de rhizobia pour la production d'inoculum	21
- Résistance à la température et tolérance au pH	21
- Résistance à la salinité	21
- Résistance aux concentrations élevées d'azote	21
- Résistance aux antibiotiques	21
6.5. Facteurs affectant la réponse à l'inoculation	21
- Profondeur du placement de l'inoculum	22
- Date de plantation	22
- Sécheresse et humidité	22
- Utilisation d'un fongicide ou d'un herbicide	22
- pH du sol	22
- Manque de phosphore	22
- Impact de la population rhizobial autochtone sur l'inoculation	23
6.6. Critères de sélection d'un inoculum	23
Références bibliographique	

Introduction

Introduction

Les légumineuses en symbiose avec les rhizobia sont une priorité pour les politiques de recherche en Algérie. En plus du rôle qu'elles jouent dans l'agriculture, l'économie et dans les balances alimentaires de nombreuses populations humaines, les légumineuses sont aussi très importantes écologiquement vu qu'elles sont responsables pour une partie substantielle de la conversion du flux global de l'azote atmosphérique en forme fixée tel que l'azote ammoniacal qui est à son tour converti en composés organiques assimilables. Parmi les légumineuses alimentaires, le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) représente un modèle intéressant pour l'étude de la fixation symbiotique de l'azote en raison de son importance économique et sa participation à l'enrichissement du sol en azote. On le retrouve principalement à l'Ouest du pays dans les wilayas de Ain Témouchent, Tlemcen, Mascara et Sidi Bel Abbès, ainsi qu'à au niveau de Skikda et Guelma.

L'association symbiotique rhizobia-pois chiche montre une spécificité de haut degré où seulement deux espèces de rhizobia (*Mesorhizobium ciceri* et *Mesorhizobium mediterraneum*) peuvent former des gros nodules effectifs (fixateurs d'azote) sur les racines du pois chiche (**Zakhia et de Lajudie, 2001**). En outre, certaines espèces du genre *Sinorhizobium* (*S. medicae* et *S. meliloti*) sont capables d'infecter le pois chiche mais en formant des petits nodules inefficaces (**Aouani et al., 2001**). Pour le bon fonctionnement de la symbiose rhizobia-pois chiche, une bonne synergie entre les deux partenaires symbiotiques et les facteurs édapho-climatiques du milieu est indispensable. Il est donc primordial d'identifier en premier lieu les rhizobia autochtones nouvellement isolés puis sélectionner ceux qui peuvent survivre et maintenir une haute performance symbiotique sous les différentes contraintes de l'environnement.

La production végétale et le rendement sont deux critères liés au potentiel de la plante, aussi les conditions environnementales peuvent également contribuer à augmenter cette production (techniques culturales, apport d'engrais, ...). Parmi les éléments qui peuvent contribuer à augmenter la production végétale et le rendement chez les légumineuses, la mise à profit de la symbiose rhizobia-légumineuse à travers l'apport d'inoculum. Cette technique consiste en l'introduction de bactéries dans le sol, pour fixer l'azote libre de l'air contenu dans le sol et éventuellement le transférer à la plante hôte, augmentant ainsi à la fois la production végétale et la teneur du sol en matière organique. Cette technique de l'utilisation d'apport d'inoculum a contribué à la mise en place d'une intense activité de production d'inoculum s'est améliorée ces dernières années. A cet effet, on note que la quantité d'inoculum à base de rhizobia produite dans le monde est de l'ordre de 2000 tonnes / année, pour une superficie d'environ 20 millions d'hectares cultivée par des légumineuses à graines et fourragères (**Herridge et al., 2002**).

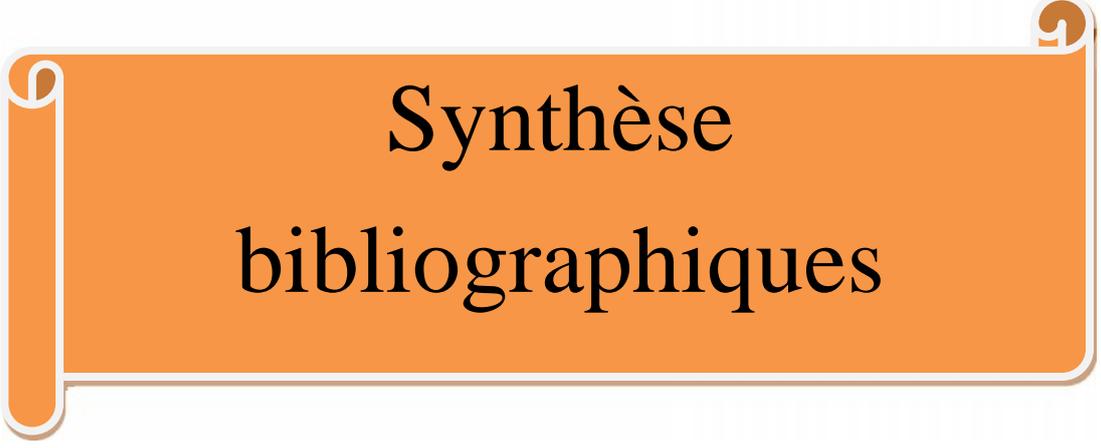
L'exploitation de la relation symbiotique légumineuse-rhizobia est devenue actuellement un champ d'investigation en terme de :

-) Souche efficiente.
-) Support de conservation.
-) Technologie de production d'inoculum.

L'une des techniques d'exploitation de la fixation symbiotique de l'azote consiste à inoculer les légumineuses avec des rhizobia efficients. Le bénéfice de cette inoculation dépend à la fois de la souche inoculée, de la plante-hôte et des conditions environnantes (**Aouani et al., 1997**).

Dans ce cadre d'étude, l'objectif de notre recherche consiste à :

- ❖ Isoler, purifier et conserver des souches de rhizobia à partir des nodosités prélevées sur des plants de pois chiche.
- ❖ Etudier l'infectivité des isolats de pois chiche.
- ❖ Caractériser les isolats d'un point de vue cultural, morphologique et physiologique.

An orange scroll graphic with a white border and decorative scroll ends on the left and right sides. The text is centered on the scroll.

Synthèse bibliographiques

1. Symbiose rhizobia-légumineuses

Dans leur environnement les organismes vivants sont en interaction permanente les uns avec les autres. Certaines de ces interactions sont stables dans le temps et ont un impact sur le déroulement de la vie de l'un ou des deux organismes impliqués. La symbiose entre la famille des légumineuses et les bactéries dites rhizobia représente un modèle de mutualisme, c'est-à-dire une interaction à bénéfices réciproques entre les partenaires. Au cours de cette interaction, le végétal fournit des composés nutritifs à la bactérie, celle-ci fixe l'azote de l'air et le fournit à son hôte (**Rave et al., 2000**). Cette symbiose, affecte donc l'agriculture en augmentant la productivité des cultures sans addition d'engrais et par conséquent réduit la pollution (**Freiberg et al., 1997**). Grâce à ce type de symbiose, une importante économie d'engrais azotés peut être réalisée. A titre d'exemple, au Brésil, l'inoculation du soja (*Glycine max* L.) aux champs fournit jusqu'à 300 kg N/ha, ce qui entraîne des économies d'engrais azotés estimées à 3 milliards de dollars (**Santos et al., 2006**).

2. Macro-symbiote : Les légumineuses

Les légumineuses, caractérisées par un fruit en forme de gousse, sont très diversifiées, elles font partie de la famille des Fabaceae (Leguminosae), de l'ordre des Fabales, de la classe des Dicotyledonae et de la sous classe des Rosidae. Les légumineuses se classent au troisième rang dans la famille des angiospermes, après les Asteraceae et les Orchidaceae (**Doyle and Luckow, 2003**). Représentées par 770 genres et près de 20 000 espèces, les légumineuses se subdivisent en six sous-familles (**Azani et al., 2017**). Les Papilionoideae représentent la sous famille la plus diversifiée, comprenant 478 genres et environ 14 000 espèces tropicales et tempérées. Les espèces tropicales (Phaseoloides), de la tribu des Phaseoleae, comprennent les genres : *Cajanus* (pois cajan), *Glycine* (soja), *Phaseolus* et *Vigna* (haricot). Les espèces tempérées (Galegoides) comprennent dans la tribu des (i) *Viciae*, les genres : *Lens* (lentille), *Vicia* (vesce), *Pisum* (pois) ; (ii) Trifolieae: *Medicago* (luzerne), *Melilotus* (mélilot), *Trifolium* (trèfle) ; (iii) Cicereae: *Cicer* (pois chiche) et (iv) Loteae : *Lotus* (lotier) (**Young et al., 2003**). Les Papilionoideae sont principalement des herbacées et plus rarement des arbres et des arbustes, particulièrement adaptées aux conditions méditerranéennes. Les Mimosoideae (77 genres et 3000 espèces) et les Caesalpinioideae (171 genres et 3000 espèces) se composent essentiellement d'arbres et d'arbustes des régions tropicales et subtropicales (**Azani et al., 2017**).

A l'exception du genre *Parasponia* de la famille des Ulmaceae, toutes les plantes aptes à établir des symbioses fixatrices d'azote avec des bactéries du sol de type rhizobia appartiennent à la superfamille des Fabaceae. La symbiose fixatrice d'azote conduit à la formation de nodosités au niveau racinaire et exceptionnellement au niveau caulinaire. C'est au sein de ces nodosités que le rhizobium,

différencié en bactéroïdes, trouve les conditions physiologiques nécessaires à la fixation d'azote atmosphérique. Lors de la symbiose rhizobia-légumineuse, la plante fournit les substrats carbonés aux bactéroïdes présents dans les nodules, en échange de sources azotées rendues assimilables par le partenaire bactérien (**Graham, 2003**).

La nodulation des légumineuses par les rhizobia est un phénomène très fréquent. En effet, parmi les 20% de légumineuses étudiées, 97% des espèces de la sous-famille des Papilionoideae (pois, haricot, fève, lentille, etc.), 90% de la sous-famille des Mimosoideae³⁴ (robinier, glycine, acacia, etc.) et 30% de la sous-famille des Caesalpinioideae (flamboyant, barbade, séné d'Alexandrie, etc.) sont nodulées (**Doyle and Luckow, 2003**).

2.1. Pois chiche (*Cicer arietinum* L.)

→ Origine et historique

Le pois-chiche (*Cicer arietinum* L.) est connu depuis la haute antiquité dans le bassin méditerranéen, dans le Sud – Est de l'Asie et en Inde. Il est classé parmi les premières légumineuses à graines domestiquées par l'homme (**Van DerMaesen, 1987**). Le pois chiche est originaire du Moyen-Orient, plus précisément du sud-est de la Turquie et de la Syrie (**Saxena, 1984**). Au cours de sa domestication, le pois chiche semble avoir connu plusieurs centres de diversification, dont le plus ancien serait le plateau Anatolien. Il s'est rapidement disséminé dans le monde pour devenir une culture importante des environnements subtropicaux et méditerranéens (**Muehlbauer et Rajesh, 2008**).

En Algérie, le pois chiche a toujours occupé la deuxième place après la fève, sa culture est située dans l'Est à Skikda, Guelma (zone littorale et sub-littorale) et Mila (plaines intérieures). Dans l'Ouest du pays, elle est cultivée principalement à Tlemcen et à Sidi Bel Abbes (**Hamadache, 2000**).

→ Classification et taxonomie de pois chiche

Le pois chiche est une plante de la famille des Fabaceae comportant plus de 700 genres et 1800 espèces (**Polhill et Raven, 1981**). Le genre *Cicer*, comptant 44 espèces (**Yadav et al., 2007**), 9 espèces annuelles et 35 espèces pérennes. Ces espèces sont divisées en 04 sections : *Monocicer*, *Chamaecicer*, *Polyciceret* *Acanthocicer* (**Valcillova et al., 2002**).

Sur le plan botanique, il est décrit comme une plante herbacée annuelle, dressée ou rampante couverte de poils glanduleux. Sa germination est du type hypogé (les cotylédons restent souterrains). Ses racines peuvent atteindre un mètre de profondeur, mais la plupart d'entre-elles se trouvent dans les premiers centimètres (**Duke, 1981**). Sa tige anguleuse à une hauteur de 0.20 à 1 mètre. Ses feuilles se composent

de 7 à 17 folioles ovales et dentées. Ces fleurs peuvent être blanches, bleues ou violettes, solitaires et pédonculées. Les gousses sont renflées avec 1 à 2 graines presque rondes. Le poids de 1000 grains varie de 200 à 600 grammes.

Selon **Crété (1965)**, la position systématique du pois chiche se présente comme suit :

Règne: Végétal

Embranchement: Phanérogames (Spermaphytes)

Sous embranchement : Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Sous classe : Dialypétales

Ordre : Légumineux (Fabales)

Famille : Légumineuses (Fabacées)

Sous famille : Papilionacées

Tribu : Viciées

Genre : *Cicer*

Espèce : *Cicer arietinum* L.

→Types de pois chiche

Deux types de pois chiche sont cultivés : Kabuli ou "macrosperma» et Desi ou "microsperma» (**Toker, 2014**) (Fig. 1). La distinction se fait sur la base de la taille et de la coloration des graines, des fleurs et des plantes. Des différences significatives existent dans l'épaisseur du tégument externe de la graine entre les types desi et kabuli. Ce dernier a une couche de graisse beaucoup plus mince (**Wood et al., 2011**).



Figure 1: Pois chiche de type Desi, à gauche, et Kabuli à droite

Type Kabuli

Il est appelé aussi Garbanzo, caractérisé par un feuillage dont la couleur varie du vert clair au vert foncé et une floraison blanchâtre. Il a un port érigé ou semi-érigé qui permet la mécanisation de la récolte. Généralement, la hauteur de la plante varie de 30 à 90 cm. En cas d'un sol fertile et profond et d'une alimentation hydrique suffisante, elle peut dépasser 1m. Les grains sont de couleur crème, couverts d'un tégument mince. Le type Kabuli se subdivise en deux sous-groupes ; le gros Kabuli dont les grains ont un diamètre de 8 à 9 mm et un poids de mille grains variant de 410 à 490 g et le petit Kabuli dont les grains sont caractérisés par une forme plus régulière, un diamètre de l'ordre de 7 mm et un poids de mille grains de 265 g environ.

Type Desi

Il est caractérisé par un feuillage dont la couleur tend du vert violacé au glauque et une floraison violacée. Il a un port retombant et un aspect touffu. Les grains sont de plus petite taille, de forme irrégulière et à surface ridée couverte d'un tégument épais de couleur foncée qui varie du marron au noir. Le poids de 1000 grains varie de 100 à 130 g. Il existe un troisième type intermédiaire appelé **Gulabi**, il a été identifié par ses grains lisses de couleur claire, ressemblent à celle du pois avec un bec (**Wery, 1986**).

→ Production du pois chiche

Dans le monde

Le pois chiche est l'une des plus importantes légumineuses à graines dans le monde, il occupe la troisième position (**FAO, 2015**). D'après l'AAC (2006), entre 1998 et 2006, le rendement moyen en graines du pois chiche est de 800 kg ha⁻¹. Le continent Asiatique est le plus important producteur de pois chiche avec un taux de 91% (**Upadhyaya et al., 2001**). Par ailleurs, les plus grands pays producteurs de cette espèce sont : l'Inde, la Turquie, le Pakistan, l'Australie, le Canada, le Mexique, l'Iran et l'Éthiopie.

Les plus grands pays exportateurs de pois chiche sont : l'Australie, le Mexique, la Turquie, le Canada, les États-Unis et l'Iran ; alors que les plus importants pays importateurs sont : l'Espagne, l'Algérie, le Bangladesh, l'Italie, l'Arabie saoudite, la Jordanie, la Tunisie et le Royaume-Uni. Le tableau 1 présente la production du pois chiche pour les plus grands producteurs dans le monde, ainsi que la production mondiale durant la période 2010-2014.

Tableau1: Production du pois chiche dans le monde

Pays	Production (Tonnes)				
	2010	2011	2012	2013	2014
Inde	7480000	8220000	7700000	8832500	9880000
Pakistan	561500	496000	291000	751000	750,000
Turquie	530634	487477	518000	506000	450,000
Australie	602000	513338	673371	813300	817,200
Myanmar	441493	473102	500000	490000	492,300
Ethiopie	322839	400208	409733	249465	458,682
Iran	267768	290243	315000	295000	275,310
Mexique	131895	72143	271894	209941	171,665
Canada	128300	90800	161400	169400	123,000
Syrie	42928	50052	55913	57500	
Monde	11064328	11750103	11613037	13102023	13623695

(FAO STAT, 2015).

En Algérie

Le pois chiche est, en Algérie, la seconde légumineuse alimentaire produite après les fèves (**MADR, 2015**). Sa culture a connu, durant la décennie 1980-90 une certaine évolution progressive sur le plan des superficies et de la consommation et une évolution régressive en terme de productivité. Les causes de la faiblesse de la productivité du pois chiche en Algérie sont souvent d'ordres agro-techniques liés aux conditions de semis (période, modes de semis, qualité de la semence) et à l'infestation par les adventices.

Le tableau 2 présente la production du pois chiche pour les 5 wilayas les plus productives ainsi que la production total en Algérie

Tableau 2: Production du pois chiche en Algérie durant la période 2010-2014.

année	Wilaya	Superficie (ha)	Production (qx)	Rendement (qx/ha)
2010	A.TEMOUCHENT	6120	58300	9.5
	TLEMCEN	5228	42000	8.0
	MASCARA	3200	30070	9.4
	SKIKDA	1048	16500	15.7
	CHLEF	1655	15985	9.7
	TOTAL ALGERIE	25525	234737	9.2
2011	A.TEMOUCHENT	6795	57575	8.5
	TLEMCEN	5319	40000	7.5
	MASCARA	2700	22530	8.3
	GUELMA	1696	19741	11.6
	S.B.ABBES	1429	16347	11.4
	TOTAL ALGERIE	27734	240512	8.7
2012	A.TEMOUCHENT	8,080	66,280	8.2
	TLEMCEN	5,620	39,100	7.0
	MASCARA	2,460	24,450	9.9
	GUELMA	2,163	23,546	10.9
	MOSTAGANEM	2,039	21,810	10.7
	TOTAL ALGERIE	30,562	276,750	9.1
2013	TLEMCEN	5,350	73,000	13.6
	A.TEMOUCHENT	6,195	66,270	10.7
	GUELMA	2,214	29,947	13.5
	MOSTAGANEM	2,340	27,291	11.7
	CHLEF	1,852	22,530	12.2
	TOTAL ALGERIE	29,320	349,802	11.9
2014	TLEMCEN	7,000	73,500	10.5
	A.TEMOUCHENT	6,490	56,526	8.7
	GUELMA	2,430	31,940	13.1
	MASCARA	2,640	31,700	12.0
	MOSTAGANEM	2,500	28,792	11.5
	TOTAL ALGERIE	33,295	351,178	10.5

(MADR, 2015).

3. Micro-symbiote : Les rhizobia

3.1. Taxonomie des rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries fixatrices d'azote qui forment des nodosités radiculaires sur les plantes légumineuses. Ce sont des bâtonnets (**Fig.2**), à Gram négatif, aérobies, non sporulés (**Jordan, 1984**). Ces symbiotes des légumineuses appartiennent à deux sous-classes phylogénétiques distinctes: les α - et β -protéobactéries. Plus de 100 espèces regroupées en 13 genres : (i) 11 appartenant à la sous-classe α -Protéobactéries et comprenant les genres: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* actuellement *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrhobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia* et *Shinella*. (ii) Deux genres appartenant à la sous-classe β -Proteobactéries,

l'ordre des *Burkholderiales* dont *Burkholderia* et *Cupriavidus* anciennement *Ralstonia* (**Velázquez et al., 2017**).

Les premières classifications des rhizobia étaient basées sur des tests d'inoculations croisées entre rhizobia et leurs plantes hôtes (**Fred et al., 1933**). Ensuite, la validité de la classification a été orientée vers la taxonomie polyphasique moderne qui a conduit à la description claire et vaste de nombreux microorganismes (**Willems et Collins, 1993**). Celle-ci fait intervenir les méthodes comparatives telles que la sérologie, le coefficient de Chargaff, l'hybridation ARN / ADN ou ADN / ADN, le séquençage de l'ADN ribosomique 16S, l'analyse des plasmides etc.... en plus des différentes analyses phénotypique et biochimique afin d'identifier des bactéries symbiotiques (**Velázquez et al., 2017**).



Figure 2 : *Rhizobium leguminosarum* sous microscope électronique

3.2. Classification des rhizobia

La classification des rhizobia subi des changements perpétuels en raison du rattachement de plusieurs nouveaux genres et espèces à ce groupe bactérien (**Wang et al., 1999**). En effet, si la classification polyphasique a permis de mettre en évidence de nombreuses espèces de rhizobia associées aussi bien aux plantes légumineuses ou non légumineuses (**Dioufetal.,2000**).

Cependant, la caractérisation génotypique de cette classification est considérée comme un obstacle pour la description de nouvelles espèces (**Coenyeet al., 2005**). D'où l'intérêt pour d'autres paramètres tels que les gènes de ménage (**Wertzet al., 2003**). Ces derniers comportant des séquences conservées, dont certaines seront ensuite utilisées par MLSA (multi locus séquence analysis pour analyse de séquence multi locus) pour construire des arbres phylogénétiques à partir desquelles la phylogénie est déterminée (**Glaeser et Kämpfer, 2015**).

3.2.1. Classe des - *Proteobacteria*

→Genre *Rhizobium*

Pendant longtemps, ce genre regroupait tous les rhizobia. Certaines espèces ont ensuite été rattachées à de nouveaux genres suite aux analyses phylogénétiques. Les membres de ce genre sont de courts bâtonnets, de 0.5 à 0.9 µm de large et de 1.2 à 3 µm de long, souvent avec une zone incolore en raison de la présence de cristaux du polymère γ -hydroxybutyrate (PHB). Ces bactéries ne forment pas d'endospores mais sont mobiles avec des flagelles polaires ou péritriches (4 à 6), aérobies, chimio-organotrophes (**de Lajudie et al., 1994**).

Au cours des dernières décennies, on a assisté à une croissance vertigineuse d'identification d'espèces affiliées à ce genre : *Rhizobium tropici*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium hainane*, *Rhizobium mongolense*, *Rhizobium undicola*, *Rhizobium huautlense*, *Rhizobium daejeonense*, et *Rhizobium lusitanum*.

Au cours d'une étude de **Garcia-Fraile et al. (2007)**, deux souches ont été isolées à partir de *Populus alba*, ayant la capacité d'hydrolyser les polysaccharides, la caractérisation de ces deux souches confirme qu'elles appartenaient à une nouvelle espèce, pour laquelle le nom de *R. cellulosityticum* sp. est proposé. Cependant, et suite à la taxonomie polyphasique quelques changements de nomenclature ont été relevés. C'est ainsi que certaines sous-espèces de *Rhizobium leguminosarum* sont actuellement rattachées à *R. trifolii* et *R. pisi* (**Ramirez-Bahena et al., 2008**).

Plusieurs études menées en Chine ont mis en évidence de nouvelles espèces (**Gu et al. 2008**) ont isolés dix-sept souches de la plante lespédéza, désormais appelé *R. miluonense* sp. Treize autres nouvelles souches identifiées comme une seule espèce ont été isolées à partir de trois différentes espèces de légumineuses des genres *Albizia*, *Kummerowia* et *Dalbergia* ; où le nom *R. mesosinicum* sp. est donné à cette nouvelle espèce (**Lin et al., 2009**). D'autre part, **Ren et al. (2011)** utilisant une approche polyphasique des analyses phylogénétiques, incluant l'analyse (RFLP-PCR), l'espaceur intergénique 16S-23S, les tests phénotypiques et physiologiques, les comparaisons de gènes et profils d'acides gras cellulaires; ont mis en évidence une nouvelle espèce isolée de nombreuses légumineuses, pour laquelle ils ont proposé le nom de *R. vigna* sp.

→Genre *Mesorhizobium*

Ce genre a été décrit pour la première fois par Jarvis et al. (1997). Plusieurs espèces de rhizobia ont été transférées à ce genre. Ce sont des bactéries mobiles par un flagelle polaire ou subpolaire, assimilant le glucose, le rhamnose et le saccharose avec production d'acides (**de Lajudie et al ; 1998**).

Ce genre comprenant les espèces à croissance intermédiaire comprend actuellement 21 espèces. Parmi les mesorhizobia, citons d'abord ceux portant anciennement la nomenclature *Rhizobium*: c'est le cas de *M. loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. mediterraneum*, *M. tianshanense*; et ceux identifiés après la description du genre: *M. tianshanense*, *M. plurifarum*, *M. amorphae*, *M. muleiense*, *M. tamadayense* et *M. qingshengii*.

La distribution subtropicale, l'origine de l'hôte, les profils PCR-RFLP des gènes de l'ARNr 16S, le profil des acides gras ont été utilisés comme caractéristiques distinctives d'un nouveau groupe de *Mesorhizobium* associé à *Albizia kalkora* qui est donc proposé comme une nouvelle espèce, *M. albiziae* sp. (Wang et al., 2007).

Plus tard, Han et al. (2008) ont caractérisé par une approche polyphasique, vingt-quatre souches de *Mesorhizobium* isolées des sols de Xinjiang en Chine, regroupées en trois clusters qui se distinguent par le polymorphisme de la longueur du fragment de restriction de l'espace inter génique (IGS-RFLP), correspondant aux espèces génomiques V, VI et VII. L'espèce génomique VII était définie comme *M. septentrionale* et les deux autres espèces sont *M. gobiense* sp. Représenté par l'espèce génomique V et *M. tarimense* sp. Représenté par l'espèce génomique VI. Une approche taxonomique polyphasique a aussi été utilisée pour caractériser 31 isolats de *Rhizobium* obtenus à partir d'*Anthyllis vulneraria* en France. Ces isolats représentaient une nouvelle espèce du genre *Mesorhizobium*, pour laquelle le nom de *M. metallidurans* sp est donné (Vidal et al., 2009).

A partir de nodules de *Caraganabicolor* et de *Caraganaerinacea*, (Lu et al., 2009) avaient isolé cinq souches qui ont été rattachés au genre *Mesorhizobium* par méthodes polyphasiques, pour lesquelles ils ont proposé le nom *M. shangrilense* sp. De même et d'une autre plante d'*Alhagi sparsifolia* (Chen et al., 2010) ont isolé et identifié onze souches pour lesquelles le nom de *M. alhagi* sp. Est donné. Par contre, ces mêmes auteurs ont proposé le nom de *M. camelthorni* sp. Pour les neuf souches isolées à partir de la même plante en 2011 en utilisant des analyses phylogénétiques. Dans une étude de Zhou et al. (2010), cinq souches rhizobiennes formant une nouvelle lignée isolées à partir de nodules de *Robinia pseudoacacia* ont été rattachées au même genre sur la base des méthodes précédemment cités qu'ils ont nommés *M. robiniae* sp. Elles se distinguent des espèces définies de *Mesorhizobium* par les profils des empreintes des séquences intergéniques répétitives des entérobactéries (ERIC). Une bactérie a même été isolée dans des sédiments prélevés des eaux océaniques, et qui représente une nouvelle espèce du genre *Mesorhizobium*, pour lequel le nom *M. sediminum* sp. nov. est proposé (Yuan et al., 2016). Récemment, une nouvelle espèce pour laquelle le nom de *M. zhangyense* sp. est désigné a été isolée à partir d'un nodule du *Thermopsis lanceolé* cultivé (Xu et al., 2018). Toutes ces nouvelles souches ont été isolées en Chine.

→ Genre *Ensifer* (formelement *Sinorhizobium*)

Le genre *Sinorhizobium* a été décrit par **Chen et al. (1988)**. Des études plus récentes ont montré que *Sinorhizobium* et le genre *Ensifer* décrit par Casida en 1982 appartenaient à un seul taxon (**Young, 2010**). Cependant, le rattachement des espèces de *Sinorhizobium* au genre *Ensifer* a fait couler beaucoup d'encre. Selon **Young (2003)**, *Ensifer* est le synonyme qui a été proposé en premier, et est donc prioritaire par rapport à *Sinorhizobium*. Alors que **Willems (2006)** a demandé qu'une commission judiciaire tranche dans cette proposition. Malgré une similitude significative entre les gènes, et qui soutient la proposition d'unifier *Ensifer* et *Sinorhizobium* dans un seul genre ; la proposition préservant les deux genres est moins pertinente. Et en prenant en considération des opinions exprimées par la Commission judiciaire, le nom du genre devrait être *Ensifer*, comme il a déjà été proposé par Young en 2003.

Un test d'analyse de séquence multilocus (MLSA) a été réalisé par **Martens et al. (2007)** sur des souches d'*Ensifer* (en plus des espèces précédemment classé dans le genre *Sinorhizobium*) par phylogénies voisines (NJ) et une vraisemblance maximum (ML) des gènes. Les résultats de cette analyse confirmèrent que le potentiel de distinction des espèces d'*Ensifer* est plus grand en utilisant la MLSA des gènes de ménage que celle des gènes ARNr 16S. La commission judiciaire proposa que toutes les espèces précédemment publiées comme *Sinorhizobium* garderaient cette nomenclature pour éviter la confusion, alors que toutes les nouvelles espèces non publiées porteraient désormais cette nomenclature en l'occurrence *Ensifer* spp. (**Young, 2010**).

Les cellules du genre *Ensifer* ont des mensurations similaires à celles de *Rhizobium*, mobiles par des flagelles polaires ou péritriches. La croissance optimale de ce genre est comprise entre 25-30°C (à 10-35 °C), un pH de 6 à 8 mais tolère des pH allant de 5 à 10.5, et une concentration de 10 g / l de NaCl (**Young, 2010**). Le genre comprend actuellement 17 espèces. Parmi ces espèces certaines sont identifiées comme : *E. fredii*, *E. xingianense*, *E. sahelense*, *E. kostiense* et *E. arboris*, *E. kummerowiae*, *E. americanum*, et *E. medicae*. Une autre lignée d'*Ensifer* nodulant la légumineuse américaine *Acacia angustissima* au Mexique à laquelle le nom d'*Ensifer mexicanus* sp. a été attribué. En utilisant des tests phénotypiques, l'analyse phylogénétique, et l'hybridation ADN-ADN, il est apparu que cette lignée est apparentée à l'*Ensifer teranga* d'origine Africaine (**Lloret et al., 2007**).

Merabet et al. (2010) ont analysé six isolats précédemment isolés de Tunisie par (**Zakhia et al. 2004**) à partir d'*Argyrolobium uniflorum*, du *Lotus creticus* et de *Medicago sativa* ; et trois qu'ils ont isolés du *Lotus arabicus* (Sénégal). En plus de l'ARN r 16S, les isolats ont été analysés par MLSA des cinq gènes de ménage (*rec A*, *at D*, *gln A*, *glt A* et *thr C*), le gène *nod A* et aussi par des tests auxano-graphiques utilisant la galerie API 100. Ces deux derniers permettraient la détermination du biovar. Ces analyses ont démontré que ces souches constituaient trois groupes A, B et C, tous appartenant au genre *Ensifer*, où les

espèces des groupes A et C représentaient deux nouvelles espèces du genre en l'occurrence *Ensifer numidicus* sp. nov et *Ensifer garamanticus* sp. nov. ; alors que les espèces du groupe B appartiennent à *Ensifer adhaerens*. L'analyse génomique effectuée sur les souches bactériennes isolés des légumineuses des zones arides et chaudes d'Asie'(Inde), d'Afrique (Maroc) et d'Amérique (Mexique) appartiennent à une nouvelle espèce dont le nom *Ensifer aridi* est proposé (**Quéré et al., 2017**).

→Genre *Bradyrhizobium*

Le genre *Bradyrhizobium* a été décrit par Jordan en 1982 pour inclure tous les Rhizobia à croissance lente. Ce sont des bactéries avec un seul flagelle polaire ou subpolaire. Ces bactéries symbiotiques utilisent de nombreux sucres et acides organiques mais préfèrent les pentoses avec production de mucus polysaccharidique. Il comprend actuellement 9 espèces. Ce genre a pendant longtemps inclus une seule espèce: *Bradyrhizobium japonicum* regroupant toutes les souches nodulant le soja *Glycine max*. De nombreuses souches isolées de nodules de soja ont été proposés comme *Bradyrhizobium* : (i) *B. elkanii*, (ii) les espèces de *B. liaoningense* et (iii) *B. huanghuaihaiense* a été définie comme une nouvelle espèce pour regrouper les souches rhizobiennes isolées des nodules de *Glycine max* L. Une nouvelle espèce, *B. yuanmingense*, a été isolée du genre *Lespedeza*. En plus d'une souche de *Bradyrhizobium* nodulant une plante sauvage du genre *Phaseolus* a été signalée par **Parker (2002)**.

Les autres espèces reconnues de ce groupe sont *Bradyrhizobium betaedes* racines de *Beta vulgaris* atteintes de déformations tumorales (**Rivas et al., 2004**), et *Bradyrhizobium canariense* des légumineuses génistoïdes des îles Canaries (**Vinuesa et al., 2005**). Une étude polyphasique a été réalisée pour déterminer la taxonomie d'une souche isolée à partir d'*Entada koshunensis* au Japon. L'analyse phylogénétique du gène de l'ARNr 16S a montré que la souche appartenait au genre *Bradyrhizobium* pour laquelle le nom de *B. iriomotense* sp. a été proposé (**Islam et al., 2008**). Plusieurs souches isolées de la légumineuse *Pachy rhizuserosus* ont été caractérisées sur la base des données génotypiques et phénotypiques, ces nouvelles souches représentent deux nouvelles espèces pour lesquelles les noms de *B. pachyrhizi* sp. et *B. Jicamae* sp. ont été attribués (**Ramírez-Bahena et al., 2009**). Plus tard, de nouvelles espèces, à savoir *B. cytisi* de *Cytisus villosus* (**Chahbourne et al., 2011**), et *B. daqingense* provenant de *Glycine max* (**Wang et al., 2013**) ont été rapportés.

→Genre *Azorhizobium* :

Le genre *Azorhizobium* a été décrit par **Dreyfus et al. (1988)**. Il comporte actuellement deux espèces (**Velázquez et al., 2017**). Les membres de ce genre sont les seuls à utiliser les alcools comme source de carbone et dégradent également les acides et les acides gras organiques. Leur croissance est intermédiaire entre les deux genres précédents, avec un temps de génération compris entre 7 et 9 h. Aucun isolat n'est

dénitrifiant, tolèrent jusqu'à 43°C et possèdent l'arginine dihydrolase et la lysine décarboxylase. Leur particularité est qu'ils sont incapables d'utiliser le mannitol, par contre le lactate donne de bons rendements de croissance. Mais forment aussi des nodules sur les parties aériennes de *Sesbania rostrata* (Dreyfus *et al.*, 1988).

→Genre *Methylobacterium*

Le genre *Methylobacterium* a été découvert par Patt *et al.* (1976), et ne comprend qu'une seule espèce de *Rhizobium* : *Methylobacterium nodulans* qui nodule le crotalaria. Ces bactéries sont des chimio-organotrophes méthylo-trophique facultatifs (Hourcade, 2007). Les bactéries de ce genre sont des bâtonnets (0.8–1.0 x 1.0 à 3.0 µm), avec une pigmentation rose typique due à la présence de caroténoïdes (van Dien *et al.*, 2003). Elles sont mésophiles et ont des températures optimales de croissance situées entre 25 et 30 °C. Leurs cellules contiennent souvent des inclusions de poly- γ -hydroxybutyrate et parfois des inclusions de polyphosphates (Hourcade, 2007).

→Genre *Devosia*

Le genre *Devosia* a été identifié en 1996 par Nakagawa *et al.* Et ne comprenait qu'une seule espèce rhizobienne. En étudiant des isolats en provenance de nodules de la légumineuse aquatique *Neptunia natans* poussant en Inde, Rivas *et al.* (2003) ont isolé des bactéries à croissance rapide. Cette nouvelle espèce a ensuite été nommée *Devosia neptuniae*. Mais récemment, sur la base de données chimiotaxonomiques et des propriétés moléculaires, une autre espèce du genre a été isolée à partir des racines de *Nitraria sibirica* au nord-ouest de la Chine, pour laquelle le nom *Devosia nitraria* sp. est proposé (Xu *et al.*, 2017).

→Genre *Microvirga*

Le genre *Microvirga* contient actuellement trois espèces de rhizobia. Sur la base des données génotypiques, phénotypiques et de parenté ADN, trois nouvelles espèces de *Microvirga* ont été isolées et identifiées. Celles-ci proviennent des nodules des légumineuses indigènes *Listia angolensis* (de Zambie) et *Lupinus texensis* (États-Unis) dont les noms: *Microvirga lupini* sp, *Microvirga lotononidis* sp. Et *Microvirga zambiensis* sp. Sont proposés (Ardley *et al.*, 2012). De même, dernièrement, une souche a été isolée du sol et qui représente une nouvelle espèce du genre *Microvirga*, pour laquelle le nom *Microvirga soli* sp. Est proposé (Dahal et Kim, 2017).

→ Genres *Shinella*, *Ochrobactrum*, et *Phyllobacterium*

Lin *et al.* (2008) ont isolé une souche bactérienne à partir de nodosités radiculaires de *Kummerowia stipulacea* cultivées en Chine. Cette souche est désormais une nouvelle espèce nommée *Shinella kummerowiae* sp. Zurdo-Pineiro *et al.* (2007) ont isolées deux souches bactériennes à partir de nodules de *Cytisus scoparius* en Espagne. Ces souches appartiennent à une nouvelle espèce appelée *Ochrobactrum cytisi* sp. alors que le genre *Phyllobacterium* contient actuellement trois espèces (Velázquez *et al.*, 2017).

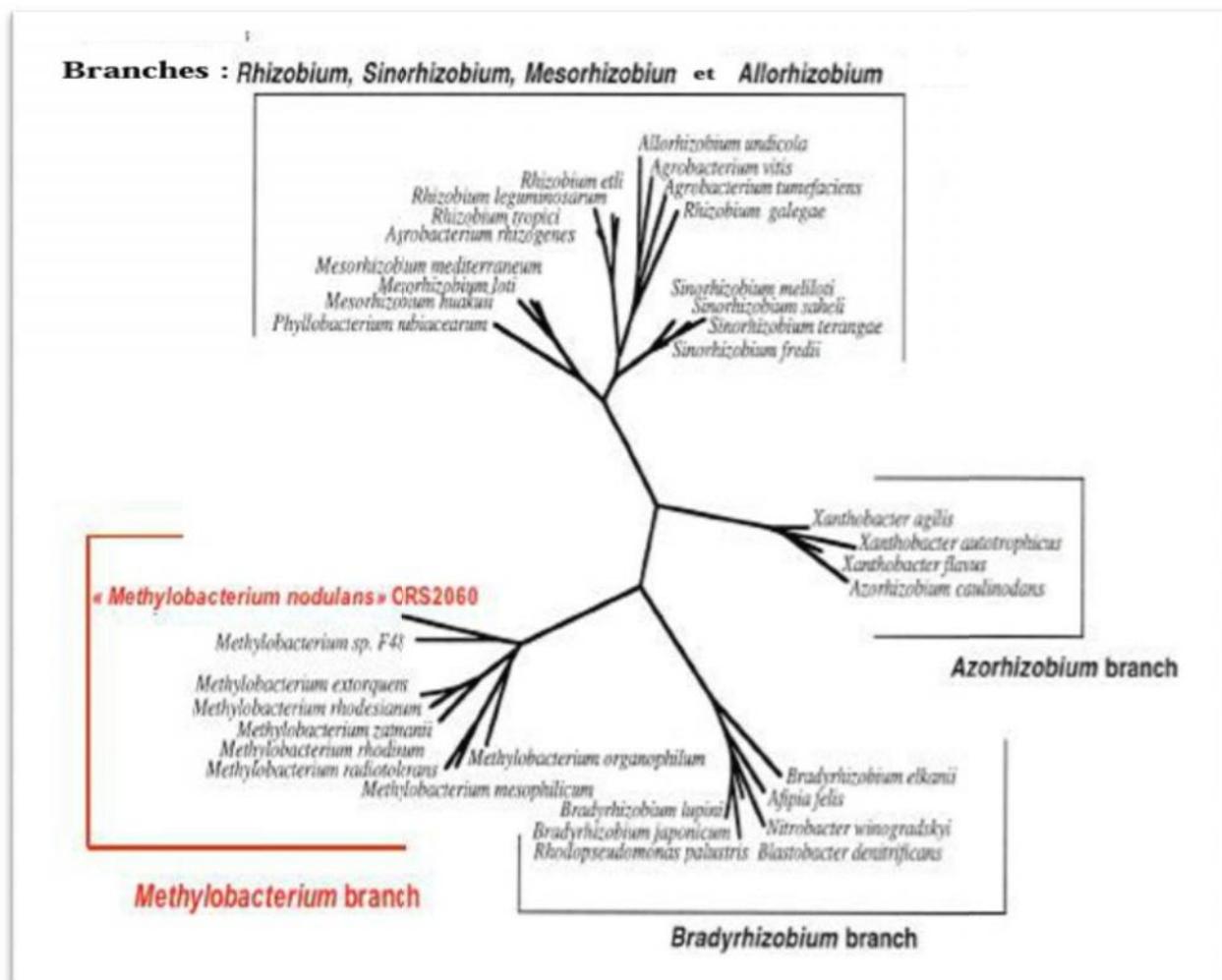


Figure 3: Arbre phylogénétique des différentes branches des rhizobia, dans la subdivision de - Protéobactéries (Sy *et al.* 2001).

3.2.2. Classe des *-Proteobacteria*

→ Genre *Burkholderia*

Le genre *Burkholderia* a été proposé par **Yabuuchi et al. en 1992**. Il comprend actuellement trente espèces rhizobiennes identifiées alors que d'autres sont toujours sous le nom de *Burkholderia* sp. (**Martins et al., 2015**). Les espèces de ce genre peuvent croître en utilisant comme seule source de carbone le glucose, le glycérol, l'inositol, le galactose, le sorbitol ou le mannose. Ce sont aussi des bactéries fixatrices d'azote comme *Burkholderia vietnamiensis* (**Gilliset al., 1995**) et *Burkholderia Kururiensis* (**Zhang et al., 2000**).

Deux souches rhizobiennes, ont été isolées à partir des racines de *Mimosa caesalpinifolia* du Brésil. Sur la base des similitudes des séquences du gène de l'ARNr 16S, d'une approche polyphasique, comprenant des hybridations ADN-ADN, électrophorèse en champ pulsé des profils d'ADN du génome entier, analyses de protéines entières, analyse des esters méthyliques d'acides gras et caractérisation biochimique extensive, la position taxonomique de ces souches; est une nouvelle espèce de *Burkholderia*, nommé *Burkholderia sabiae* sp. nov. (**Chen et al., 2008**). Utilisant la même plante pour mettre en évidence de nouvelles espèces par **Martins et al. (2015)**, en compilant une caractérisation morpho-physiologique, BOX, ERIC et REP ont pu améliorer la distinction entre les isolats en comparant la séquence ARN r 16S et ont démontré une préférence des *Mimosa* pour les *Burkholderia* diazotrophes.

→ Genre *Cupriavidus*

Cupriavidus anciennement *Wautersia* ou *Ralstonia* a été créé en 1995 par **Yabuuchi et al.** Le genre a subi récemment plusieurs révisions taxonomiques, dont l'espèce *Cupriavidus taiwanensis* est identifié (**Klonowska et al., 2012**). Une classification bactérienne sur la base d'une approche polyphasique a été réalisée sur trois souches bactériennes isolées en Malaisie. Ces souches sont considérées comme représentant une nouvelle espèce pour laquelle le nom de *Cupriavidus malaysiensis* sp. est proposé (**Ramachandran et al., 2017**).

4. Diversité des rhizobia nodulant le pois chiche

La symbiose pois chiche- rhizobia n'a pas été largement étudiée, ce n'est que dans les années 90 que la diversité des rhizobia pouvant noduler cette légumineuse a commencé à être systématiquement étudiée. Jusqu'à présent, peu d'études sont consacrés à ce domaine, elles utilisent des critères phénotypiques et moléculaires variés du rhizobium. La caractérisation phénotypique est basée sur des tests biochimiques, enzymatiques (**L'Taïef et al., 2007**) et sur les profils de résistance aux antibiotiques (**Alexandre et al., 2006**). Les approches moléculaires les plus communes comprennent les empreintes digitales RAPD

(random amplified polymorphic DNA), le séquençage de l'ARNr 16S, les profils palindromiques extragéniques répétitifs (REP-PCR) (**Ben Romdhane et al., 2007**) et l'analyse du profil des protéines totales (**Alexandre et al., 2006**).

Au début, tout en se basant sur le concept de groupes d'inoculation croisée, les chercheurs ont déduit que les rhizobiums nodulant le pois chiche formaient un groupe très spécifique (**Gaur et Sen, 1979**). Au sein de ce groupe, une importante hétérogénéité a été cependant détectée par des analyses physiologiques et moléculaires. Ces contradictions ont mené **Nour et al., (1994)** à réexaminer une collection de rhizobia de pois chiche provenant de différentes zones géographiques. Deux espèces du même genre *Rhizobium* ont d'abord été identifiées: *Rhizobium ciceri* et *Rhizobium mediterraneum* (**Nour et al., 1994 ; 1995**). Deux ans plus tard, les études suivies par **Jarvis et al., (1997)**, ont permis d'inclure ces deux espèces dans le genre *Mesorhizobium*. Depuis au sein du genre *Mesorhizobium*, une grande diversité d'espèces nodulant le pois chiche a été mise en évidence. Des isolats liés à d'autres espèces (*M. amorphae*, *M. Loti*, *M. huakuii*, *M. opportunistum*, *M. muleiense* et *M. tianshanense*) ont été rapportés former des nodules fonctionnels lors de l'interaction avec les racines de pois chiche (**Zhang et al., 2012a**). Cette non concordance entre cette grande diversité trouvée et la restrictivité pour la nodulation connue du pois chiche (**Broughton et Perret, 1999**) a mené des chercheurs à examiner des gènes symbiotiques.

L'analyse phylogénétique de deux gènes de symbiose (*nifH* et *nodC*), portant sur 21 isolats portugais, a révélé qu'ils étaient très conservés chez les isolats du pois chiche. Ces gènes regroupent tous les isolats examinés dans deux clades correspondant à deux espèces (*M. mediterraneum* et *M. ciceri*), indépendamment de leurs précédentes affiliations (**Laranjo et al., 2008**). Ceci confirme que le pois chiche est un hôte restrictif pour la nodulation au moins en terme de facteurs *Nod* produits (**Broughton et Perret, 1999**).

Récemment, une autre légumineuse, *Bisserula pelecinus*, a été montrée comme pouvant être nodulée par des bactéries de l'espèce *M. ciceri* isolées de nodules de pois chiche; cependant la souche type de *M. ciceri* est incapable de noduler cette plante (**Nandasena et al., 2007b**). Le spectre d'hôte de ces souches isolées du pois chiche apparaît donc comme très restreint même si ponctuellement des souches peuvent s'associer avec d'autres plantes. Malgré ces précédents résultats, le problème de l'ambiguïté concernant la spécificité de la symbiose entre le pois chiche et le rhizobium reste toujours à résoudre. Sans doute les résultats d'un nombre plus grand d'études devraient expliquer cette importante diversité, surtout que cette dernière a même dépassé le niveau inter espèce du genre *Mesorhizobium*. En effet, d'autres espèces du genre *Ensifer* nodulant le pois chiche, ont été détectées dans plusieurs études au sein des nodules de pois chiche (**Ben romdhane et al., 2007**).

5. La nodulation

Le nodule est un nouvel organe produit par la plante hôte au sein duquel les bactéries, différenciées en bactéroïdes, fixent l'azote atmosphérique. Pour permettre une activité optimale de la nitrogénase, enzyme irréversiblement inactive par l'oxygène, la plante maintient les nodules en condition de micro-oxie grâce au parenchyme nodulaire pendant que le lé hémoglobine transporte et tamponne la concentration d'oxygène indispensable à la respiration. Les nodules sont majoritairement racinaires mais peuvent parfois être caulinaires. Une illustration de ces différents types de nodules est présentée (**Figure 4**).

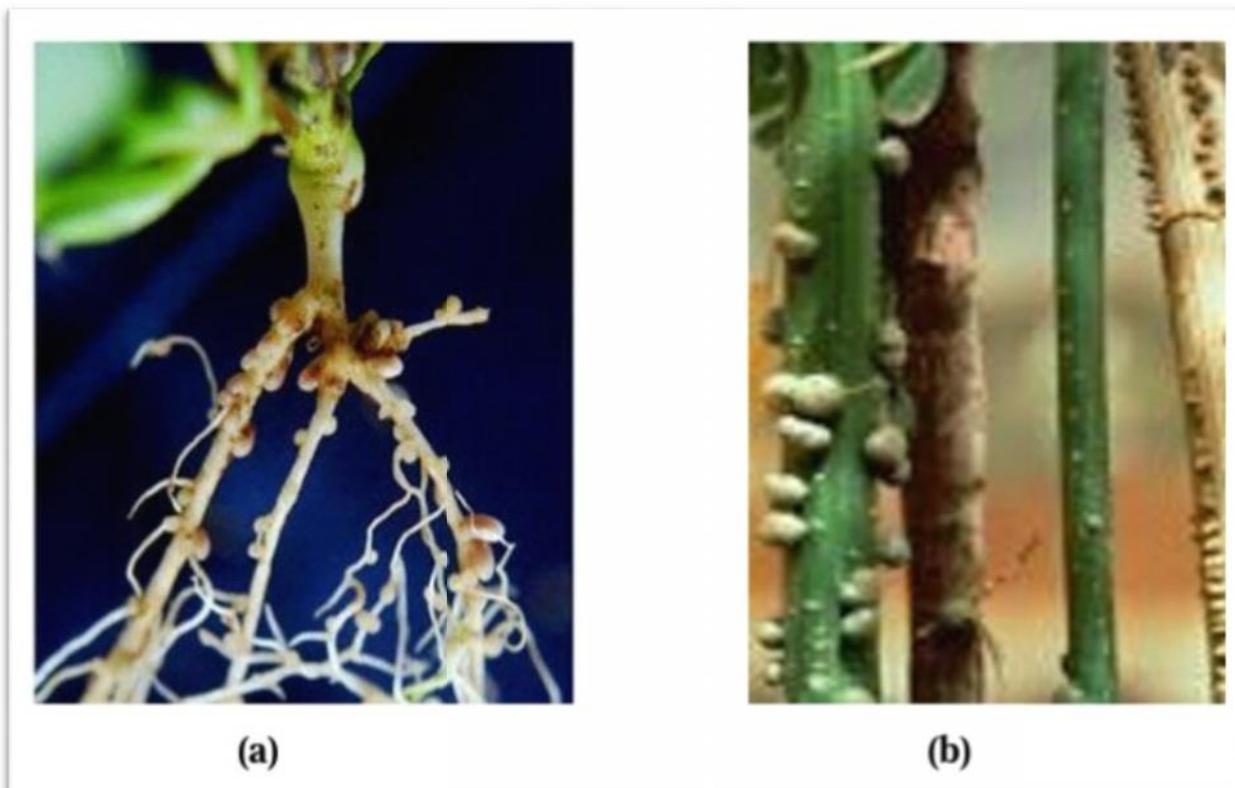


Figure 4 : (a) : Nodules racinaires (b) : Nodules caulinaires

5.1. Processus de nodulation

L'établissement de l'association symbiotique, la formation des nodules et la fixation de l'azote sont la conséquence d'une série d'interactions contrôlées par signaux moléculaires entre la plante et son hôte bactérien. L'organogénèse des nodosités, depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui parfaitement bien connue (**Madigan *et al.*, 2007**).

5.2. Mécanisme de la nodulation

→ Mode d'infection

La première étape de l'infection consiste à l'attachement des bactéries sur les jeunes poils absorbants au niveau de la zone susceptible à l'infection. Les bactéries se lient aux poils grâce à une protéine bactérienne appelée rihcadhésine. Des lectines végétales localisées à l'apex des poils sont également impliquées dans l'adhésion des bactéries. Une fois les bactéries fixées à l'apex du poil en croissance, elles vont induire par l'intermédiaire des facteurs Nod la courbure du poil absorbant en « cross de berger ». Au niveau de cette cross se développe une structure en forme de tube appelée cordon d'infection qui progresse jusqu'au cortex interne de la racine. Simultanément à la mise en place de ce cordon, les cellules du cortex se divisent et forment un primordium nodulaire (Duhoux et Nicole, 2004).

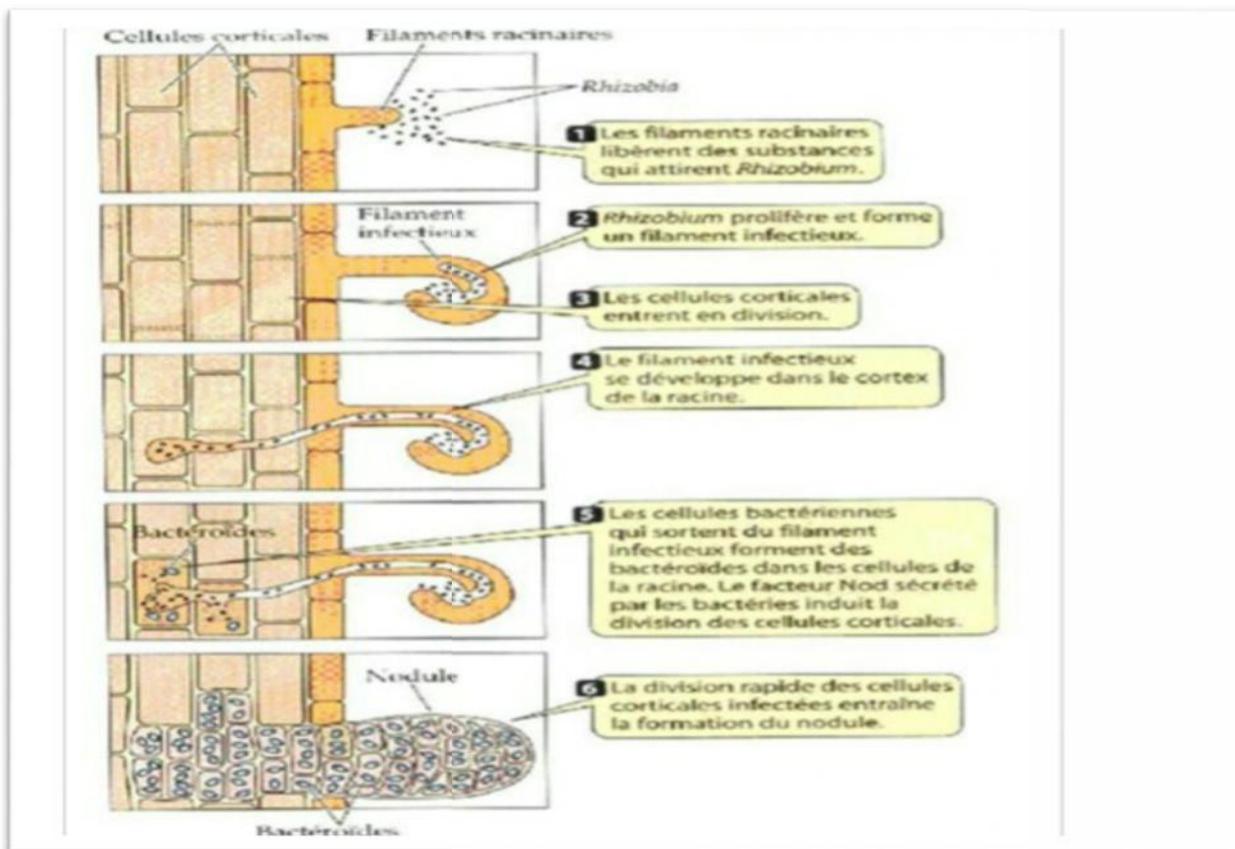


Figure 5: Les étapes du mécanisme de nodulation.

→ Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Une fois toutes les structures en place, les bactéries entrent dans la racine cheminant le long du cordon d'infection jusqu'au niveau du primordium nodulaire où elles prolifèrent rapidement et prennent des formes plus ou moins globuleuses, boursoufflées parfois branchées devenant ainsi des bactéroïdes. Les bactéroïdes sont enfermés dans des vésicules limitées par une membrane dérivant de la cellule végétale

nommée membrane pér bactéroidienne pour former un ensemble nommé symbiosome (**Hopkins et al., 2003**). La prolifération des bactéroïdes enfermés dans leur membrane et des cellules corticales des racines produit des excroissances tumorales appelées nodules ou nodosités. Le nombre de nodules et leurs masses sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (**Duhoux., 2004**).

6. Inoculation des légumineuses

6.1. Historique

Il y a plus de 100 ans que des recherches ont été entreprises en vue d'améliorer la croissance des plantes. Les chercheurs se sont surtout attachés à élucider les questions de l'apport et la disponibilité d'azote et de phosphate, qui sont les éléments nutritifs les plus indispensables à la croissance des plantes. Les premiers inoculums, constitués de bactéries telluriques, qui, induits dans les légumineuses, apportaient à celles-ci de l'azote, ont été commercialisés en 1898. Ces bactéries sont encore utilisées aujourd'hui et font l'objet d'importants travaux de recherche.

6.2. Mode d'action d'un inoculum

Les inoculums peuvent agir de plusieurs manières : (a) action directe : les microorganismes infestent les poils des radicelles des plantes et font gonfler les cellules racinaires, qui forment des nodosités. A l'intérieur de ces nodosités, les bactéries convertissent l'azote de l'air en une forme que la plante peut utiliser comme nutriment ; (b) Action indirecte : les inoculums convertissent des formes minérales de phosphate tellurique et autres éléments nutritifs moins disponibles en des formes immédiatement disponibles pour les plantes ; (c) Protection : les inoculums offrent une protection contre les agents pathogènes.

6.3. Nécessité d'une inoculation

L'inoculation des légumineuses est un moyen de s'assurer que la souche de rhizobia la plus adaptée, et en nombre suffisant, soit présente dans la rhizosphère et permette une nodulation abondante alliée à une bonne fixation d'azote. Malgré les difficultés qui peuvent survenir pendant l'inoculation des légumineuses, sa pratique est simple. Le but de cette manœuvre est d'assurer une fixation élevée d'azote (**Date, 2000**).

6.4. Sélection d'une souche de rhizobia pour la production d'inoculum

Une sélection très étendue doit être faite afin d'identifier l'inoculum idéal pour une légumineuse. Les critères de sélections varient selon le type de sol : acide, alcalin, salin, avec des nitrates, riche en matière organique, ou contaminé avec des métaux lourds (Kannaiyan *et al.*, 2000).

→ Résistance à la température et tolérance au pH

La température optimale pour la croissance des rhizobies se situe entre 28°C et 31°C, la température maximale de croissance des rhizobies est entre 32°C et 47°C. Le pH est un facteur limitant la fixation symbiotique.

→ Résistance à la salinité

La nodulation est très sensible au stress salin ; de ce fait la production d'inoculum capable de donner des résultats doit passer par la sélection de souches tolérantes au sel (Jebara *et al.*, 2001).

→ Résistance aux concentrations élevées d'azote

Des études ont démontré que l'ajout d'azote à 2 mM a pour effet l'inhibition de la nodulation et la fixation de l'azote (Dovel *et al.*, 1993). La sélection des rhizobies doit donc tenir compte de la tolérance de celles-ci aux concentrations élevées et basses en azote dans le sol (Kyei-Boahen *et al.*, 2002).

→ Résistance aux antibiotiques

L'un des marqueurs importants pour la sélection des bactéries réside dans la résistance aux antibiotiques (Smith, 1996). Afin d'utiliser les antibiotiques comme un marqueur de sélection certains pré requis doivent être réunis : (a) les microorganismes doivent se prêter à la culture ; (b) la résistance doit être stable ; (c) la résistance doit être rapide. La méthode utilisée est la culture de bactérie sur milieu contenant différentes concentrations d'antibiotiques afin de sélectionner les souches résistantes spontanées (OECD, 2004).

6.5. Facteurs affectant la réponse à l'inoculation

Comme la fixation de l'azote est un processus symbiotique, des facteurs environnementaux affectant la plante hôte ainsi que les rhizobies doivent être optimaux pour l'établissement d'une symbiose effective (Somasegaran et Hoben, 1994).

→ Profondeur du placement de l'inoculum

La profondeur est un facteur important qui peut influencer l'inoculation du sol. Il est bien établi que le mouvement des rhizobia dans le sol est limité (**Madsen et Alexander, 1982**). L'application de l'inoculum aux graines à la profondeur du semis a pour résultat une prédominance de la nodulation dans la partie supérieure de la racine.

Les expériences de **Vikman et Vessey (1992)** ont montré que les nodules des racines latérales sont plus actifs durant la formation des graines et peuvent fournir une fixation significative de l'azote durant la phase de reproduction de la plante, donc la stratégie de l'inoculation est de positionner l'inoculum de façon à ce qu'il soit intercepté par les racines latérales .

→Date de plantation

Les graines inoculées doivent être plantées le plus vite possible après traitement (12 heures ou moins) afin que les cellules bactériennes restent humides et survivent assez longtemps pour infecter les racines des légumineuses (**Beuerlein, 2003**)

→Sécheresse et humidité

Une période très sèche ou très humide suivant la plantation a pour effet de diminuer les performances de l'inoculum (**Beuerlein., 2003**)

→ Utilisation d'un fongicide ou d'un herbicide

Lors de l'application d'un fongicide ou d'un herbicide sur les graines il faut s'assurer qu'il soit sec avant l'application de l'inoculum, mais le plus souvent les traitements antifongiques ne sont pas mélangés avec l'inoculum (**Beuerlein., 2003**).

→PH du sol

Il s'agit d'un important facteur environnemental. Plusieurs légumineuses répondent au chaulage quand elles poussent sur sol acides (poussent et nodulent bien dans les sols à pH 5.6 - 6.8). Pour les rhizobia, le pH optimal est variable entre 5.8 et 7.2 en fonction des espèces de *Rhizobium* (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

→ Manque de phosphore

Cette carence va limiter sévèrement la formation des nodules et la fixation de l'azote. Les recherches sélectionnant des rhizobia effectifs aux champs doivent prendre en considération une fertilisation

phosphatée adéquate (**Somasegaran et Hoben, 1994**). Le manque de phosphore dans le sol a également un effet inhibiteur sur la nodulation et la fixation de N₂.

→ **Impact de la population rhizobial autochtone sur l'inoculation :**

Quand la population de rhizobia autochtone spécifique à une légumineuse précise est faible (moins de 50 bactéries par gramme de sol) l'introduction de nouvelles souches par l'inoculation des graines doit normalement réussir. Par contre, l'inoculation dans les sols où les souches rhizobiennes sont fortement présentes (plus de 10³ bactéries/g de sol) est difficile et souvent sans succès (**Brochwell et al., 1995**).

6.6. Critères de sélection d'un inoculum

Basés sur les suggestions de **Kannaiyan et al. (2000)**, les caractères suivants sont considérés comme souhaitables pour une souche afin d'être utilisée comme un inoculum :

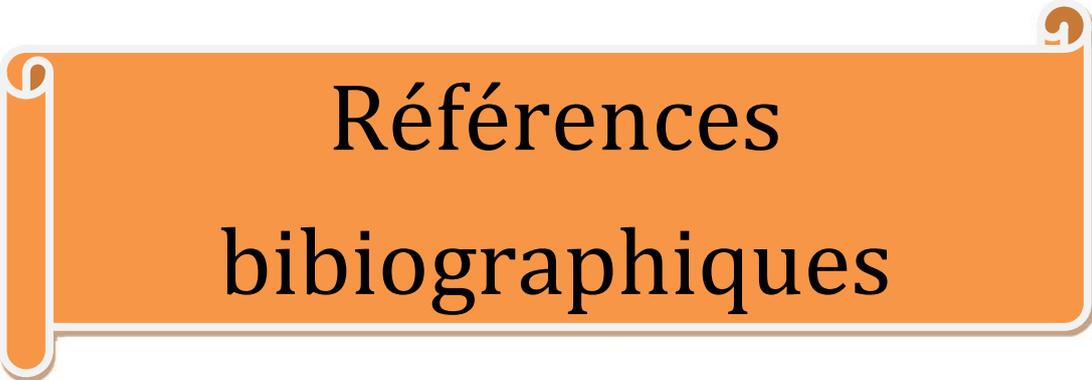
- a) capacité à noduler et à fixer l'azote.
- b) capacité à former des nodules avec une population native de *Rhizobium* présente dans le sol.
- c) capacité à fixer l'azote malgré les mauvaises conditions environnementales.
- d) capacité à former des nodules et à fixer l'azote en présence de nitrates dans le sol.
- e) capacité à bien pousser dans un milieu artificiel, sur un support d'inoculum et dans le sol.
- f) capacité à persister dans le sol, particulièrement pour les légumineuses annuelles.
- g) capacité à migrer du site d'inoculation. h) capacité à coloniser le sol en l'absence de légumineuse hôte.
- i) capacité à tolérer les stress environnementaux. 41 j) capacité à fixer l'azote sur un large spectre de génotypes.
- k) être stable génétiquement.
- l) être compatible avec des fertilisants chimiques.

Conclusion

Conclusion

Une meilleure connaissance des rhizobia nodulant le pois chiche dans le sol algérien, permet d'une part l'amélioration du rendement de cette légumineuse; dont le besoin national dépend toujours de l'importation et d'autre part, d'augmenter la fertilité des terres agricoles.

L'axe de notre recherche couvre l'étude de la biodiversité des bactéries symbiotiques nodulant le pois chiche. Cette étude bibliographique nous a permis de révéler une diversité phénotypique et génotypique au sien des nodosités racinaires du pois chiche.

An orange horizontal banner with a white scroll-like border on the left and right sides. The text is centered within the banner.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE :

1. **Alexandre A, Laranjo M&Oliveira S.2006.** Natural populations of chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods. *Microb Ecol.*51: 128–136.
2. **Aouani M.E, Mhamdi R., Mars M., Elyeb M., Ghrir R. 1997.** Potential for inoculation of common bean by effective rhizobia in Tunisian soil. *Agronomie* 17: 445-454.
3. **Aouani ME, Mhamdi R, Jebara M, Amarger N. 2001.** Characterisation of rhizobia nodulating chickpea in Tunisia. *Agronomie.* 21: 577-581.
4. **Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., Boatwright, J.S., Borges, L.M., Brown, G.K., Bruneau, A., et al. (2017).** A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon* 66, 44–77
5. **Ben Romdhane S, Aouani Mohamed Elarbi, Mhamdi Ridha. 2007.** Inefficient nodulation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in the arid and Saharan climates in Tunisia by *Sinorhizobium meliloti* biovar *medicaginis*. *Annals of Microbiology.* 57 (1):15-19.
6. **Beuerlein J.2003.** Ohio Soybean inoculation study. The Ohio state university.100
7. **Broughton, WJ, Perret X. 1999.** Genealogy of legume-rhizobium symbioses. *Current Opinion in Plant Biology.* 2: 305-311.
8. **Chahbourne R, Carro L, Peix A, Barrijal S, Velasquez E, Bedmar EJ. 2011.** *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 61: 2922-2927.
9. **Chen WM, de Faria SM, Chou JH, James EK, Elliott GN, Sprent JI, Bontemps C, Young JP, Vandamme P. 2008 .** *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosaceae salpinii folia*. *int J Syst Evol Microbiol.*; 58: 2174-2179.
10. **Chen WM, Zhu WF, Bontemps C, Young JP, Wei GH. 2010.** *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China.*Int J Syst Evol Microbiol.* ; 60(4):958-962
11. **Chen W X, Yan G H, Li J L. 1988.** Numerical taxonomic study of fast-growing soy bean rhizobia and proposal that *Rhizobium fredii* assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.*; 38: 392-397.
12. **Coenye T, Gevers D, Peer YV, Vandamme P , Swings J. 2005.** Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol Rev.*; 29: 147-167.

13. **Crété P., 1965.** Précis de botanique tome 2 .Systématique des angiospermes. Edition Masson et Cie: 238-246.
14. **Date R.A. 2000.** Inoculated legumes in cropping systems of tropics. Field Crops Res. 65: 123-136.
15. **de Lajudie P, Willems A, Nick G. 1998.** Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. Int J Syst Bacteriol.; 48: 369-382.
16. **de Lajudie P, Willems A, Pot B., Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins M D, Dreyfus B, Kersters K, Gillis M . 1994.** Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. Int J Syst Bacteriol.; 44: 715-733.
17. **Diouf A, de Lajudie P, Neyra M, Kersters K, Gillis M, Martinez-Romero E ,Gueye M. 2000.** Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). Int J Systematic Evol Microbiol. ; 50: 159-170.
18. **Dovel R.L., Vietor D.M., Weaver R., 1993.** Effects of media N content and rhizobial strain on N₂ fixation and partitioning in *Leucaena seedlings*. J. Range Manage 46 : 512-515.
19. **Doyle, J.J., and Luckow, M.A. (2003).** The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. Plant Physiol. 131, 900–910.
20. **Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M. 1988.** Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov. a stemnodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int J Syst Bacteriol.; 38: 89-98.
21. **Duhoux E, Nicole M. 2004.** Biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes. Eds. IRD. Montpellier. pp :1-18.
22. **DUKE J.A., 1981.** Handbook legumes of world economic importance Ed .Plenum press, New York and London, 25p.
23. **FAOSTAT., 2015.** <http://www.faostat3.fao.org/> (consulté le 23/04/2016).
24. **Fred EB, Baldwin IL, McCoy E. 1933.** Root nodule bacteria and leguminous plants. Soil Science. ; 35 :167 .
25. **Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, Broughton WJ, Rosenthal A, Perret X. 1997.** Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature. 387:394–401.
2. **Garcia-Fraile P, Rivas R, Willems A, Peix A, Martens M, Martinez-Molina E, Mateos PF , Velazquez E.** *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. Int J Syst Evol Microbiol. 2007. ; 57: 844-848.

27. **Gaur YD and Sen AN. 1979.** Cross-inoculation group specificity in *Cicer rhizobium* symbiosis. *New Phytol.* 83: 745–754.
28. **Gillis M, Van TV, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K, Heulin T, Fernandez MP, . 1995.** Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Bacteriol*; 45: 274- 289.
29. **Glaeser SP, Kämpfer P. 2015 .** Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiol.*; 38(4): 237-245.
30. **Graham P.H., Vance C.P., 2003.** Legumes: importance and constraints to greater use, *plant physiol.* 131 : 872-877.
31. **Gu CT, Wang ET, Tian CF, Han TX, Chen WF, Sui XH, Chen WX. 2008.** *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 58: 1364-1368.
32. **Hamadache, 2000.** Etude de la période de compétition des mauvaises herbes vis-à-vis d'une culture de pois chiche. *Céréaliculture.* n°22. Ed-ITGC EL-HARRACH Alger : 13
33. **Han TX, Han LL, Wu LJ, Chen WF, Sui XH, Gu JG, Wang ET, Chen WX, . 2008.** *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 58: 2610-2618.
34. **Herridge D., Gemell G., Hartley E. 2002.** Legume inoculants and quality control in: Herridge D. (Ed) *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam*, ACIAR proceeding 109e .pp. 105-115.
35. **HOPKINS W.G. 2003.** *Physiologie végétale.* Université des Sciences et Technologie de Lille Edition de boeck 99-120.
36. **Hourcade E. 2007.** Dégradation du dichlorométhane et adaptation à la production intracellulaire d'acide chez *Methylobacterium*. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur, Strasbourg. ; 170p.
37. **Islam MS, Kawasaki H, Muramatsu Y, Nakagawa Y, Seki T. 2008.** "*Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan . *Biosci Biotech Biochem.*; 72: 1416-1429.
38. **Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WC, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC and Gillis M. 1997.** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 47: 895–898.

- 39. 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 , *Agronomie* 21: 601-605.
- 40. Jordan D. C. 1982.** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* *gen. Nov.*; a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol.*; 32; 136-139.
- 41. Jordan DC. 1984.** Family II. *Rhizobiaceae*. In, *Bergey's manual of systematic bacteriology*. I (eds. By N. R.Krieg and J. G. Holt Williams and Wilkins Co. Baltimore, M .D.); pp: 232-242.
- 42. Kannaiyan S., Govindarajan K., Kumar K., Chendrayan K., 2000.** Use of biofertilizers for increasing pulse production.
- 43. Klonowska A, Chaintreuil C, Tisseyre P, Miché L, Melkonian R, Ducouso M, LaguerreG, Brunel B, Moulin L. 2012.** Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils .*FEMS Microbiol Eco*; 81(3) : 618-635 .
- 44. Kyei-Bohan S., Sllnkard A.E. ET Walley F. L. 2002.** Evaluation of rhizobial inoculation methods for chickpea. *Agronomie. J.* 94: 851- 859.
- 45. Laranjo M, Alexandre A, Rivas R, Velázquez E, Young JPW and Oliveira S. 2008.** Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species "FEMS Microbiology Ecology. 66 (2): 391-400.
- 46. Lloret L, Ormeno-Orrillo E, Rincon R, Martínez-Romero J, Rogel-Hernandez MA, MartínezRomero E. 2007.** *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Syst Appl Microbiol.*; 30: 280-290.
- 47. L'taief B, Sifi B, Gtari M, Mainassara ZA and Lachaal M. 2007.** Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Tunisia. *Canadian Journa lof Microbiology.* 53: 427-434.
- 48. Lu YL, Chen WF, Wang ET, Han LL, Zhang XX, Chen WX, Han SZ. 2009.** *Mesorhizobium shangrilense* sp. nov., isolated from root nodules of *Caragana* species.*Int J Syst Evol Microbiol.* ; 59(12): 3012-3018.
- 49. M.A.D.R., 2015.** Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. *Annuaire Statistiques, Série B.*
- 50. MADIGAN ,M., MARTINK , J.(2007).** *Brock Biologie des microorganismes* 11e edition. Person Education France. pp 599 -60.
- 51. Madsen E.L., Alexander.M.1982.**Transport of Rhizobium and pseudomonas through

soil. Soil Sci .Soc .Am.J.46: 557-560.

52. Martins PGS, Junior MAL, Fracetto GGM, Silva MLRBD, Vincentin RP, Lyra MDCCPDL. 2015. *Mimosa caesalpinii* folia rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. Arch Microbiol. ; 197(3) : 459-469.

53. MUEHLBAUER F.J., RAJESH P.N., 2008. Chickpea, a Common source of protein and starch in the semi-arid tropics. PH. Moore, R Ming (eds.) Genomics of tropical Crop plants.

54. Nakagawa Y, Sakini T, Yakota A., 1996 . Transfer of "*Pseudomonas riboflavina*" (poster 1944), a gram negative, motile rod with long-chain 3-hydroxy fatty acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov., nom. rev. Int J Syst Bacterio.; 46: 16-22.

55. Nandasena KG, O'Hara GW, Tiwari RP, Willems A, Howieson JG. 2007(b). *Mesorhizobium ciceri* biovar *biserrulae*, a novel biovar nodulating the pasture legume *Biserrulapelecinus L* .Int J Syst Evol Microbiol .57: 1041–5.

56. Nick G, de Lajudie P, Eardly BD, Suomalainen S, Paulin L, Zhang X, Gillis M Lindstro K. .1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. And *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. Int J Syst Bacteriol; 49 :1359-1368.

57. Nour SM, Cleyet-Marel J-C, Normand P, Fernandez MP. 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum L.*) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp .nov. Int J Syst Bacteriol. 45: 640-648.

58. Nour SM, Fernandez MP, Normand P, Cleyet-Marel JC. 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum L.*). Int J Syst Bacteriol. 44: 511-522.

59. OECD. 2004. Guidance Document on Methods for Detection of Micro-organisms Introduced into the Environment: Bacteria .In ENV/JM/MONO(2004)7. JT00165979

60. Patt TE, Cole GE, Hanson RS., 1976. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. Int J Syst Bacteriol.; 26: 226-229.

61. Parker M. 2002. *Bradyrhizobia* from wild *Phaseolus*, *Desmodium*, and *Macroptilium* species in northern Mexico. Appl Environ Microbiol.; 68: 2044-2048.

62. Quéré AL, Tak N, Gehlot HS, Lavire C, Meyer T, Chapulliot D, Rathi S, Sakrouhi I, Rocha G, Rohmer M, Severac D, Maltouf AF ,Munive JA. 2017. Genomic characterization of *Ensifer aridi*, a proposed new species of nitrogen-fixing rhizobium recovered from Asian, African and American deserts. BMC Genomics .:18:85.

63. Ramachandran H, Shafie NAH, Sudesh K, Azizan MN, Abdul Majid MI. 2017 .Correction to: *Cupriavidus malaysiensis* sp. nov., a novel poly(3-hydroxybutyrate-co-4-

hydroxybutyrate) accumulating bacterium isolated from the Malaysian environment.; 111: 361-372.

64. Ramirez-Bahena MH, Garcia-Fraile P, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual Jose MM, Pedro F, Martinez-Molina E, Velazquez E. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926 AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2008; 58: 2484-2490

65. Ramirez-Bahana MH, Peix A, Rivas R, Camacho M, Rodriguez-Navarro DN, Mateos PF, Martinez-Molina E, Willems A, Velasquez E. 2009. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. Int J Syst Evol Microbiol.; 59: 1929-1934.

66. Raven PH, Evert RF et Eichlorn SE. 2000. Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris.

67. Ren DW, Chen FW, Sui XH, Wang ET, Chen WX. 2011. *Rhizobium vignae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species. Int J Syst Evol Microbiol. ; 61: 580- 586

68. Rivas R, Willems A, Palomo J L, Garcia-Benavides P, Mateos P F, Martinez-Molina E, Gillis M., 2004. Velazquez E. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. Int J Syst Evol Microbiol; 54: 1271-1275.

69. Rivas R, Willems A, Subba-Rao N, Mateos P F, Dazzo F B, Martinez-Molina E, Gillis M, Velazquez E. 2003. Description of *Devosia neptunia* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. Syst Appl Microbiol.; 26: 47-53.

70. Santos MA, Nicola's MF and Hungria M. 2006. Identification of QTL associated with the symbiosis of *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* and soybean. Pesq. Agrop. Bras. 41: 67 -75.

71. SAXENA M.C., 1984. The physiology of tropical fields crops.ed.John Wiley and Sons Ltd , London , pp:419-452.

72. Smith R.S. 1996. Legume inoculant formulation and application. Can.J.Microbiol. 38:48 5-492

73. Somasegaran P., Hoben H.J. 1994. Handbook for Rhizobia :Methods in legume-Rhizobia technology .P.450.Springer-Verlag.new York.

74. Sy A, Eric G, Philippe J, Nelly G, Anne W, Philippe L, Yves P, Marc N, Monque G, Catherine B, Dreyfus B. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bact.*; 183: 214 -220.
75. Toker C., Uzun B., Ceylan F.O., Ikten C., 2014. Chickpea. *In: Alien Gene Transfer in Crop Plants*, A. Pratap and J. Kumar Eds., Volume 2, Springer, Dordrecht, pp:121-151.
76. Valacilova K., Ohri D., Vrana J., Cihalicova J., Kubalaková M., Kahl G. & Dolezel J., 2002. Development of flow cytogenetics and physical genome mapping in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Chromosome Research*, 10: 695-706.
77. VAN DER MAESEN L.J.G., 1987. Origin, history and taxonomy of chickpea. *In: SAXENA M.C., SINGH K.B., ed. The Chickpea*. P.p. 11-37.
78. Van Dien SJ, Okubo Y, Hough MT, Korotkova N, Taitano T, Lidstrom ME. 2003. Reconstruction of C (3) and C(4) metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using transposon mutagenesis. *Microbiol.*; 149: 601-609.
79. Velázquez E, García-Fraile P, Ramírez-Bahena MH, Rivas R, Martínez-Molina E, ;2017. Current Status of the Taxonomy of Bacteria Able to Establish Nitrogen-Fixing Legume Symbiosis. *Microbes for Legume Improvement.*; 1-43.
80. Vikman P.A., Vessey K. 1992. The decline in N₂ fixation rate in common bean with the onset of pod-filling : fact or artifact. *Plant soil* 147: 95-105.
81. Vinuesa P, Leon-Barrios M, Silva C, Willems A, Jarabo-Lorenzo A, Perez-Galdona R, Werner D, Martínez-Romero E . 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies *alpha* and *Bradyrhizobium* genospecies *beta*. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 55: 569-575.
82. UPADHYAYA H.D., BRAMEL P.J., SINGH S., 2001. Development of a Chickpea Core Subset Using Geographic Distribution and Quantitative Traits. *Plant Genetic Resources; Crop Sci.*
83. Wang ET, van Berkum P, Sui XH, Beyene D, Chen WX, Martínez-Romero E. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 51-65.
84. Wang FQ, Wang ET, Liu J, Chen Q, Sui XH, Chen WF, Chen WX. 2007. *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 57: 1192-1199

- 85. Wang X, Radwan M, TaraAwneh A, Gao J, Wedge D, Rosa L. 2013.** Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. *J Agric Food Chem.*; 61(19): 4551-4555.
- 86. Wang YC, Yu RC. 1998.** Detection of toxigenic *Aspergillus* spp. in rice and corn by ELISA. *J Chin Agric Chem Soc.*; 36: 512-520.
- 87. Wertz JE, Goldstone C, Gordon DM, Riley MA. 2003.** A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept. *J Evol Biol .*; 16: 1236-1248.
- 88. Wery J ., 1986.** Un pois pas si chiche que cela ! *Bulletin FNAMS; Semences*, 97: 32-35.
- 89. Willems A, Collins MD. 1993.** Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences, *Int J Syst Bacteriol .*; 43: 305-313.
- 90. Willems A. 2006.** The taxonomy of rhizobia: an overview .*Plant Soil.*; 287:3-14.
- 91. Wood J.A., Knights E.J., Chocty M., 2011.** Morphology of Chickpea Seeds (*Cicer arietinum* L.): Comparison of desi and kabuli Types. *Int J Plant Sci* 172 (5): 632-643.
- 92. Xu L, Zhang Y, Mohamad OA, Jiang C , Friman VP. 2018.** *Mesorhizobium zhangyense* sp. nov., isolated from wild *Thermopsis lanceolate* in northwestern China. *Archi Microbiol. ;* 200: 603–610 .
- 93. Xu L, Zhang Y, Read N, Liu S, Friman VP. 2017.** *Devosia nitraria* sp. nov., a novel species isolated from the roots of *Nitraria sibirica* in China. *Antonie Van Leeuwenhoek.*; 110(11): 1475-1483
- 94. Yabuuchi E, Kosako Y, Yano L, Hotta H, Nissmuchu Y.** Transfer of two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. : Proposal of *Ralstonia pickettii* (**Ralston, Pelleroni and Doudoroff 1973**) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (**Smith 1986**) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (**Davis 1969**) comb. nov. *Microbiol Immunol.* **1995**; 39: 897-904.
- 95. Young, N.D., Mudge, J., and Ellis, T.N. (2003).** Legume genomes: more than peas in a pod. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 199–204.
- 96. Young JM.** The genus name *Ensifer* **Casida 1982** takes priority over *Sinorhizobium* **Chen et al. 1988**, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* **Casida 1982**. Is the combination ‘*Sinorhizobium adhaerens*’ (**Casida 1982**) legitimate? Request for an Opinion .*Int J Sys Evol Microbiol.* **2003**; 53: 2107-2110.
- 97. Young JM. 2010.** *Sinorhizobium* versus *Ensifer*: may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission? *Int J Syst Evol Microbiol.*; 60: 1711-1713.

- 98. Yuan CG, Jiang Z, Xiao M, Zhou EM, Kim CJ, Hozzein WN, Park DJ, Zhi XY, Li WJ. 2016.** *Mesorhizobium sediminum* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 66: 4797-4802.
- 99. Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel JC, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2004.** Characterization of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst Appl Microbiol.*; 27: 380-395.
- 100. Zhang JJ, Liu TY, Chen WF, Wang ET, Sui XH, Zhang XX, Li Y, Li Y and Chen WX. 2012 .** *Mesorhizobium muleiense* sp. nov., nodulating with *Cicer arietinum* L. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62:2737–2742.
- 101. Zhang H, Hanada S, Shigematsu T, Shibuya K, Kamagata Y, Kanagawa T, Kurane R. 2000.** *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 50 :743-74.
- 102. Zhang YM, Li YJ, Chen WF, Wang ET, Sui XH, Li QQ, Zhang YZ, Zhou YG, Chen WX. 2012a.** *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 62: 1951-1957.
- 103. Zurdo-Piñeiro JL, Rivas R, Trujillo ME. 2007.** *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 57: 784-788.
http://www.icrisat.org/tropicallegumesII/pdfs/ChickpeaManual_full.pdf
<http://www.psmicrographe.co.uk/2010>