

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE SOUCHES DE RHIZOBIA ISOLEES DE QUATRE ESPECES DE *MEDICAGO* DANS LA VALLEE DE LA SOUMMAM (ALGERIE)

Reçu le 16/04/2002 – Accepté le 18/05/2004

Résumé

10 souches de rhizobia ont été isolées des nodules de 4 espèces *Medicago* (*M. polymorpha*, *M. minima*, *M. arabica*, *M. orbicularis*), récoltées dans 4 sites de la vallée de la Soummam (Béjaïa, Algérie). La caractérisation phénotypique a porté sur les aspects morphologiques, culturels des colonies et physiologiques, par une série de tests. Le traitement numérique des résultats des tests physiologiques regroupe les souches en 4 clusters formés à un faible niveau de similarité, indiquant leur diversité phénotypique.

Mots clés: rhizobia, *Medicago*, diversité, phénotypique.

Abstract

10 rhizobial strains have been isolated from nodules of 4 *Medicago* species (*M. polymorpha*, *M. minima*, *M. arabica*, *M. orbicularis*) harvested from four different sites in Soummam Valley (Béjaïa, Algérie). Morphological, cultural and physiological characterisations have been carried out, using a series of tests. The numerical treatment of the results of these tests grouped the strains analysed into 4 distantly related clusters indicating their phenotypic diversity.

Keywords: rhizobia, *Medicago*, diversity, phenotypic.

N. SEBBANE¹
A. BOULILA¹
M. SAHNOUNE²
N. RAMDANI¹
P. DE LAJUDIE³
S. BENALLAOUA¹

¹Laboratoire de Microbiologie Appliquée
Interactions Plantes-Microorganismes
Université A. Mira, 06000, Béjaïa (Algérie)

²Laboratoire d'Ecologie et Environnement
Université A. Mira, 06000, Béjaïa (Algérie)

³Laboratoire des symbioses tropicales
et méditerranéennes, UMR 1063,
INRA/AGRO-M/CIRAD/IRD TA 10/J
Campus International de Baillarguet
34398 Montpellier Cedex 5 (France)

ملخص

لقد عزلنا 10 عينات من ريزوبيا (rhizobia) من العقد الجذرية لأربعة أصناف من النباتات من الصنف ميديكاجو (*Medicago*) قد تم حصدها من 4 مواقع في سهب الصومام. التمييز الظاهري اهتم أولا بشكل المستعمرات ومميزاتها و ثانيا بمميزاتها الفزيولوجية. التحليل الإحصائي للنتائج التمييز الظاهري يجمع العينات الى 4 طائفات مكونين على مستوى ضعيف من التشابه مظهرا الاختلاف الظاهري.

الكلمات المفتاحية: العقد الجذرية ريزوبيا التمييز الظاهري.

Les Légumineuses sont très importantes d'un point de vue Agronomique et écologique, grâce à leur aptitude à la fixation biologique de l'azote résultant de leur association symbiotique avec des bactéries fixatrices d'azote communément appelées rhizobia, de la famille des *Rhizobiaceae* et de la sous-classe des Protéobactéries [1,2]. La classification des rhizobia a fait l'objet de grands remaniements depuis l'application de la taxonomie polyphasique qui permet une évaluation quantitative de la similarité entre les micro-organismes [3,4]. Plusieurs légumineuses du genre *Medicago* sont largement et naturellement distribuées dans plusieurs régions du monde ; elles sont importantes pour la couverture végétale du sol et comme engrais vert, et nombre d'entre elles sont cultivées [5]. D'autre part, c'est au niveau du bassin méditerranéen que ce genre, qui comprend plus de 60 espèces, est le plus diversifié [6]. A présent, 3 espèces de *Rhizobiaceae* ont été décrites chez les *Medicago* : *Sinorhizobium meliloti* [2,7]; *Sinorhizobium medicae* [8]; *Rhizobium mongolense* [9]. La diversité taxonomique des rhizobia associés aux *Medicago* n'a été que partiellement étudiée et évaluée [10,8]. Classiquement, *Sinorhizobium meliloti* est l'espèce associée aux genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella*. Les inoculations croisées ont montré que les *Medicago* ont divers degrés de spécificité [11]. Cette étude est une contribution à l'étude de la diversité des rhizobia associés aux Légumineuses du genre *Medicago* dans la vallée de la Soummam. Dans une première étape, nous rapportons les résultats de la caractérisation phénotypique qui a porté sur les caractéristiques morphologiques, culturelles et physiologiques des souches isolées.

MATERIEL ET METHODES

Isolement des souches

Les souches ont été isolées à partir des nodules de 4 espèces de Légumineuses herbacées, spontanées, annuelles du genre *Medicago* L. : *Medicago minima*, *M. arabica*, *M. orbicularis* et *M. polymorpha*, récoltées au niveau de 4 sites à travers la vallée de la Soummam (Wilaya de Béjaïa, Algérie), et traitées selon le protocole de Vincent [12]. Le broyat nodulaire est étalé sur boîte de Pétri contenant le milieu YM [12], additionné de Rouge Congo pour révéler les éventuels contaminants, solidifié et ajusté à pH 6,8. Les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C pendant 48 heures. La pureté des colonies est vérifiée par repiquages successifs et observations au microscope optique. Les isolats purifiés sont conservés à -20°C, sur milieu YM additionné de 30% (v/v) de glycérol.

Tests de nodulation

Afin d'établir l'appartenance des isolats à la famille des *Rhizobiaceae*, des tests de nodulation sur leurs plantes-hôtes ont été mis en œuvre : 4 lots de graines (1 lot par espèce de *Medicago*) sont scarifiés par perforation du tégument, stérilisés par immersion dans l'éthanol 95 pendant 30 secondes et dans une solution de HgCl₂ à 0.1% additionnée de 5ml d'acide chlorhydrique concentré pendant 3 minutes. Les graines sont rincées dans de l'eau distillée stérile, imbibées dans l'eau physiologique stérile pendant 3 heures, puis mises à germer dans des boîtes de Pétri à l'obscurité à 15°C. Après germination, les jeunes plantules sont transférées dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu Fahraeus [12] semi-solide, à pH6,5. Après 6 jours, les tubes sont inoculés à raison de 10⁸ bactéries par ml de la souche à tester. Pour chaque isolat, 5 tubes inoculés et un témoin non-inoculé sont préparés. A partir de 4 semaines d'incubation, les plantes sont régulièrement contrôlées pour détecter l'apparition des nodules au niveau de leur système racinaire.

Pour analyser la spécificité de nodulation, des tests de nodulation croisée ont été effectués dans des tubes Gibson contenant le milieu nutritif de Jensen [12], à pH6,7. Trois tubes sont préparés pour chaque isolat. Le protocole utilisé pour la germination et l'inoculation est identique à celui des tests d'authentification des isolats. L'incubation des plantes inoculées a lieu dans une chambre de culture dans les conditions suivantes : Jour : période de 16 heures, 22°C de température, 60% d'hygrométrie ; Nuit : période de 8 heures, 18°C de température, 65% d'hygrométrie.

Caractérisation phénotypique des souches

Caractéristiques culturelles

Elles ont été étudiées sur milieu YM solide ou liquide, et incubation à 28°C. Le temps d'apparition des premières colonies et les caractéristiques morphologiques sont relevés pour chaque souche. Les tolérances des souches ont été testées aux pH 4, 5, 6, 8, 9, 10, aux salinités de 85 mM, 170 mM, 255 mM, 340 mM, 425 mM, 510 mM de NaCl et aux températures de 20, 25, 30, 37, 40 et 45°C. Les tubes sont ensemencés par 10⁶ bactéries par ml, prélevées d'une

préculture en phase exponentielle de croissance. La croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à 600 nm par rapport à un témoin non-inoculé.

Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques suivants : Doxycycline (3UI), Pénicilline(6µg), Kanamycine (30UI), Chloramphénicol (30µg), Sulfamides (200µg), Spiramycine (100µg), Néomycine(30UI), Ampicilline (10µg), Amoxicilline (25µg), Bacitra-cine (10UI), Pristinamycine (15µg) a été effectué sur milieu Müller-Hinton, selon les normes du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. La résistance (R) ou la sensibilité (S) est déduite par mesure du diamètre de la zone d'inhibition.

Assimilation des sucres et acides aminés

Les sucres suivants ont été testés à 0,1%, dans le milieu YM exempt de toute source de carbone : Glucose, Lactose, Galactose, Mannose, Melibiose, Cellobiose, Raffinose, Rhamnose, Dextrine, Trehalose, Dulcitol, Glycérol, Inositol, Sorbose. Les acides aminés suivants ont été testés, à 1g/l dans le milieu YM sans extrait de levure : Acide Aspartique, Histidine, L-Méthionine, L-Arginine, DL-Phénylalanine, L-Lysine, DL-Thréonine, Glycine, Serine, DL-Alanine, L-Isoleucine. Les tubes sont ensemencés par 10⁶ bactéries par ml, prélevées d'une préculture en phase exponentielle de croissance. La croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à 600 nm par rapport à un témoin non-inoculé.

Analyse statistique des résultats

Le traitement des résultats des tests est effectué par le programme informatique d'analyse statistique Statistica (Version 5, Statsoft, France) qui calcule les distances génétiques entre les différentes souches étudiées et leur regroupement en clusters dans une matrice de similarité, en utilisant le coefficient de Pearson (r). Les résultats de cette analyse sont représentés sous forme d'un dendrogramme.

RESULTATS ET DISCUSSION

Isolement des souches et tests de nodulation

Dans le tableau 1 sont indiqués l'ensemble des isolats, les souches nodulant chaque plante-hôte, ainsi que les résultats des tests de nodulation croisée. 25 souches bactériennes ont été isolées et purifiées à partir des nodules des 4 espèces de *Medicago*, comme suit : 5 chez *M. polymorpha*, 5 chez *M. arabica* ; 7 chez *M. minima* et 8 chez *M. orbicularis*. Les tests de nodulation ont montré que seuls 10 isolats forment des nodules sur leurs plantes-hôtes d'origine, suggérant ainsi leur appartenance à la famille des *Rhizobiaceae*. Les résultats des tests de nodulation croisée ont montré que BP5, BA3, BM1 et BO4 semblent spécifiques de leurs plantes-hôtes puisqu'elles ne nodulent pas les autres *Medicago* testées, alors que BM2 nodule *M. arabica* et BO3 donne des petits nodules chez *M. polymorpha*. BO4 ne nodule pas les autres *Medicago*, mais induit une nette stimulation du système racinaire chez *M. polymorpha*, ainsi qu'un développement plus important des parties aériennes (5-6 feuilles par plante au lieu de 3 pour les autres inoculations) ; il s'agirait d'un effet PGPR (Plant

Isolats	Plante-hôte	Souches nodulantes	Nodulation croisée
BP1,BP2,BP3,BP4, BP5	<i>M. polymorpha</i>	BP5	Aucune
BM1,BM2,BM3, BM4,BM5,BM6, BM7	<i>M. minima</i>	BM1 BM2 BM3 BM5	Aucune <i>M. arabica</i> Non testée Non testée
BO1,BO2,BO3, BO4,BO5,BO6, BO7,BO8	<i>M. orbicularis</i>	BO1 BO3 BO4 BO7	Non testée <i>M. polymorpha</i> Aucune Non testée
BA1,BA2,BA3,BA4 BA5	<i>M. arabica</i>	BA3	Aucune

Tableau 1: Souches isolées des 4 espèces de *Medicago* et résultats des tests de nodulation.

growth Promoting rhizobacteria) [13]. Il ressort de cette étude que 15 isolats ne sont pas infectifs sur leurs plante-hôtes dans nos conditions. Ce faible taux de nodulation pourrait être lié à l'inadéquation de la technique de nodulation utilisée. En effet, il n'y aurait pas de technique de nodulation universelle compatible avec toutes les Légumineuses et tous les *Rhizobiaceae*, certaines sont efficaces pour quelques espèces et pas pour d'autres [14]. D'autre part, ces souches dont les caractères externes suggèrent leur appartenance aux *Rhizobiaceae*, ont probablement perdu leur pouvoir infectif durant les repiquages et la conservation. Selon de Lajudie et al.[15], les souches incapables d'induire des nodules ou des tumeurs sur leurs plante-hôtes seraient des *Agrobacterium* biovar1. L'analyse des inoculations croisées montre que BP5, BO4, BM1 et BA3 ont un spectre d'hôte restreint, de même pour BM2 et BO3 qui ne nodulent qu'une seule *Medicago*, autre que leur plante-hôte. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Rome et al.[8] sur la remarquable spécificité de nodulation des isolats obtenus à partir de certaines *Medicago* annuelles.

Caractérisation phénotypique

L'ensemble des résultats de cette caractérisation phénotypique est résumé dans le tableau 2.

Caractères morphologiques et culturels

Les colonies des 10 souches sont de morphologie et d'aspects très variés. L'ensemble de ces résultats montre que les 10 souches étudiées peuvent être réparties en 2 groupes : Le premier groupe, formé par BO1, BO3, BO4, BO7, BM1, BM2 et BP5 comporte des souches apparentées aux rhizobia à croissance rapide. Le second groupe est constitué par les souches BM3, BM5 et BA3 apparentées à des bradyrhizobia [2]. Cette variabilité des caractéristiques morphologiques et culturelles des 10 souches de rhizobia montre leur diversité phénotypique.

Tolérance aux pH, salinité et température

Toutes les souches sont capables de croître entre pH5 et pH10. A pH4, seule BA3 s'y développe. Leur croissance n'est pas affectée dans un intervalle de salinité de 85 mM à 510 mM de NaCl, sauf pour BM3 et BM5 inhibées à 510 mM de NaCl. D'autre part, les souches sont capables de

croître entre 20 et 37°C, avec un optimum de croissance entre 25°C et 30°C correspondant à celui indiqué pour les rhizobia par Jordan [2]. A 40°C, la croissance de BA3, BO1, BO3 et BO7 est inhibée, alors qu'à 45°C, il n'y a aucune croissance. D'un point de vue physiologique, la tolérance à des pH de l'ordre de 4 a été signalée pour des souches appartenant aux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* [16]. Certains auteurs considèrent que la tolérance aux pH acides comme une adaptation à des sols acides [17]. Pour la salinité, nos résultats sont en accord avec ceux de El Sheikh [18] montrant que les rhizobia à croissance rapide sont plus osmotolérants que les rhizobia à croissance lente, en l'occurrence BM3 et BM5. Lindström et Lehtomäk [19] ont montré que *Sinorhizobium meliloti* tolère une salinité de 340 mM de NaCl, alors que d'après Zhang et al. [20], les rhizobia à croissance rapide tolèrent une salinité de 510 mM de NaCl. Une variabilité intra-spécifique de l'osmotolérance a été mise en évidence parmi les souches de *Sinorhizobium meliloti* [21]. Pour la thermotolérance, elle est très variable parmi les espèces et les souches de rhizobia [19]. Sur la base de ces données, la majorité de nos souches seraient apparentées à *Sinorhizobium meliloti*.

Antibiogramme

Il révèle que toutes les souches sont sensibles à la doxycycline et la kanamycine, et résistantes à la pénicilline ; par contre, elles se comportent différemment vis à vis des 8 autres antibiotiques testés. Sur les 110 tests effectués, 76 ont révélé une sensibilité totale ou intermédiaire chez les souches et 34 tests une résistance. Les souches BM3 et BM5 s'avèrent les plus résistantes, montrant que les rhizobia à croissance rapide sont plus sensibles aux antibiotiques que les rhizobia à croissance lente [22].

Assimilation des sucres et acides aminés

Pour l'utilisation des sucres, à l'exception du lactose pour BM3 et BM5, de la dextrine pour BM5, et du sorbose pour BA3 et BO7, les autres souches assimilent tous les sucres testés, indépendamment de leur structure chimique. Il semble que les souches n'aient pas de préférence particulière, néanmoins BM3 et BM5 n'assimilent pas le lactose, ce qui confirme les résultats de Sadowsky et al. [23] qui a rapporté l'incapacité d'utiliser le lactose par les rhizobia à croissance lente. Pour les autres souches, elles présentent des exigences en substrats carbonés qui sont caractéristiques des rhizobia à croissance rapide [17,7] ; de ce point de vue, elles seraient apparentées aux genres *Rhizobium* et/ou *Sinorhizobium*. Par ailleurs, les résultats montrent que la majorité des acides aminés testés sont utilisés par les souches ; seuls 7 tests sur les 110 effectués se sont révélés négatifs, il s'agit de : l'aspartate pour BM2 et BO7, l'histidine pour BP5, BM2, BO4 et BO7, la glycine pour BM1. Il en ressort que les souches BM3 et BM5 n'ont pas d'exigences particulières.

Taxonomie numérique

Le dendrogramme obtenu (Fig. 1) montre qu'à une distance d'agrégation de 0.40, les 10 souches se répartissent

Caractéristiques	Cluster 1					Cluster 2		Cluster 3	Cluster 4	
	BP5	BO4	BM2	BO7	BM1	BO1	BO3	BA3	BM3	BM5
Souches										
Ières colonies : 24-48h: + de 72h:	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Diamètre (mm) couleur	1 Bl	0.5 Bl	0.5 Bl	0.7 Bl	0.9 Bl	0.5 Bl	0.5 Bl	0.8 Ora	0.5 Rou	0.5 Rou
Production de mucus	+	+	+	+	+	±	±	-	-	-
Nodulation croisée	-	-	M.ara	NT	-	NT	M.pol	-	NT	NT
pH4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
pH5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
85 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
170 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
255 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
340 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
425 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
510 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
T°20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T°25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T°30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T°37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T°40°C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
T°45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doxycycline	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Pénicilline	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Kanamycine	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Chloromphénicol	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
Sulfamides	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
Spiramycine	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R
Néomycine	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R
Ampicilline	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R
Amoxicilline	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R
Bacitracine	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R
Pristinamycine	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
Aspartate	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Histidine	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
L-Méthionine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-Phénylalanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Lysine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-Thréonine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycine	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Serine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Isoleucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mélibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Tréhalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycérol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbose	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+

- : croissance négative ; + : croissance positive ; ± : croissance faible ; NT : non testé ; M. : *Medicago* ; ara : *arabica* ; pol : *polymorpha* ; Bl : Blanchâtre ; Ora:Orange ; Rou : Rougeâtre

Tableau 2: Récapitulatif de l'ensemble des caractéristiques phénotypiques des souches de rhizobia.

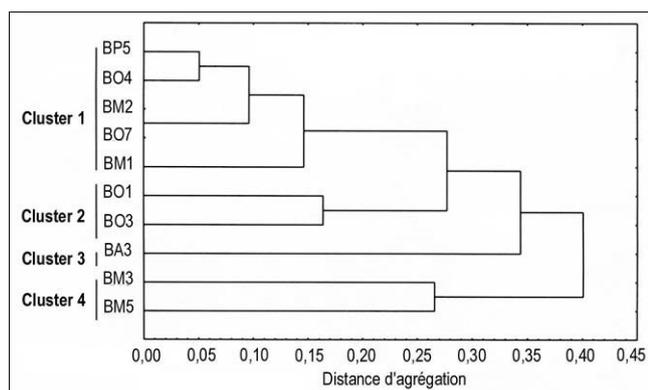


Figure 1: Dendrogramme représentant la similarité phénotypique entre les souches de rhizobia.

en 4 clusters différents, dont les caractéristiques phénotypiques sont regroupées dans le tableau 2: Le cluster 1 formé à une distance d'agrégation de 0.15, est composé par 5 souches très apparentées : BP5 isolée de *M. polymorpha*, BO4 et BO7 de *M. orbicularis*, BM1 et BM2 de *M. minima*. Il y a une complète similitude entre BO7 et BM2; ces 2 souches seraient identiques. Le cluster 2, constitué à une distance de 0.17, regroupe BO1 et BO3 isolées de *M. orbicularis*. Le cluster 3 représenté par une seule souche BA3 isolée de *M. arabica*. Le cluster 4 regroupe BM3 et BM5 isolées de *M. minima*, à une distance de 0.27. Cette analyse des caractéristiques phénotypiques montre que les 4 clusters sont formés à un faible niveau de similarité, indiquant la diversité phénotypique des rhizobia associés aux *Medicago* annuelles étudiées dans la vallée de la Soummam. Cette diversité se retrouve au niveau des souches isolées à partir de la même plante : en effet, les 4 souches isolées de *M. minima* appartiennent à des clusters et des sous-clusters différents, il en est de même pour celles isolées de *M. orbicularis*. La souche BA3 de *M. arabica* est éloignée des autres souches, alors que BP5 de *M. polymorpha*, est très apparentée à BO4 de *M. orbicularis*.

CONCLUSION

La biodiversité des rhizobia associés à certaines *Medicago* annuelles a été déjà mise en évidence par une approche phénotypique et confirmée par des études génotypiques [11,7]. Pour mieux cerner le statut taxonomique des rhizobia isolés de *Medicago* annuelles de la vallée de la Soummam et compléter les résultats de l'analyse phénotypique, des études portant sur la caractérisation des isolats par SDS-PAGE des protéines totales et une analyse génotypique par PCR/RFLP de la région 16S-ITS de l'opéron ribosomique sont en cours.

REFERENCES

- [1]- Stackebrandt E., Murray R.G.E., Truper H.G., "Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the purple bacteria and relatives", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38 (1988), pp. 321-325.
- [2]- Jordan D.C., "Rhizobiaceae", *In* Bergey's manual of systematic bacteriology, N.R. Krieg and J.C. Holt (ed.), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, vol.1, (1984), pp.234-254.
- [3]- Colwell R.R., "Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio* : numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species", *J. Bacteriol.*, 104 (1970), pp.410-433.
- [4]- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kesters K., Swings J., "Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics", *Microbiol. Rev.*, 60 (1996), pp.407-438.
- [5]- Allen O.N., Allen E.K., "The Leguminosae : a source book of characteristics, uses and nodulation", University of Wisconsin Press, Madison, USA (1981), pp.21-25.
- [6]- Lesins K., Lesins I., "Genus *Medicago* (Leguminosae). A taxogenic study", Junk, The Hague, The Netherlands (1979).
- [7]- de Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewetting D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.D., Dreyfus B., Kesters K., Gillis K., "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 (1994), pp.715-733.
- [8]- Rome S., Fernandez M.P., Brunel B., Normand P., Cleyet J.-C., "*Sinorhizobium medicae* sp. Nov., isolated from annual *Medicago* spp.", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46 (1996), pp.972-980.
- [9]- Van Berkum P., Beyene D., Bao G., Campbell T.A., Eardly B.D., "*Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbiosis with *Medicago ruthenica*", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48 (1998), pp.13-22.
- [10]- Ai Min Yan, En Tao Wang, Feng Ling Kan, Zhi Yuan Tan, Xin Hua Sui, Barbara Reinhold-Hurek, Wen Xin Chen, "*Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. in arid saline soils in Xinjiang, China", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50 (2000), pp.1887-1891.
- [11]- Brunel B., Rome S., Ziani R., Cleyet J.C., "Comparison of nucleotide diversity and symbiotic properties of *Sinorhizobium meliloti* populations from annual species of *Medicago*", *FEMS. Microbiol. Ecol.*, 19 (1996), pp.71-82.
- [12]- Vincent J.M., "The manual for the practical study of root nodule bacteria", Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, United Kingdom (1970).
- [13]- Reinhold-Hurek B., Hurek T., "Life grasses : diazotrophic endophytes", *Trends Microbiol.*, 6 (1998), pp.139-144.
- [14]- Zehri K., "Diversité phénotypique et génotypique des rhizobia isolés de régions arides et sahariennes du Maroc nodulant quatre espèces d'Acacia : *A. cyanophylla*, *A. gummifera*, *A. horrida* et *A. tortilis* sub-espèce *raddiana*", Thèse de Doctorat es-sciences Biologie, Microbiologie, Université Mohammed V-AGDAL de Rabat, Maroc (2000).
- [15]- de Lajudie P., Willems A., Nick G., Molouba F., Hoste B., Torck B., Neyra M., Lindström K., Collins M.T., Dreyfus B. L., Gillis M. "Characterisation of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium* sp. Nov.", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48 (1998a), pp.369-382.
- [16]- Aurag J., and Sasson A., "Tolerance of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity and drought", *W.J. Microbiol. Biotechnol.*, 8 (1992), pp.532-533.
- [17]- Nour S.M., Fernandez M., Normand P., Cleyet-Marel J.C., "*Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.)", *Int. J. Syst. Bact.*, 44 (1994), pp.511-522.
- [18]- El Sheikh E.A.E., Wood M., "Response of chickpea and soybean Rhizobia to salt : osmotic and specific ion effects of salts", *Soil Biol. Biochem.*, 217 (1989), pp.889-895.
- [19]- Lindström K., Lehtomäki S., "Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of

- Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia", *FEMS Microbiol Lett.*, 50 (1988), pp.277-287.
- [20]- Zhang, X., Harper R., Karsisto M., Lindstrom K., "Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from root nodules of leguminous trees", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41(1991), pp.104-113.
- [21]- Kassem M., Capellano A., Gounot A.M., "Effets du chlorure de sodium sur la croissance *in vitro*, l'inféctivité et l'efféience de *Rhizobium meliloti*", *MIRCEN Journal*, 1 (1985), pp.63-75.
- [22]- Elkan G.H., "Taxonomy of rhizobia", *Can. J. Microbiol.*, 38 (1992), pp.446-450.
- [23]- Sadowsky M.J., Keyser H.H., Ben Bohlool B., "Biochemical characterisation of fast and slow-growing rhizobia that nodulate soybeans", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32 (1983), pp.716-722. □