

Caractérisation des souches de Rhizobium du pois chiche
(Cicer arietinum L.) isolées de différents sols du Maroc.

Par EL Bekkay BERRAHO

Département de Biologie, Faculté des Sciences

B.P. 1014 - Rabat - Maroc -

RESUME

Une collection de 152 souches de Rhizobium pouvant induire la formation de nodosités sur les racines du pois chiche (Cicer arietinum L.) a été constituée, après l'isolement des souches d'échantillons de sols provenant de différentes régions bioclimatiques du Maroc.

L'étude de l'efficacité a permis de classer 54 souches selon leur capacité fixatrice d'azote. 97,5% des souches étudiées avaient une croissance lente et un temps de génération supérieur à 7 heures. La température maximale de croissance de la majorité des souches est d'environ 35°C. Le pH optimum de croissance des souches est neutre ou légèrement acide. La diversité sérologique au sein de cette espèce de Rhizobium est notoire. La distribution des sérogroupes, la thermotolérance et la sensibilité des souches aux différents pH sont indépendants des conditions édaphoclimatiques d'origine.

INTRODUCTION

L'amélioration de l'intensité de la fixation de l'azote atmosphérique par la symbiose légumineuse-Rhizobium comprend la sélection des souches de Rhizobium très infectives (ayant l'aptitude à former des nodosités sur les racines de la plante hôte), très efficaces (pouvant fixer l'azote) et très compétitives (ayant une bonne infectivité en présence d'autres souches de la même espèce et pouvant survivre au sein d'une microflore diversifiée); elle comprend aussi la sélection de cultivars spécifiques, génétiquement compatibles avec ces souches.

Il existe cependant d'autres facteurs d'ordre mésologique qui constituent le plus souvent des contraintes pour le développement des légumineuses et la multiplication des souches de Rhizobium introduites dans le sol. Le pH des sols, la température, l'humidité, jouent un rôle primordial dans l'établissement de la symbiose légumineuse-Rhizobium. Pour que la fixation d'azote et le rendement de la culture soient meilleurs, il faut prendre en considération la relation (légumineuse-Rhizobium-milieu) et pas seulement les deux partenaires de la symbiose.

Au Maroc, le pois chiche est, après la fève et la lentille, la légumineuse la plus consommée. Jusqu'à présent, les études faites sur cette légumineuse dans le but d'améliorer son rendement (8,5 à 9 Qx/ha) n'ont été que des enquêtes auprès des agriculteurs sur les techniques culturales ou bien ont consisté à faire des analyses chimiques des sols afin de déterminer la nature et la qualité des engrais à utiliser. Il nous a donc semblé qu'une meilleure connaissance du Rhizobium spécifique du pois chiche, naturellement présent dans les sols du Maroc, était un facteur important pour permettre l'amélioration des rendements de cette légumineuse.

Le climat du Maroc est un climat méditerranéen tempéré à influence atlantique qui rend possible la culture du pois chiche dans de vastes régions du pays. L'existence de six étages bioclimatiques (saharien, aride, semi-aride, subhumide, humide et étage des hautes montagnes) nous a conduit à envisager une étude écologique du Rhizobium du pois chiche et, en premier lieu, à examiner sa répartition dans les sols de ces différents étages. Nos investigations ont donc permis d'isoler un certain nombre de souches de Rhizobium du pois chiche des sols des étages bioclimatiques saharien, aride, semi-aride et subhumide et de les identifier; d'évaluer leur capacité fixatrice d'azote afin de repérer les souches les plus efficaces qui pourraient servir à inoculer la légumineuse; d'étudier leur croissance et leur sensibilité à des pH et à des températures différents; de les caractériser sérologiquement et de les répartir en sérogroupes; d'examiner la corrélation éventuelle entre les différentes caractéristiques et propriétés des souches et les conditions édaphoclimatiques.

I - ISOLEMENT ET IDENTIFICATIONS DES SOUCHES DE RHIZOBIUM DU POIS CHICHE .

L'isolement des souches de Rhizobium est obtenu par la technique de l'infection de la plante hôte. Cette technique consiste à piéger le Rhizobium par la légumineuse cultivée dans des pots contenant les sols originaires des quatre étages bioclimatiques saharien, aride, semi-aride et subhumide du Maroc.

En l'absence de critère biochimique absolu, le seul critère d'appartenance au genre Rhizobium est la capacité des souches isolées de provoquer

la formation de nodosités observables sur les racines de la légumineuse d'origine (en environnement stérile) après réinoculation.

Au total, 168 souches de Rhizobium ont été isolées à l'aide des variétés de pois chiche p.ch. 34 et p.ch. 37; seize d'entre elles ont été éliminées par le test d'identification.

II - ETUDE DE L'INFECTIVITE ET DE L'EFFICIENCE DES SOUCHES DE RHIZOBIUM DU POIS CHICHE .

Sur les 152 souches de Rhizobium isolées, 54 ont été testées pour leur infectivité et leur efficacité .

L'évaluation de l'infectivité d'une souche peut être faite en dénombrant les nodosités induites par la souche sur les racines de la plante hôte.

L'efficacité des souches de Rhizobium peut être évaluée de façon satisfaisante en déterminant le poids de matière sèche des parties aériennes des plantes inoculées avec ces souches et en comparant les résultats obtenus à ceux des témoins (plantes non inoculées et aux quelles on apporte de l'azote combiné ou non). Lorsque l'azote est le seul facteur limitant de la croissance, la teneur en azote total et le rendement en matière sèche présentent une corrélation nette (Erdman et Means, 1952; Brockwell et al., 1966, cités par Vincent, 1970). Chaque souche de Rhizobium est inoculée à seize plantules de taille uniforme, réparties dans 4 pots. Les pots sont ensuite recouverts avec du gravier stérile à fin de limiter l'évaporation de l'eau, réparties dans 4 blocs aléatoires complets et maintenus dans des conditions naturelles.

Sept semaines après l'inoculation, les plantes sont déracinées pour effectuer le dénombrement des nodosités et la détermination, du poids de matière sèche des parties aériennes.

Résultats :

Le tableau 1 récapitule les moyennes des résultats des tests réalisés pour évaluer l'infectivité et l'efficacité des souches de Rhizobium de pois chiche.

- Nombre de nodosités

Le nombre moyen de nodosités par pot est compris entre 113,25 pour la souche R.ch. 164 et 354 pour la souche R.ch. 109 qui apparaît la plus infectieuse. Malgré cet écart, l'analyse de la variance du nombre de nodosités ne montre pas de différence significative entre les souches; en revanche, la différence entre les blocs est hautement significative. Les 54 souches testées seraient donc équivalentes entre elles dans les conditions de l'expérience.

- Poids de matière sèche des parties aériennes.

On ne constate dans aucun cas une équivalence, ni par rapport au témoin azoté (TN), ni par rapport au témoin non inoculé et non azoté (T₀). Ces témoins constituent les limites supérieure et inférieure de la gamme de variation de toutes les souches .

L'efficacité relative, calculée par rapport à TN selon l'expression $\frac{P.S.i}{P.S.TN} \times 100$, montre que la souche R.ch.60 est la plus efficace avec un rendement en matière sèche en première position après le témoin azoté, alors qu'en dernière position avant le T₀ se trouve la souche R.ch. 151 la moins efficace (Fig.1)

TABLEAU 4 : EVALUATION DE L'INEFFICACITE ET DE L'EFFICACITE
DES SOUCHES.

essai		Nbre	P.F.	P.S.	P.S.	EFF.
traitement		Nod.	Nod.	Nod.	ptes (1)	relative %
R.ch.	1	122.75	1.877	0.227	2.392	36.56
" "	2	254.00	2.732	0.343	2.596	39.67
" "	3	237.25	3.590	0.498	3.114	47.59
" "	4	246.25	3.037	0.428	3.096	47.32
" "	5	252.25	2.981	0.373	2.897	44.27
" "	6	294.00	3.623	0.488	3.452	52.75
" "	7	186.25	2.484	0.309	2.295	35.07
" "	10	243.75	3.284	0.471	3.100	47.38
" "	11	164.75	1.499	0.252	2.886	44.10
" "	14	241.25	3.002	0.347	2.540	38.80
" "	16	258.25	2.926	0.433	3.479	53.18
" "	17	225.75	3.317	0.415	3.087	47.17
" "	18	285.75	3.028	0.365	3.560	54.40
" "	19	188.50	2.296	0.354	3.145	48.07
" "	20	244.75	2.486	0.241	2.973	45.28
" "	24	244.00	3.080	0.418	2.797	42.74
" "	27	187.00	2.667	0.331	2.504	38.27
" "	29	250.75	2.497	0.341	3.192	48.77
" "	35	161.25	2.177	0.291	2.326	35.54
" "	37	247.00	2.559	0.320	2.604	39.79
" "	40	178.25	2.793	0.314	2.607	39.84
" "	41	238.75	3.057	0.423	3.335	50.95
" "	42	225.50	2.156	0.311	3.029	46.29
" "	44	260.50	3.644	0.437	3.288	50.25
" "	46	217.00	3.279	0.398	2.281	34.86
" "	58	331.50	4.135	0.571	3.101	47.38
" "	59	255.75	4.825	0.573	2.659	40.64
" "	60	306.75	3.392	0.607	4.075	62.27
" "	62	283.50	4.436	0.558	2.391	36.54
" "	66	245.25	3.141	0.406	2.600	39.74
" "	68	177.75	2.406	0.311	2.595	39.65
" "	70	334.50	3.649	0.432	2.423	37.04
" "	71	286.75	3.710	0.487	2.931	44.80
" "	75	174.00	1.889	0.184	2.536	38.75
" "	102	268.50	2.627	0.458	3.809	58.20
" "	107	235.00	2.254	0.262	2.391	36.54
" "	109	354.00	3.305	0.487	2.992	45.74
" "	110	137.75	2.860	0.290	2.733	41.77
" "	111	241.75	2.585	0.381	3.094	47.28
" "	112	237.75	2.793	0.350	2.540	38.82
" "	113	286.75	3.783	0.539	3.469	53.02
" "	115	223.50	2.525	0.386	3.141	47.99
" "	133	290.25	3.284	0.480	3.355	51.28
" "	134	269.25	3.891	0.554	3.534	54.00
" "	142	251.25	2.655	0.421	3.215	49.13
" "	144	205.75	2.176	0.294	2.731	41.73
" "	148	305.00	2.266	0.322	3.133	47.88
" "	150	188.75	3.901	0.447	2.591	39.60
" "	151	276.00	2.349	0.315	2.231	34.10
" "	158	246.50	2.362	0.336	2.649	40.48
" "	160	199.50	4.099	0.539	2.631	40.21
" "	161	253.50	3.253	0.465	3.583	54.75
" "	162	201.75	3.421	0.427	3.030	46.30
" "	164	113.25	2.180	0.309	2.335	35.70
TN		0	0	0	6.5435	100.
TO		0	0	0	1.7176	26.21

Nbre Nod : Nombre de nodosités par pot (moyenne de 4 pots)

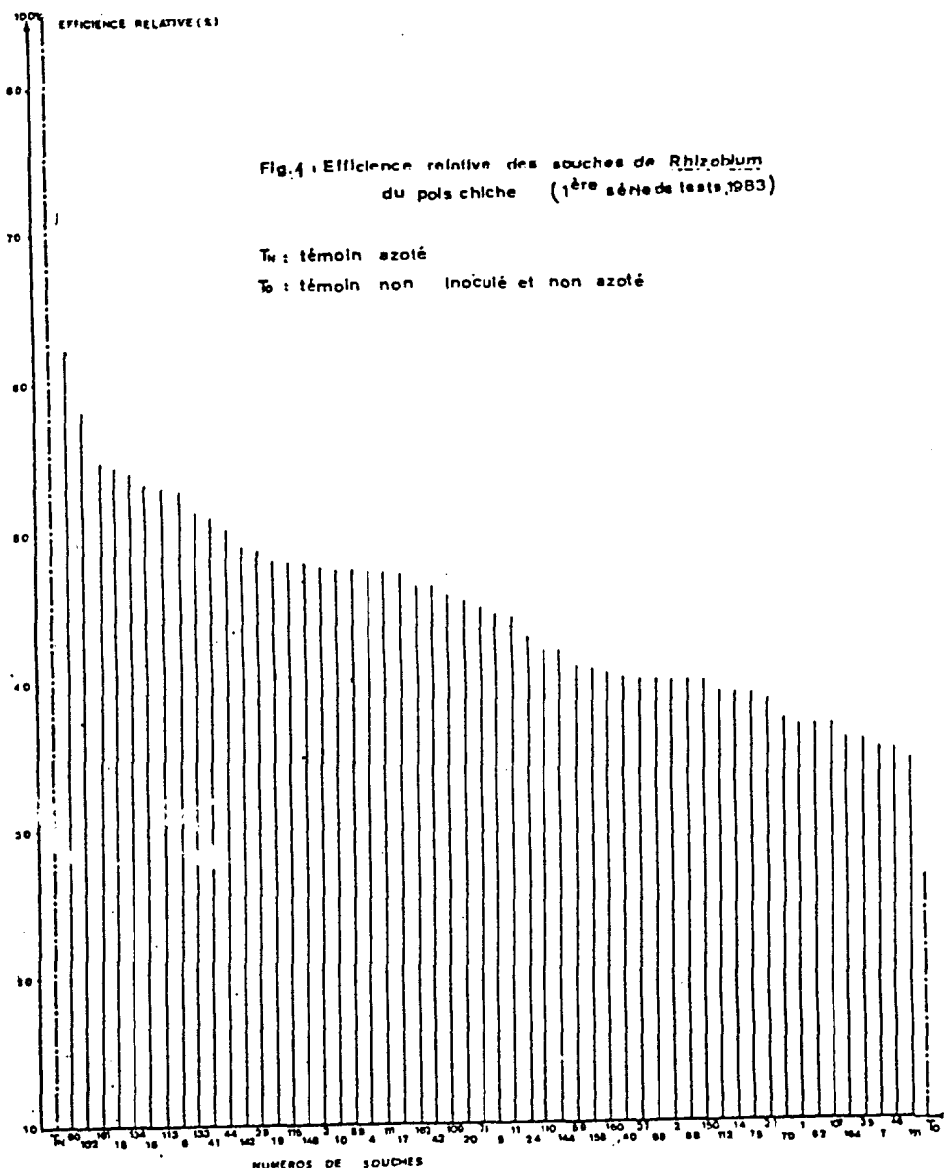
P.F. Nod : Poids frais des nodosités en g par pot

P.S. Nod : " " " " " " " "

P.S. ptes : " " des parties aériennes en g par pot (1)

Eff. relative : Efficacité relative des souches en %

$$\text{Eff. relative} = \frac{\text{P.S. i}}{\text{TN}} \times 100 \%$$



L'analyse de la variance des poids de matière sèche des parties aériennes montre un effet bloc hautement marqué et une différence significative entre les souches; la comparaison des moyennes à l'aide du test de Duncan montre qu'il existe 5 groupes de souches, entête du premier se trouve le TN et en queue du cinquième, se trouve le To.

Discussion:

Par rapport au témoin azoté qui représente le niveau 100% de matière sèche et le témoin zéro (non inoculé et non azoté) qui représente seulement 25,6%, toutes les souches testées ont permis un gain en matière sèche supérieur à celui de To. La souche moins efficace R.ch. 151 a provoqué un gain de 34,10% de matière sèche, alors que la souche la plus efficace R.ch. 60 a eu pour effet un accroissement de 62,27% du rendement en matière sèche.

L'augmentation du poids de matière sèche des plantes de pois chiche, inoculées avec diverses souches de Rhizobium spécifique, a été soulignée par de nombreux chercheurs Sundara Rao et al. (1969, cités par Patil et Medhane, 1974) ont constaté une augmentation du rendement du pois chiche, sous l'effet de l'inoculation de l'ordre de 17 à 131% par rapport à To. Rai et Singh (1979) et Khurana et Dudeja (1982) ont étudié l'interaction de quelques cultivars de pois chiche et de certaines souches de Rhizobium spécifique, ils ont constaté que toutes les combinaisons avaient permis une augmentation du nombre de nodosités, du poids sec des nodosités et des parties aériennes, de la concentration des nodosités en lég'hémoglobine et du rendement en graines.

III - ETUDE DES SOUCHES DE RHIZOBIUM DU POIS CHICHE EN CULTURE PURE

A- Croissance des souches.

Le Rhizobium du pois chiche a été généralement considéré comme appartenant à l'espèce Rhizobium leguminosarum à croissance rapide et sa plante hôte a été rangée dans le même groupe que le pois et la fève. (Simon, 1914, Vincent, 1974 (cités par Kingsley et Ben Bohloul, 1983). Ce pendant Gaur et Sen (1979) et Kingsley et Ben Bohloul (1983) proposent de classer Cicer arietinum et son Rhizobium spécifique dans un groupe d'inoculation distinct.

Nous avons observé la croissance de quatrevingt souches de Rhizobium de pois chiche, en suivant la variation de la densité optique des cultures en fonction du temps.

A l'exception de deux souches R.ch. 98 et R.ch.115 qui ont un temps de génération (T.G.) de 5H 18' et de 5H 13' (voir tableau 2), toutes les autres souches ont une croissance lente et leur T.G varie entre 6H 20' et 36H 10'.

La figure 2 nous montre que les souches à croissance lente peuvent être réparties en deux ensembles: huit souches dont le T.G varie entre 16H et 36H et un ensemble renferme 87,5% des souches dont le T.G. est compris entre 7H et 15H.

En conclusion, 97,5% des souches de Rhizobium du pois chiche que nous avons isolées de différents sols du Maroc ont une croissance lente et seulement 2,5% d'entre elles ont une croissance rapide. Bien que Norris (1964, cité par Zablotowicz et al. 1981) ait avancé l'hypothèse que les Rhizobium à croissance rapide se trouvent de préférence dans les sols des régions tempérées, alors que les Rhizobium à croissance lente seraient surtout abondants dans les régions tropicales humides, il ne nous est pas possible d'établir une relation entre la vitesse de croissance des souches de Rhizobium du pois chiche et les conditions bioclimatiques de leur sols d'origine.

Tableau 2. Temps de génération des souches de Rhizobium
du pois chiche isolées des sols du Maroc.

N° souche	Temps de génération	N° souche	Temps de génération	N° souche	Temps de génération	N° souche	Temps de génération	N° souche	Temps de génération
R.ch. 1	11 ^H 45'	42	8 ^H 22'	98	5 ^H 18'	140	19 ^H 06'		
2	11 ^H 50'	44	8 ^H 33'	99	12 ^H 41'	142	14 ^H 23'		
3	14 ^H 30'	46	14 ^H 15'	102	6 ^H 21'	144	14 ^H 33'		
4	11 ^H 57'	58	6 ^H 45'	105	25 ^H	148	18 ^H		
5	9 ^H 30'	59	11 ^H 02'	107	13 ^H 39'	150	24 ^H 57'		
6	11 ^H	60	9 ^H 50'	109	15 ^H 03'	151	19 ^H 14'		
7	10 ^H 20'	62	11 ^H 30'	110	36 ^H 10'	158	9 ^H 30'		
10	8 ^H 58'	66	9 ^H 20'	111	10 ^H 25'	160	27 ^H 26'		
11	10 ^H 30'	68	11 ^H 32'	112	14 ^H	161	11 ^H 30'		
14	8 ^H 31'	70	11 ^H 48'	113	10 ^H 39'	162	11 ^H 30'		
16	10 ^H 03'	71	9 ^H 30'	115	5 ^H 13'	164	6 ^H 48'		
17	14 ^H	75	13 ^H 41'	119	7 ^H 27'				
18	11 ^H 30'	78	7 ^H 34'	125	12 ^H 12'				
19	12 ^H 20'	97	12 ^H 30'	126	13 ^H				
20	12 ^H 03'	80	9 ^H 14'	127	9 ^H 14'				
24	12 ^H 50'	81	7 ^H	128	16 ^H 21'				
27	14 ^H 57'	82	8 ^H 42'	129	11 ^H				
29	8 ^H 55'	84	9 ^H 32'	130	7 ^H 04'				
32	9 ^H 03'	85	9 ^H 50'	131	12 ^H 11'				
35	12 ^H 40'	94	8 ^H 03'	132	11 ^H 09'				
37	11 ^H 06'	95	9 ^H 01'	133	9 ^H 50'				
40	12 ^H 05'	96	8 ^H 25'	134	13 ^H 10'				
41	8 ^H 06'	97	11 ^H 15'	139	11 ^H 10'				

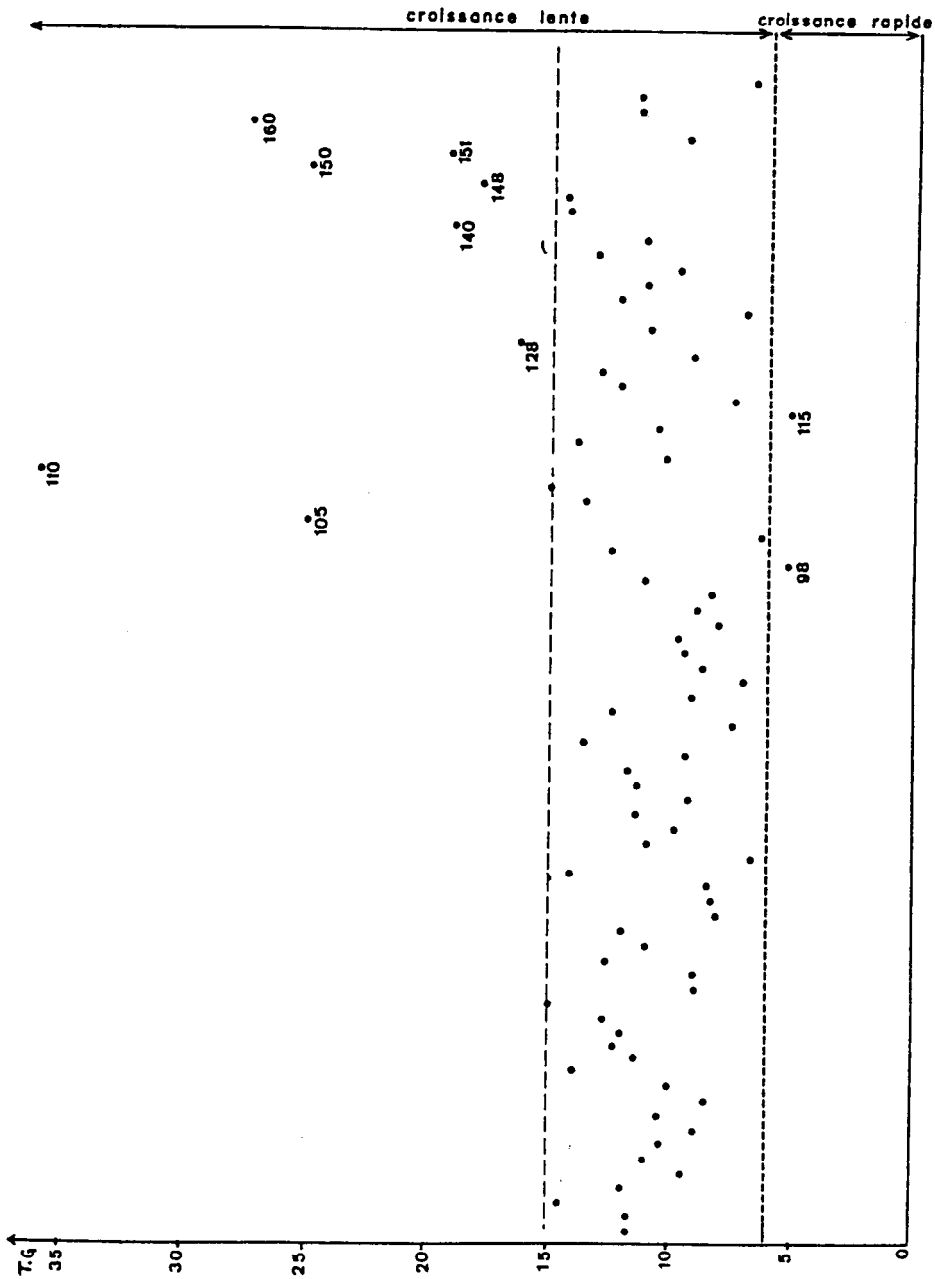


Fig. 2. — Distribution des souches de Rhizobium du pois chiche en fonction de leur temps de génération.

B- Effet de la température

Pour étudier la tolérance thermique des souches que nous avons isolées, nous les avons cultivées dans des tubes à essai contenant du milieu HAM liquide à pH 7 et disposés en position inclinée sur une table agitée dans une étuve à 25°C, 30°C, 35°C, 40°C et à 45°C.

Nos observations récapitulées dans le tableau 3 montrent que toutes les souches de Rhizobium du pois chiche ont une bonne croissance à 25°C et à 30°C

A 35°C, les souches se répartissent en 3 groupes: le premier comprend 32 souches (40%) dont la croissance est complètement inhibée, le second regroupe 35 souches (43,75%) qui croissent très lentement, le troisième groupe renferme 13 souches (16,25%) qui croissent convenablement à cette température.

A 40°C, seules les souches qui ont bien poussé à 35°C continuent de croître à cette température: sept d'entre elles ont une faible croissance, quatre ont une croissance moyenne et une seule souche a une croissance satisfaisante.

A 45°C, seule la souche R. ch. 82 continue à croître.

Nos résultats permettent de supposer que la limite thermique de la croissance des souches de Rhizobium du pois chiche est comprise entre 30°C et 35°C pour la plus part des souches.

A l'instar des travaux de certains chercheurs (Wilkins, 1967 et El Essawi et Abdel Ghaffar, 1967) qui ont conclu que le climat d'origine était probablement responsable de l'adaptation ou non des souches à des températures élevées, nous avons essayé de voir si une corrélation pouvait exister entre la thermotolérance des souches de Rhizobium du pois chiche et les conditions bioclimatiques de leur sols d'origine.

La croissance de 83,75% des souches est complètement ou partiellement inhibée à 35°C et ces souches ont été isolées des sols des quatre étages bioclimatiques. Les souches qui ont présenté une bonne croissance à 35°C proviennent pour quatre d'entre elles de l'étage subhumide, pour une d'entre elle de l'étage saharien et pour huit d'entre elles de l'étage aride.

A 40°C les souches qui ont pu croître proviennent de l'étage subhumide et de l'étage aride. Celles qui ont présenté une croissance moyenne ou satisfaisante proviennent surtout de l'étage aride.

A 45°C seule la souche R.ch. 82, isolée d'un sol aride, croît encore à cette température.

En dépit de la relative prédominance des souches provenant des régions arides parmi les souches tolérantes à 40°C, il ne semble pas exister une corrélation nette entre la thermotolérance des souches de Rhizobium du pois chiche et les conditions bioclimatiques de leurs sols d'origine.

C - Effet du pH.

L'étude de la sensibilité des souches de Rhizobium du pois chiche aux différents pH a été réalisée dans des tubes à essai contenant le milieu HAM liquide ajusté à pH 4, 5, 6, 7, 8, et à pH 9.

Les résultats obtenus et récapitulés dans le tableau 4 montrent que le pH 4 est létal pour toutes les souches et que celles-ci sont plus tolérantes au pH 5 qu'aux pH 8 et 9.

Pour la majorité des souches de Rhizobium du pois chiche, le pH optimal de croissance est un pH neutre ou légèrement acide (6-7). Il est toute fois

Tableau 3. Effet de la température sur la croissance de souches de Rhizobium du pois chiche

N° souche	25°	30°	35°	40°	45°	N° souche	25°	30°	35°	40°	45°
R.ch. 1	3+	3+	-	-	-	84	3+	3+	3+	2+	-
2	3+	3+	1+	-	-	85	3+	3+	3+	1+	-
3	3+	3+	-	-	-	94	3+	3+	1+	-	-
4	3+	3+	1+	-	-	95	3+	3+	1+	-	-
5	3+	3+	-	-	-	96	3+	3+	1+	-	-
6	3+	3+	-	-	-	97	3+	3+	-	-	-
7	3+	3+	1+	-	-	98	3+	3+	1+	-	-
10	3+	3+	1+	-	-	99	3+	3+	1+	-	-
11	3+	3+	1+	-	-	102	3+	3+	-	-	-
14	3+	3+	1+	-	-	105	3+	3+	-	-	-
16	3+	3+	1+	-	-	107	3+	3+	-	-	-
17	3+	3+	1+	-	-	109	3+	3+	-	-	-
18	3+	3+	1+	-	-	110	3+	3+	1+	-	-
19	3+	3+	1+	-	-	111	3+	3+	-	-	-
20	3+	3+	1+	-	-	112	3+	3+	-	-	-
24	3+	3+	-	-	-	113	3+	3+	1+	-	-
27	3+	3+	-	-	-	115	3+	3+	3+	1-	-
29	3+	3+	1+	-	-	119	3+	3+	3+	2+	-
32	3+	3+	3+	2+	-	125	3+	3+	1+	-	-
35	3+	3+	1+	-	-	126	3+	3+	1+	-	-
37	3+	3+	1+	-	-	127	3+	3+	1+	-	-
40	3+	3+	-	-	-	128	3+	3+	-	-	-
41	3+	3+	-	-	-	129	3+	3+	1+	-	-
42	3+	3+	1+	-	-	130	3+	3+	-	-	-
44	3+	3+	1+	-	-	131	3+	3+	1+	-	-
46	3+	3+	-	-	-	132	3+	3+	1+	-	-
58	3+	3+	-	-	-	133	3+	3+	-	-	-
59	3+	3+	-	-	-	134	3+	3+	1+	-	-
60	3+	3+	1+	-	-	139	3+	3+	-	-	-
62	3+	3+	-	-	-	140	3+	3+	-	-	-
66	3+	3+	-	-	-	142	3+	3+	3+	1+	-
68	3+	3+	-	-	-	144	3+	3+	1+	-	-
70	3+	3+	-	-	-	148	3+	3+	3+	1+	-
71	3+	3+	1+	-	-	150	3+	3+	1+	-	-
75	3+	3+	-	-	-	151	3+	3+	-	-	-
78	3+	3+	3+	1+	-	158	3+	3+	1+	-	-
79	3+	3+	3+	2+	-	160	3+	3+	-	-	-
80	3+	3+	3+	1+	-	161	3+	3+	-	-	-
81	3+	3+	-	-	-	162	3+	3+	2+	-	-
82	3+	3+	3+	3+	3+	164	3+	3+	3+	1+	-

- : Pas de croissance

2+ : Croissance moyenne

1+ : Croissance faible

3+ : Croissance satisfaisante

Tableau 4. Effet du pH sur la croissance des souches de Rhizobium du pois chiche.

N° souche	pH ₄	pH ₅	pH ₆	pH ₇	pH ₈	pH ₉	N° souche	pH ₄	pH ₅	pH ₆	pH ₇	pH ₈	pH ₉
R. ch. 1	-	3+	3+	3+	3+	-	84	1+	1+	1+	3+	3+	3+
2	-	3+	3+	3+	-	-	85	-	1+	2+	3+	3+	3+
3	-	3+	3+	3+	-	-	94	-	2+	3+	3+	1+	-
4	-	2+	3+	3+	-	-	95	-	3+	3+	3+	1+	-
5	-	-	3+	3+	-	-	96	-	3+	3+	3+	3+	1+
6	-	3+	3+	3+	-	-	97	-	1+	3+	3+	1+	-
7	-	1+	3+	3+	-	-	98	-	3+	3+	3+	2+	-
10	-	3+	3+	3+	-	-	99	-	3+	3+	3+	1+	-
11	-	3+	3+	3+	-	-	102	-	2+	3+	3+	1+	-
14	-	3+	3+	3+	-	-	105	-	-	3+	3+	-	-
16	-	1+	3+	3+	-	-	107	-	3+	3+	3+	1+	-
17	-	1+	3+	3+	-	-	109	-	3+	3+	3+	2+	2+
18	-	1+	3+	3+	-	-	110	-	-	3+	3+	-	-
19	-	1+	3+	3+	3+	-	111	-	-	3+	3+	-	-
20	-	2+	3+	3+	-	-	112	-	2+	3+	3+	-	-
24	-	-	3+	3+	-	-	113	-	3+	3+	3+	-	-
27	-	1+	3+	3+	1+	-	115	-	-	1+	3+	3+	3+
29	-	2+	3+	3+	-	-	119	-	1+	1+	3+	3+	3+
32	-	1+	1+	3+	3+	-	125	-	1+	3+	3+	-	-
35	-	2+	3+	3+	1+	-	126	-	-	3+	3+	-	-
37	-	1+	3+	3+	-	-	127	-	2+	3+	3+	3+	-
40	-	-	3+	3+	-	-	128	-	-	3+	3+	-	-
41	-	3+	3+	3+	-	-	129	-	2+	3+	3+	3+	-
42	-	3+	3+	3+	-	-	130	-	1+	3+	3+	3+	-
44	-	3+	3+	3+	-	-	131	-	3+	3+	3+	1+	-
46	-	3+	3+	3+	-	-	132	-	2+	3+	3+	1+	-
58	-	3+	3+	3+	-	-	133	-	2+	3+	3+	1+	-
59	-	3+	3+	3+	1+	-	134	-	2+	3+	3+	2+	-
60	-	3+	3+	3+	-	-	139	-	1+	3+	3+	-	-
62	1+	3+	3+	3+	2+	-	140	-	2+	3+	3+	-	-
66	-	3+	3+	3+	3+	3+	142	-	-	3+	3+	-	-
68	-	3+	3+	3+	-	-	144	-	-	3+	3+	-	-
70	-	3+	3+	3+	1+	-	148	-	-	3+	3+	-	-
71	-	1+	3+	3+	1+	-	150	-	-	3+	3+	-	-
75	-	1+	3+	3+	-	-	151	-	-	3+	3+	-	-
78	-	1+	1+	3+	3+	3+	158	-	1+	3+	3+	3+	-
79	-	1+	1+	3+	3+	3+	160	-	-	3+	3+	-	-
80	-	1+	3+	3+	3+	3+	161	-	3+	3+	3+	3+	-
81	-	3+	3+	3+	2+	-	162	-	3+	3+	3+	3+	-
82	-	3+	3+	3+	3+	1+	164	-	-	2+	3+	3+	3+

- : Pas de croissance

2+ : Croissance moyenne

1+ : Croissance faible

3+ : Croissance satisfaisante

possible de distinguer quatre types de souches. Le groupe de souches neutrophiles renferme 25 souches, soit 31,25% des souches; le second groupe comprend 13 souches (16,25%) indifférentes qui croissent dans des milieux aux pH compris entre 5 et 8 ou 9; le troisième groupe contient 12 souches (15%) qui ont une croissance satisfaisante aux pH basiques; le quatrième groupe comprend 30 souches (37,5%) dont la croissance est meilleure aux pH acides.

Il semble que la majorité des souches (12/15), isolées de sols légèrement acides, ont une meilleure croissance dans les milieux ayant un pH acide (8 souches) ou neutre (4 souches). En revanche, pour les 30 souches isolées de sols basiques (pH supérieur ou égal à 8), seules 14 souches croissent dans un milieu basique (9 souches) ou neutre (5 souches), alors que les autres souches sont indifférentes ou acidophiles.

Bien que la plus part des sols aient un pH supérieur à 7, les souches de Rhizobium du pois chiche isolées de ces sols ont tendance à mieux croître dans des milieux de culture ayant un pH neutre ou légèrement acide. Le pH du sol ne semble pas imposer de restriction à la croissance des Rhizobium qui en sont isolées, à un pH différent.

IV - CARACTERISATION SEROLOGIQUE DES SOUCHES DE RHIZOBIUM DU POIS CHICHE .

Pour caractériser sérologiquement les souches que nous avons isolées, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence qui combine la sensibilité de l'immunologie à la précision de la microscopie. Elle repose sur le fait qu'une souche bactérienne isolée, purifiée, concentrée et injectée à un animal, généralement un lapin, provoque chez celui-ci la production d'anticorps. Si ces anticorps sont mis en contact avec la bactérie qui a servi d'antigène, ils se fixent sur la paroi bactérienne par une réaction anticorps-antigène .

Pour visualiser cette réaction, les anticorps sont conjugués avec un fluorochrome qui donne une coloration vert brillant sous microscope à ultra-violet.

Après l'obtention du sérum, nous avons appliqué la technique d'immunofluorescence indirecte.

Nous avons préparés six sérums contre six souches de Rhizobium du pois chiche isolées de six régions suffisamment éloignées l'une de l'autre. Les résultats récapitulés dans le tableau 5 montrent que sur les 152 souches de la collection, 74 sont classées dans six sérogroupe. Le sérum 105 apparaît plus spécifique puisqu'il n'a réagi qu'avec la souche qui lui a servi d'antigène et une autre souche (R.Ch. 47), les autres sérums ont réagi avec un nombre plus ou moins important de souches.

La diversité sérologique des souches de Rhizobium du pois chiche est notoire et nos résultats confirment ceux de Chahal (1978), Dadarwal (1976) et Kingsley et Ben Bohloul (1983) qui ont constaté cette grande diversité antigénique.

Comme on a montré que la distributions de certains sérogroupe de Rhizobium japonicum présentaient une corrélation avec le pH du sol (Ham et al. 1971) ou avec la température (Weber et al. 1972), la teneur en azote organique ou minéral, le pH ou la concentration du sol en Mg^{++} (Bezdiccek, 1972), la température, l'humidité et l'exposition des versants (Mahler et al., 1980), nous avons recherché une telle corrélation entre la distribution des sérogroupe du Rhizobium de pois chiche et les propriétés physico-chimiques des sols d'où ont été isolées les souches.

Aucune corrélation marquée ne semble exister entre les sérogroupe et les propriétés édaphiques. Les souches d'un même sérogroupe peuvent se trouver dans

Tableau 5. Regroupement sérologique des souches de Rhizobium de pois chiche

Etage bioclimatique	Sérogroupe 1		Sérogroupe 29		Sérogroupe 79		Sérogroupe 105		Sérogroupe 150		Sérogroupe 161	
SUBHUMIDE	N° souche	Origine	N° souche	Origine	N° souche	Origine	N° souche	Origine	N° souche	Origine	N° souche	Origine
		18	GUICH	12	LOKOUSS	43	LOUKOUSS			150	S ¹ ALLAL TAZI	161
	30	"	44	"					149	"	157	"
	70	M'RISSA	71	M'RISSA					151	"	162	"
	156	S ¹ ALLAL TAZI	72	"					152	"	163	"
			74	"					153	"	144	CHAOUEN
			76	"					154	"	42	LOKOUSS
SEMI-ARIDE	1	MERCHOUCH	6	MERCHOUCH			47	OUED AMLIL	104	SETTAT	2	MERCHOUCH
	5	"	8	"					110	"	25	"
	21	"	9	"							67	MEKNES
	27	"	23	"							68	"
	107	SETTAT	19	EZ-ZHILIGA							69	"
	66	MEKNES	102	SETTAT							135	"
			109	"							136	"
ARIDE			7	FQUIH BEN SALAH	79p	BEN GUERIR					3	FQUIH B. SALAH
			15	"	79g	"					24	"
			28	"	100	"					87	MARRAKECH
			29	"	120	"					99	BEN GUERIR
			10	"	91	MARRAKECH						
			61	MEKNES	92	"						
			62	"	117	"						
			63	"								
			125	MARRAKECH								
			126	"								
			139	"								
			140	"								
SAHARIEN			94	OUARZAZATE			105	ER-RACHIDIA			93	OUARZAZATE
			95	"								
			131	"								

des sites très éloignés et dans des sols ayant des propriétés physico-chimiques différentes.

De même que pour la corrélation avec les conditions bioclimatiques, certains sérogroupe semblent être localisés dans un seul étage bioclimatique, c'est le cas des sérogroupe 79 et 150 que l'on trouve dans les étages aride et subhumide. Le sérogroupe 1 correspond aux étages subhumide et semi-aride, alors que les sérogroupe 29 et 161 semblent indifférents puisqu'ils se retrouvent dans les quatre étages bioclimatiques.

BIBLIOGRAPHIE

- BEZDICECK D.F., 1972. Effect of the soil factors on the distribution of *Rhizobium japonicum* serogroups. *soil sci. Am. Proc.*, 36, 305-307.
- CHAHAL V.P.S., JOSHI P.K., CHAHAL D.S., REWARI R.B., 1978. Studies on serotyping and competitiveness of different isolates of Gram-Rhizobium. *Ind. J. microbiol.*, 18, 3, 148-150.
- DADARWAL K.R., SHASHI P., TAURO P., 1976. Varietal differences with regard to *Rhizobium* compatibility and efficiency of nitrogen fixation in chick pea (*Cicer arietinum* L.). Proceeding of national symposium : Nitrogen assimilation and crop productivity, 235-243.
- EL ESSAWI T.M., Abdel-GHAFFAR A.S., 1967. Cultural and symbiotic properties of *Rhizobium* from Egyptian clover (*Trifolium alexandrinum*). *J. Appl. Bacteriol.*, 30, 354-361.
- GAUR Y.D., SEN A.N., 1979. Gross inoculation group specificity in *Cicer-Rhizobium* symbiosis. *New Phytologist*, 83, 745-754.
- HAM G.E., FREDERICK L.R., ANDERSON I.C., 1971. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean sampled in IOWA. *Agronomy J.*, 63, 69-72.
- KHURANA A.L., DUDEJA S.S., 1982. *Cicer-Rhizobium* interaction with different chick pea cultivars under field conditions. *Zbl. microbiol.*, 137. 207-213.
- KINGSLEY M.T., BEN BOHLOOL B., 1983. Characterization of *Rhizobium* Sp. (*Cicer arietinum* L.) by immunofluorescence, immunodiffusion and intrinsic antibiotic resistance. *Can. J. Microbiol.*, 29, 518-526.
- MAHLER R.L., BEZDICECK D.F., 1980. Serogroup distribution of *Rhizobium leguminosum* in pea in the palouse of Eastern Washington. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, 44, 292-295.
- PATIL P.L., MEDHANE N.S., 1974. Seed inoculation studies in gram (*Cicer arietinum* L.) with different strains of *Rhizobium* sp. *Plant and soil*, 40, 221-223.
- RAI R., SINGH S.N., 1979. Response of strains of *Rhizobium* on nodulation, grain yield, protein and amino-acids contents of chick pea (*Cicer arietinum* L.). *J. Agric. Sci. Camb.*, 93, 47-49.
- VINCENT J.M., 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP handbook n° 12. Blackwell science publications, Oxford and Edinburgh.
- WEBER D.F., MILLER V.L., 1972. Effect of soil temperature on *Rhizobium japonicum* serogroups distribution in soybean. *Agro. J.*, 64, 796-798.

WILKINS J., 1967. The effect of the high temperatures on certain root nodule bacteria. Aust. J. Agro. Res., 18, 299-304.

ZABLOTOWICZ R.M., FOCHT D.D., 1981. Physiological characteristics of cowpea Rhizobia : evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. Appl. Environ Microbiol., 41, 3, 679-685.