



## Effet de l'inoculation par une souche osmotolerante de *Rhizobium sulae* sur la croissance et la production en protéine du sulla (*Sulla coronarium* L.) sous déficit hydrique

Fitouri Dhane Sana<sup>1\*</sup>, Ben Jeddi Faysal<sup>1</sup>, Zribi Kais<sup>2</sup>, Rezgui Salah<sup>1</sup> et Mhamdi Ridha<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut national agronomique de Tunisie 43, avenue Charles Nicolle 1082 Tunis Tunisie.

<sup>2</sup> Laboratoire des Légumineuses Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria BP 901 Hammam-lif 2050, Tunisie.

\* Auteur correspondance Email : [sanadhane2@gmail.com](mailto:sanadhane2@gmail.com)

Originally Submitted on 29<sup>th</sup> February 2012. Published online at [www.m.elewa.org](http://www.m.elewa.org) on March 29, 2012.

### RESUME :

**Objectif :** La production de protéines végétales en conditions de déficit hydrique est un problème qui ne cesse de fragiliser le secteur de l'élevage ovin et bovin en Tunisie. L'inoculation rhizobiale du sulla cultivé peut contribuer à l'amélioration de la production de fourrage riche en protéines.

**Méthodologie et résultats:** Des plants de sulla (*Sulla coronarium* L.) cultivés en pots de végétation, ont été inoculés par une souche de *Rhizobium sulae* HC14 puis soumis à différents régimes hydriques (75, 50, et 25 % de la réserve utile du pot (RUP: 300 mm)). Un deuxième essai a été conduit parallèlement sur champ en pluvial dans deux sites du semi-aride supérieur (Tunis et Goubellat). L'essai en pots a montré qu'avec 75 % de RUP, la fertilisation rhizobiale est au moins équivalente à celle azotée (90 unités), avec un rendement protéique 2,5 fois plus important. A 50% de RUP, le rendement protéique assuré par la symbiose est 3 fois plus que celui avec l'apport azoté. Au champ, l'inoculation du sulla a varié selon le site. A Goubellat l'inoculation a amélioré la croissance en hauteur et les rendements protéiques par rapport au témoin non fertilisé respectivement de 80 % et 277 %. Alors qu'à Tunis l'inoculation a amélioré la croissance en hauteur du sulla de 23 % sans significativement augmenter ses rendements protéiques.

**Conclusion et application:** L'inoculation par la souche HC14 peut contribuer à l'amélioration de la production de sulla dans les régions marquées par un déficit hydrique. Cette pratique permet une valorisation écologique des sites marginalisés de la Tunisie septentrionale.

**Mots clés:** *Sulla coronarium* L., Fixation de l'azote, Inoculation, Rhizobium, Stress hydrique.

### Effect of inoculation with osmotolerant strain of *Rhizobium sulae* on growth and protein production of sulla (*Sulla coronarium* L.) under water deficit

**Objective:** Plant protein production under water stress conditions is a problem that constantly weakens the sector of sheep and cattle grazing in Tunisia. Rhizobial inoculation of cultivated Sulla may contribute to improving the production of protein-rich fodder.

**Methodology and results:** Plants of Sulla (*Sulla coronarium* L.) cultivated in pots were inoculated with an organic fertilizer based on the rhizobial strain HC14 and then submitted to different water regimes (75, 50, and 25% of useful reserves of the pot (URP: 300 mm)). This trial was carried in non-irrigated fields at two locations (Tunis and Goubellat). The pot experiment showed that with 75% of URP, rhizobial fertilization is at least equal to nitrogen fertilization (90 units), with 2.5 times more protein. At 50% URP, protein yield provided by symbiosis is three times more than with the nitrogen supply. In the field, rhizobial inoculation of

Sulla has stabilized or improved forage yield and protein according to site. In Goubellat inoculation improved the growth in height and protein yields compared to the unfertilized control respectively 80% and 277%. Whereas in Tunis inoculation improved the growth in height of sulla 23% with no significantly increasing its protein yields.

**Conclusion and application:** Inoculation with strain HC14 can contribute to improving sulla production in water deficit regions. This practice allows an ecological enhancement of marginalized northern Tunisia sites.

**Keywords:** *Sulla coronarium* L., Nitrogen fixation, inoculation, Rhizobium, Water deficit.

## INTRODUCTION

Dans les zones arides et semi arides à sol généralement pauvre en matière organique, l'azote est l'un des principaux facteurs limitant la production végétale. Bien qu'il soit possible d'augmenter la productivité de certains sols au moyen d'engrais azotés, les faibles bénéfices économiques qui en résultent font que cette technique est inefficace dans diverses conditions climatiques particulièrement arides. Chez les fabacées, cet effet est d'autant plus perceptible que la fixation symbiotique de l'azote devient sensible à la contrainte osmotique (Brockwell et al., 1995 ; Zahran, 1999). Le sulla (*Sulla coronarium*) connu autrefois sous le nom (*Hedysarum coronarium*) est une fabacée fourragère bisannuelle à pérenne, endémique des sols argilo-calcaires de la région semi-aride du bassin méditerranéen (Gutierrez Mas, 1983). A l'état spontané, le sulla est rencontré généralement sur les marnes et les terres argilo-calcaires et peut se trouver à des altitudes variables de 1000 à 2000 m (Bentham et Hooker, 1865; Lapeyronie, 1982). Cette espèce est appréciée pour son fourrage de qualité mais intervient aussi dans la réduction de l'érosion hydrique des sols en pente (Slim et Ben Jeddi 2011). Le sulla contribue de même à l'amélioration de la fertilité organique des terres, du rendement, et qualité des céréales (Ben Jeddi, 2005). Cette espèce est signalée sous des pluviométries variant de 300 à 1000 mm/an (Le Houerou, 1965). Ben Jeddi et Zouaghi (1995) ont

signalé la présence du sulla du nord dans l'étage sub-humide et semi-aride supérieur au nord de la dorsale où la pluviométrie est variable entre 350 et 800 mm/an. Le sulla peut bénéficier d'une fixation biologique de l'azote atmosphérique si le microsymbiote spécifique est présent dans le sol. Ceci lui permet une autonomie de croître dans des sols déficients en azote. Dans le cas contraire, l'inoculation est indispensable. Il a été rapporté que l'introduction de la culture de sulla en Australie a été obligatoirement accompagnée d'une inoculation en raison de l'absence totale du rhizobium spécifique (Casella et al., 1984). De même au Maroc, l'extension de la culture de sulla est entravée par des problèmes de nodulation dans différentes régions potentielles (Barnani, 1984; Thami Alami, 2000). En Tunisie, Il a été souvent noté lors des prospections dans différentes régions du nord de la dorsale, une faiblesse de productivité du sulla attribuée à des échecs de nodulation. Cette déficience de fixation symbiotique de l'azote est souvent contrée par un apport de fertilisant azoté (Dhane 2001). Dans ces conditions, l'inoculation par des souches bactériennes efficaces devient une nécessité (El Amri, 2001). L'objectif du présent travail est d'étudier l'effet de la fertilisation rhizobiale par une souche tolérante au stress hydrique sur la croissance et le rendement du sulla cultivé en condition hydriques limitantes.

## MATERIELS ET METHODES :

**Essai en pot:** Les pots de végétation ont été désinfectés par rinçage à l'eau de javel puis essuyés avec du coton imbibé d'alcool 95°. Ces pots de diamètre 16cm ont été remplis avec du sable de

carrière (3,8 kg/pot) préalablement stérilisé à l'étuve à 120°C pendant 24h. Le semis a été effectué le 2 décembre 2008 après désinfection des graines de sulla décortiquées (variété Bikra 21) à raison d'une graine

par pot. Ces derniers ont été par la suite placés sous serre vitrée. L'inoculation a été réalisée au stade cotylédonaire du sulla par apport de 1 ml d'une solution bactérienne fraîchement préparée de la souche HC14 ( $10^8$  bactéries/ml). Cette souche a été préalablement sélectionnée pour sa tolérance au stress osmotique et identifiée comme *Rhizobium sulae* (Fitouri et al., 2012). Deux témoins ont été utilisés dans cet essai, un témoin non fertilisé (T0) et un témoin fertilisé avec 90 unités d'azote sous forme d'ammonitrite à 33,5%.

L'ensemble des plants a été soumis à un stress hydrique par variation de la réserve hydrique du sol selon le protocole décrit par Ducroq (1990). Les régimes hydriques appliqués sont 75, 50, et 25% des réserves utiles du pot (RUP) ce qui correspond à un cumul d'eau additionnée respectivement de 225, 150, et 75mm. Les régimes hydriques sont maintenus par une irrigation régulière avec de l'eau distillée stérile additionnée d'une solution nutritive carencée en azote (Vadez et al., 1996). L'essai a été maintenu 80 jours après l'inoculation, au terme desquels, 4 plants de chaque traitement ont été arrachés. La nodulation a été évaluée par comptage des nodosités sur les racines. La croissance en hauteur a été réalisée à l'aide d'une règle graduée. La surface foliaire cumulée pour

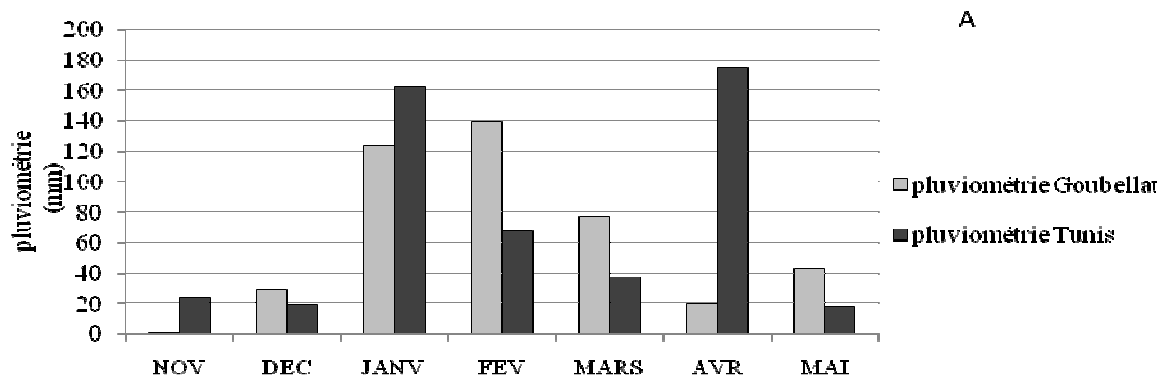
l'ensemble des feuilles constituant une seule plante a été déterminée au moyen d'un planimètre. Les rendements en biomasse sèche par plant de sulla ont été estimés après dessiccation des parties aériennes à 70°C pendant 72 h. Le dosage des protéines brutes aériennes du sulla a été réalisé par la méthode Kjeldahl (Bremner 1965).

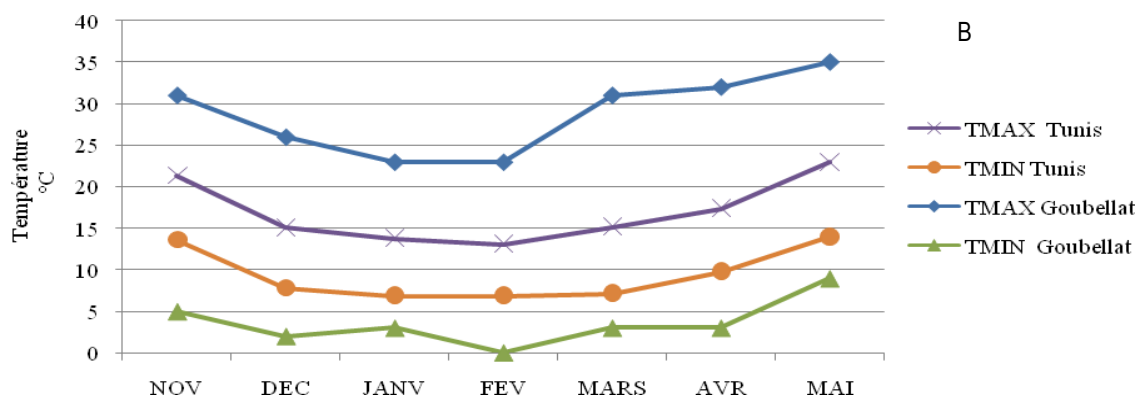
**Essais au champ:** La souche HC14 a été utilisée pour l'inoculation du sulla sous régime pluvial dans le semi-aride supérieur dans deux sites présentant des caractéristiques édapho-climatiques différentes. Peu avant les semis, réalisés les 27 et 28 novembre 2008 respectivement à Tunis (36°49 N 10°1 E) et à Goubellat (36°37N 9°36 E), des échantillons de sol ont été prélevés de manière aléatoire dans l'horizon de surface (0-20 cm). Ces échantillons ont servi à la détermination des caractéristiques physico-chimiques des deux sols (Tableau 1) ainsi qu'au dénombrement de la population rhizobiale spécifique au sulla par la méthode *Most Probable Number* (MPN) selon le protocole décrit par Vincent (1970). Les diagrammes ombro-thermiques ont été déterminés en rapport avec le cycle de développement du sulla du semis à la floraison (Figure 1).

**Tableau 1:** Caractéristiques chimiques et densité rhizobiales spécifique au sulla des sols dans les stations d'essai.

Sites	pH	MO %	Nt %	CA	CE mS.cm <sup>-1</sup>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ass ppm	K <sub>2</sub> O éch	MPN Bactéries/g de sol
Tunis	7,9	1,4	0,11	13,25	0,9	25	526	3,2 10 <sup>4</sup>
Goubellat	7,89	2,4	0,23	14	1,1	16	342	0

MO: matière organique; Nt: azote total; CE: conductivité électrique; CA: calcaire actif; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: phosphore assimilable; K<sub>2</sub>O: potassium échangeable; MPN: *Most Probable Number*.





**Figure 1:** Pluviométries (A) et températures minimales et maximales (B) mensuelles dans les stations Tunis et Goubellat relatives à la période de végétation du sulla.

Les semis du sulla en gousses (variété Bikra 21) ont été réalisés en lignes de 2 m de long écartées de 3 m. L'inoculation sous forme liquide a été réalisée par un arrosoir désinfecté à l'eau de javel puis lavé à l'eau distillée stérile. Chaque ligne a été inoculée par une préparation composée de 500 ml d'une suspension bactérienne fraîchement préparée ( $10^8$  bactéries/ml) diluée dans 10l d'eau distillée stérile. Le dispositif expérimental est en Bloc complètement randomisé à 3 répétitions, chaque bloc a été divisé en 3 unités expérimentales représentées par des lignes inoculées,

non inoculées (T0) et fertilisées à 90 unités d'azote (TN). Au stade floraison 30 plants de sulla représentant les différents traitements ont été arrachés de manière aléatoire pour servir à l'analyse de la nodulation (nombre), la croissance (en hauteur et surface foliaire) et la production (aérienne sèche et protéines brutes). L'ensemble des mesures réalisées a fait l'objet d'une analyse de la variance (SAS, 1996) par comparaison des moyennes en utilisant le test LSD au seuil 5 %.

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Essai en pot :** Avec un apport de 225 mm d'eau (75 % de RUP), l'inoculation rhizobiale avec HC14 favorise des croissances en hauteur et une production de biomasse sèche similaires à celles occasionnées par une fertilisation de 90 unités d'azote. Dans les mêmes conditions, la surface foliaire et les rendements protéiques du sulla inoculé sont améliorés respectivement de 72 et 158 % par rapport au témoin azoté. En augmentant le stress hydrique à 50 % de RUP (150mm), la nodulation du sulla est diminuée de 43 %, affectant aussi bien la croissance que le rendement du sulla (Tableau 2). Mais la fixation de l'azote atmosphérique assurée par voie symbiotique est plus efficace dans ces conditions puisqu'elle assure des productions de biomasses, sèche aérienne et protéinique respectivement de 2,2 et 3 fois plus importantes que celles des plants ayant reçu 90 unités d'azote chimique (Tableau 2).

En condition de fort déficit en eau (25% de RUP), le nombre de nodules par plante est réduit à 3. Ceci

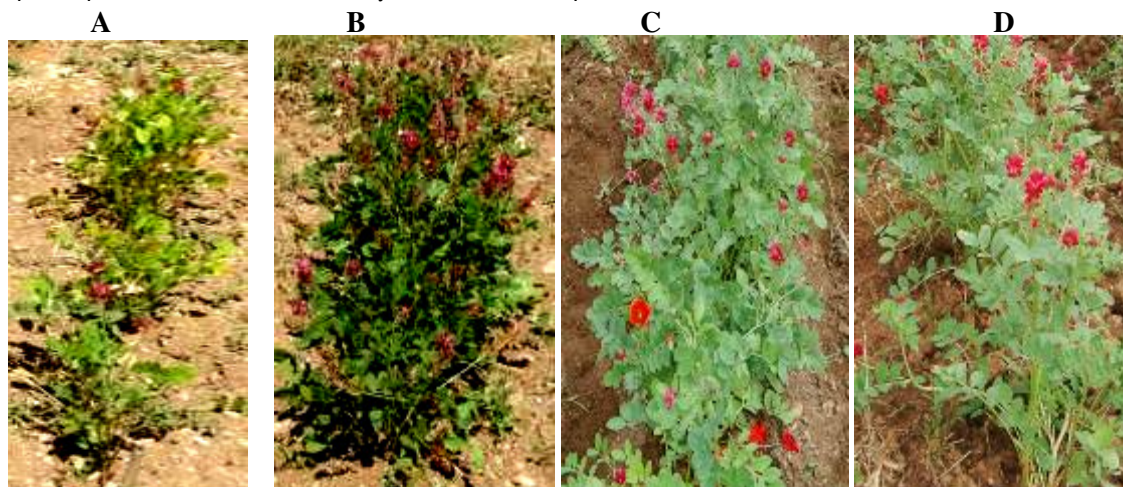
affecte la croissance et les rendements du sulla. Mais, même dans ces conditions extrêmes, la fertilisation rhizobiale offre un gain de protéines brutes de 6,6 mg/plante par rapport à une fertilisation azotée (Tableau 2). En condition de stress hydrique, il y'a une réduction de la photosynthèse ainsi qu'un déficit de nutrition minérale en raison de la réduction des photosynthétas vers les racines (Gahoonia *et al.*, 1994; Dugo, 2002). Du point de vue symbiotique, ce déficit hydrique a pour conséquence la diminution du nombre des nodosités suite à une réduction de l'infection des poils absorbants des racines (Robson, 1969; Zahran *et al.*, 1986; Saadallah *et al.*, 2001), et du nombre de poils racinaires (Zahran *et al.*, 1986). Malgré ces effets, l'inoculation semble plus avantageuse que la fertilisation azotée puisqu'elle offre le meilleur rendement protéique du fourrage à tous les niveaux de stress hydrique (Tableau 2).

**Tableau 2:** Effet de l'inoculation avec la souche HC14 du sulla du nord Bikra 21 conduit en pot sur support de sable soumis à différents régimes hydriques sur la nodulation, la croissance en hauteur, la surface foliaire, la production de biomasse aérienne sèche et le rendement en protéines.

Niveau de la réserve utile	75 %			50 %			25 %		
Quantité d'eau apportée en mm	225mm			150mm			75mm		
	Non inoculé	Témoin azoté*	Inoculé avec HC14	Non inoculé	Témoin azoté	Inoculé avec HC14	Non inoculé	Témoin azoté	Inoculé avec HC14
Nombre de nodules (par plante)	0c	0c	88 a	0c	0c	50b	0c	0c	3c
Croissance en hauteur (cm)	5,9d	22,7a	23a	4,3e	8,5c	15,8b	4,9e	4,6e	5,2de
Surface foliaire (cm <sup>2</sup> / plante)	8,7c	20,8b	35,7a	3,8e	8,9c	19b	3e	4,8e	3,8e
Biomasse sèche aérienne (g/plante)	0,16ef	1,44b	1,93a	0,06f	0,29d	0,62c	0,06f	0,13ef	0,11ef
Protéines (mg/plante)	22e	228b	589a	8f	42d	128c	9,4f	9,4f	16ef

Cette efficacité symbiotique en condition de déficit hydrique de la souche HC14 serait en relation son efficacité et sa tolérance au stress osmotique (Athar et Johnson, 1996; Jahansooz *et al.*, 2007; Mnasri *et al.*, 2007; Mhadhbi *et al.*, 2008; Ben Romdhane *et al.*, 2009; L'taief *et al.*, 2009; Fitouri *et al.*, 2012). Cette adaptation au stress est aussi liée à la morphologie des nodosités. En effet, il est probable que les nodules volumineux occasionnés par la souche HC14 (Fitouri, 2011) soient en partie responsables de son adaptation au stress hydrique sévère (Sprent, 1981; Sanchez-Diaz *et al.*, 1995). Selon Figueiredo *et al.* (1998), les gros nodules possèdent un parenchyme cortical plus épais qui empêche ou réduit leur déshydratation, alors que

les nodules de petite taille perdent rapidement leur réserve en eau. De plus, cette souche aurait la capacité de libérer des phytohormones directement ou indirectement responsables de la modération des effets du stress hydrique sur la plante (Figueiredo *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Belimov *et al.*, 2009). Essais en plein champ : Au stade floraison, la hauteur de végétation du sulla est en moyenne 2 fois plus élevée à Tunis (site favorable) qu'à Goubellat (site défavorable) (Photo 1). Mais dans les deux sites, l'inoculation a significativement amélioré la croissance en hauteur par rapport au témoin non fertilisé (Tableau 3).



**Photo 1:** Croissance du sulla non inoculé à Goubellat (A), inoculé à Goubellat (B), non inoculé à Tunis (C) et inoculé à Tunis (D)

**Tableau 3:** Effet de l'inoculation rhizobiale au champ sur le nombre de nodules, la croissance en hauteur et la surface foliaire du Sulla de 1<sup>ère</sup> année dans les sites de Tunis et Goubellat au stade floraison.

	Nombre de nodules (nodules/plante)		Croissance en hauteur (Cm)		SF (Cm <sup>2</sup> /plante)	
	Tunis	Goubellat	Tunis	Goubellat	Tunis	Goubellat
TN	11,9b	0d	65,39c	40,05d	1455,42a	875,79c
T0	20,8a	0d	69,78bc	19,85e	1250,51b	500,71e
HC14	23,2a	8,3c	85,62a	35,82d	1019,12c	696,93d
LSD 5 %	2,51		5,62		161,38	

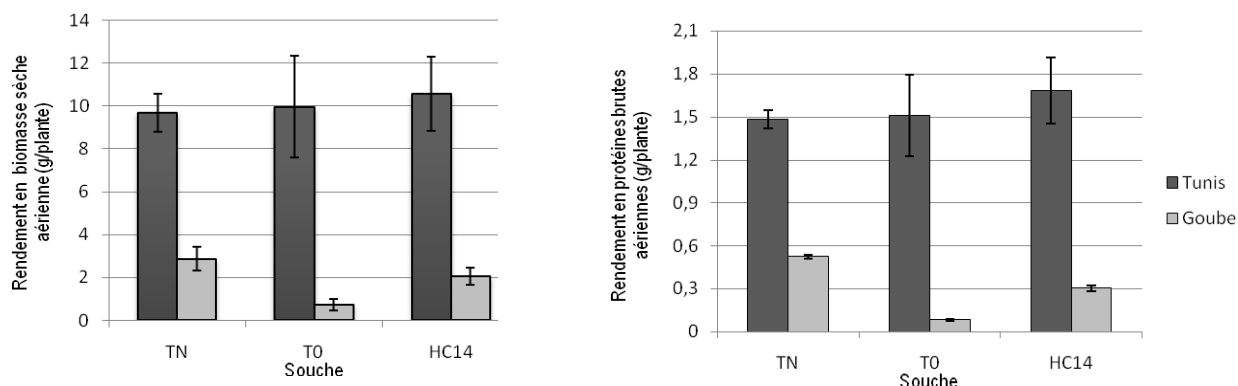
La surface foliaire moyenne du sulla a été de 1233 cm<sup>2</sup>/plante à Tunis, contre 688 cm<sup>2</sup>/plante à Goubellat. La fertilisation azotée a été dans les 2 sites, plus favorable à l'accroissement de la surface foliaire que l'inoculation rhizobiale (Tableau 3). L'apport d'un inoculum exogène n'a pas eu le même effet sur la nodulation dans les deux sites. En effet, à Tunis, tous les traitements ont développé des nodosités racinaires avec un maximum avec HC14 (23,2 nodules/plante). Tandis qu'à Goubellat, où le rhizobium spécifique au sulla est absent (MPN = 0 bactéries/g de sol), seuls les plants inoculés ont développé des nodosités racinaires (Tableau 3). A Tunis, où la densité rhizobiale spécifique au sulla se trouve déjà suffisante (MPN=3,2 10<sup>4</sup> bactéries/g de sol), l'inoculation par la souche HC14 a amélioré la nodulation de 11,5 % par rapport au témoin non fertilisé, contrairement à la fertilisation azotée qui l'a diminué de 42,7% (Tableau 3). L'inoculation et la fertilisation azotée n'ont eu aucun effet sur la biomasse sèche aérienne à Tunis. Alors qu'à Goubellat, cette technique a assuré des rendements en fourrage sec similaires à ceux produits par la fertilisation azotée (Figure 2), assurant ainsi des améliorations par rapport à T0 de 185 % (Photo 1). A Tunis, les rendements protéiques sont semblables pour l'ensemble des traitements. Alors qu'à Goubellat, l'inoculation rhizobiale a amélioré ces rendements par rapport au témoin T0 de 277 % sans toutefois dépasser significativement la production issue d'une fertilisation azotée (Figure 2). L'inoculation rhizobiale du sulla en plein champ entraîne des effets variables sur les paramètres de croissance, nodulation et rendements. Comparé à Goubellat, le site de Tunis se caractérise par une supériorité dans la croissance et la nodulation du sulla. En conséquence, les rendements en biomasses sèche aérienne et protéique se trouvent affectés. La différence du comportement agronomique du sulla dans les deux stations et selon les traitements serait liée d'une part à la présence d'une population

rhizosphérique efficiente dans le site Tunis (Fitouri, 2011) ainsi qu'à la richesse chimique de ce sol en phosphore et potassium (Tableau 1). De plus, l'importante amplitude thermique à Goubellat durant la période de croissance du sulla (Figure 1) pourrait limiter le développement de la plante (Lapeyronie, 1982).

Dans les deux stations, l'inoculation avec la souche HC14 a amélioré par rapport au témoin non fertilisé les paramètres de croissance, nodulation et rendement. Ces résultats montrent l'adaptation de cette souche aux conditions édaphique et climatique des deux stations (Zahran 1999, Vinuesa *et al.*, 2003); ainsi que sa compétitivité. En effet, la souche HC14 semble particulièrement compétitive dans le site de Tunis où la densité rhizobiale spécifique au sulla se trouve déjà suffisante (3,2 10<sup>4</sup> bactéries/g de sol). Il a été rapporté dans ce sens, que l'introduction de souches efficaces de rhizobiums favorisait la nodulation et par conséquent la fixation biologique de l'azote (Sultan *et al.*, 2002); mais à condition, que la souche introduite soit compétitive (Graham 1994). Cette compétitivité des souches est toutefois tributaire des sources d'énergie disponibles dans le sol (Bromfield *et al.*, 1985; Streit *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1987) ainsi que des interactions entre les souches indigènes (Robledo *et al.*, 1998; Oresnik *et al.*, 1999), bactéries et champignons rhizosphériques autochtones qui peuvent avoir des effets positifs (Dashti *et al.*, 1998) ou négatifs (Mrabet *et al.*, 2006). En plus des effets directs de la fixation biologique de l'azote atmosphérique, l'inoculation avec la souche HC14, sélectionnée pour son efficacité et sa tolérance au stress abiotique (Fitouri, 2011), pourrait avoir une action indirecte sur l'amélioration des propriétés physiques de la rhizosphère suite à la libération des exopolysaccharides (EPS). Dans ce sens, Kaci (2005) a rapporté que *R. sulae* KYGT207 isolée depuis une région aride du sud de l'Algérie, aurait la capacité d'améliorer des propriétés physiques de la rhizosphère

des céréales. Au site Tunis, l'effet néfaste de la fertilisation azotée sur la nodulation du sulla au stade floraison a été observé. Cet effet de l'azote sur la nodulation, a déjà été rapporté par plusieurs auteurs (El Mili, 1983; Vance et al., 1987; L'taief et al., 2009). L'augmentation de la quantité d'azote sous forme de  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$  dans le sol aurait pour conséquence une

inhibition de l'infection racinaire (Abdel-Wahab et al., 1996) et du développement nodulaire (Atkins, et al., 1984; Imsande, 1986; Timmers et al., 2000). Dans ce sens, Tibaoui et Zouaghi (1989) ont rapporté une réduction hautement significative de la nodulation provoquée par la fertilisation azotée, particulièrement pendant la fin du cycle végétatif du sulla.



**Figure 2:** Effet de l'inoculation rhizobiale au champ sur les rendements en biomasse sèche et protéines brutes aériennes du sulla de 1<sup>ère</sup> année dans les sites Tunis et Goubellat au stade floraison

## CONCLUSION

Il ressort de ce travail qu'en condition de culture contrôlée (pots de végétation en serre), la fertilisation rhizobiale avec la souche HC14 améliore la croissance et les rendements du sulla à tous les niveaux de stress hydrique même les plus sévères (25% RUP). En plein champ, l'inoculation avec HC14 a eu des effets variables selon le site. A Tunis, où les conditions climatiques et édaphiques (présence de souches

rhizobiales indigènes) sont favorables à la culture du sulla, l'inoculation rhizobiale n'a pas significativement amélioré les rendements fourrager et protéique. Mais à Goubellat, où le milieu édaphique est considéré comme défavorable, la souche HC14 a assuré à travers la fixation symbiotique de l'azote, une production de fourrage sec équivalente à un apport de 64 unités d'azote chimique.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Wahab HH, Zahran HH, AbdAlla MH, 1996. Root-hair infection and nodulation of four grain legumes as affected by the form and the application time of nitrogen fertilizer. *Folia Microbiologica* 41: 303-308.
- Athar M. and Johnson DA, 1996. Effects of drought on the growth and survival of *Rhizobium meliloti* strains from Pakistan and Nepal. *Journal of Arid Environment*. 35: 335-340.
- Atkins CA, Shelp BJ, Kuo J, Peoples MB, Pate TS, 1984. Nitrogen nutrition and the development and senescence of nodules on cowpea seedlings. *Planta*. 162: 316–326.
- Barnani K, 1984. Analyse de l'interaction *Rhizobium-cultivar* chez le sulla (*Hedysarum coronarium* L.). Mémoire de 3<sup>ème</sup> cycle Agronomie, IAV. Hassan II, Rabat.
- Belimov AA, Dodd IC, Hontzeas N, Theobald JC, Safronova VI, Davies WJ, 2009. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signaling. *New Phytologist*. 181: 413-423.
- Ben Jeddi F. and Zouaghi M, 1995. Biodiversité et amélioration génétique des génotypes spontanés du Sulla du Nord Hedysarum coronarium L.. In Actes des deuxièmes journées sur les acquis de la recherche

- agronomique et vétérinaire. 8-10 décembre 1995, Hammamet, Tunisie.
- Ben Jeddi F, 2005. *Hedysarum coronarium* L. : Variation génétique, création variétale et place dans les rotations tunisiennes. Thèse de doctorat en sciences biologiques appliquées. Faculté des sciences en bio-ingénierie. Université de Gen Belgique. 216 pp.
- Ben Romdhane S, Trabelsi M, Aouani M. E, De Lajudie P, Mhamdi R, 2009. The diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) under water deficiency as a source of more efficient inoculants. *Soil Biol. Biochemistry*. 41: 2568-2572.
- Bentham G. and Hooker JD, 1865. *Genera Plantarum*, 1-40. London Reeves.
- Bremner JM, 1965. Total nitrogen. *Methods of Soil Analysis Chemical and Microbiological Properties part 2*, American Society of Agronomy: Madison. 1149-1178.
- Brockwell J PJ, Bottomley J, Thies E, 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant and Soil*. 174:143-180.
- Bromfield ESP, Lewis D M, Barran LR, 1985. Cryptic plasmid and rifampin resistance in *Rhizobium meliloti* influencing nodulation competitiveness. *Journal of Bacteriology*. 164: 410-413.
- Casella S, Gault RR, Reynolds KC, Dyson JR, Brockwell J, 1984. Nodulation studies on legumes exotic to Australia (*Hedysarum coronarium* L.) *FEMS Microbiology Letters* 22: 37- 45.
- Cohen AC, Travaglia CN, Bottini R, Piccoli PN, 2009. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Canadian Journal of Botany*. 87:455-462.
- Dashti N, Zhang F, Hynes RK, Smith DL, 1998. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean *Glycine max* (L.) under short season conditions. *Plant and Soil*. 200: 205-213.
- Dhane S, 2001. Elaboration et exécution du programme de lancement de la nouvelle variété de sulla *Hedysarum coronarium* L. « Bikra 21 ». Mémoire de fin d'études. Institut National Agronomique de Tunisie. 75pp.
- Ducroq M. 1990. Les bases de l'Irrigation. Paris, 350 pp.
- Dugo MVG, 2002. Effet du déficit hydrique sur l'état de nutrition azotée chez les graminées fourragères. Thèse Université de Poitiers (France), 189 p.
- El Amri I, 2001. Fiche technique du Sulla. Journée de lancement variétale du Sulla « Bikra 21 ». ESTER.
- El Mili T, 1983. Modification de la production de semences de la luzerne de Gabès par le bore et les insectes pollinisateurs. Mémoire du cycle de spécialisation de l'I.N.A. Tunisie, 130pp.
- Figueiredo MVB, Burity HA, De França FP, Vilar JJ, 1998. Soil-water response in cowpea at different development stages of N<sub>2</sub> fixation. *Agrochimica XLII*: 200-207.
- Figueiredo MVB, Burity HA, Martinez CR, Chanway CP, 2008. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Applied Soil Ecology* 40:182-188.
- Fitouri-Dhane S, Trabelsi D, Saïdi S, Zribi K, Ben Jeddi F, M'hamdi R, 2012. Diversity of rhizobia nodulating sulla (*Hedysarum coronarium* L.) and selection of inoculant strains for semi-arid Tunisia. *Annals of Microbiology*. 62 (1) 77-84.
- Fitouri-Dhane S, 2011. Diversités Phénotypique et Moléculaire des Microsymbiotes du Sulla du nord (*Hedysarum coronarium* L.) et sélection de souches rhizobiales efficaces. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Institut National Agronomique de Tunisie. Université de Carthage. 145 pp.
- Gahoonia TS, Raza S, Nielsen NE, 1994. Phosphorus depletion in the rhizosphere as influenced by soil moisture. *Plant and Soil* 159: 213-218.
- Graham PH, Draeger K, Ferrey ML, Conroy MJ, Hammer BE, Martinez E, Naarons SR, Quinto C, 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*. 40: 198-207.
- Gutierrez-Mas JC. 1983. La Zulla. La reina de las forrajeras de secano. *Agricultura* 11: 576-677.
- Imsande J. 1986. Inhibition of nodule development in soybean by nitrate or reduced nitrogen. *Journal of Experimental Botany* 37: 348-355.



- Jahansooz MR, Yunusa IAM, Coventry DR, Palmer AR, Eamus D, 2007. Radiation- and water-use associated with growth and yields of wheat and chickpea in sole and mixed crops. *European Journal of Agronomy* 26: 275-282.
- Kaci Yahia A, Alain Heyraud B, Mohamed Barakat C, Thierry H, 2005. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure *Research in Microbiology* 156: 522-531.
- L'Taief B, Bouaziz S, Manasara ZA, Hajji M, Lachaal M, 2009. Effet de la fertilisation azotée, de l'inoculation par *Rhizobium sp.* et du régime des pluies sur la production et la teneur en azote du pois chiche. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 13 (4): 537- 544.
- Lapeyronie A. 1982. "Les productions fourragères méditerranéennes: généralités, caractères botaniques et biologiques". (Maisonneuve g. p et la rose, eds.). Paris, France, 425 pp.
- Le Houerou HN. 1965. Forage and fuel plants in the arid zone of north Africa, the near and the middle east: plants for arid lands. (G. E. Wickens, J. R. Goodin, et D. V. Fields, eds.) pp 117-119.
- Mhadhbi H, Jebara M, Zitoun A, Limam F, Aouani ME, 2008. Symbiotic effectiveness and response to mannitol-mediated osmotic stress of various chickpea-rhizobia associations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1027-1035.
- Mnasri B, Mrabet M, Laguerre G, Aouani M.E, Mhamdi R, 2007b. Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N<sub>2</sub>-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. mediterraneuse) of *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology*. 187: 79-85.
- Mrabet M, Mnasri B, Laguerre G, Aouani ME, Mhamdi R, 2006. Agrobacterium strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by *Rhizobium gallicum*. *FEMS Microbiology Ecology*. 56: 304-309.
- Murphy PJ, Heycke N, Banfalvi Z, Tate ME, de Bruijn F, Kondorosi A, Tempe J, Schell J, 1987. Genes for the catabolism and synthesis of an opine-like compound in *Rhizobium meliloti* are closely linked on the Sym plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 493-497.
- Oresnik IJ, Twelker S, Hynes MF, 1999. Cloning and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2833-2940.
- Robledo E.A., Kmiecik K., Oplinger E.S., Nienhuis J. and Triplett E.W. 1998. Trifolixin production increases nodulation competitiveness of *Rhizobium etli* CE3 under agricultural conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:2630-2633.
- Robson AC. 1969. Competition between effective and infective strains of *Rhizobium trifolii* in the nodulation of *Trifolium subterraneum*. *Australian Journal of agricultural research*. 20 : 827-849.
- Saadallah K, Drevon JJ, Abdelly C, 2001. Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie* 21 : 627-634. INRA, EDP Sciences.
- Sanchez-Diaz M, Aguirreolea J, Goicochea N, Antolin MC, 1995. Limitation de la Fixation symbiotique d'azote et autres aspects physiologiques des légumineuses des zones méditerranéennes. *In : Actes du colloque, Facteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le bassin méditerranéen*, 6-8 avril 1994, Montpellier, France. Paris : INRA.
- Slim S. and Ben Jeddi F, 2011. Protection des sols en zones montagneuses du Nord de la Tunisie par le sulla du nord *Hedysarum coronarium* L. *Sècheresse*. 22: 117-124.
- SAS Institute Inc. 1996. SAS/STAT Software: Changes and enhancements through release 6.11 Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sprent JI, 1981. Nitrogen fixation. *In: Paleg L.G. & Aspinall D., eds. The physiology and biochemistry of drought resistance in plants.* Sydney University Press. pp131-151.
- Streit W R, Joseph CM, Philips DA, 1996. Biotin and other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9 :330-338.
- Sultan T, Aslam M, Mahmood IA, Ahmad S, Zahid MA, 2002. Growth and yield response of chickpea (*Cicer arietinum*) to various *rhizobium* strains fertilized with different phosphorus levels.

- International Journal of agriculture Biology 2: 89-91.
- Thami-Alami I. and El Mzouri ED, 2000. Etude de l'efficacité et de la persistance des souches de rhizobium de Sulla. Cahiers Options Méditerranéennes. CIHEAM 15: 321-325.
- Timmers ACJ, Soupene E, Auriac MC, De Billy F, Vasse J, Boistard P, Truchet G, 2000. Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. Molecular Plant-Microbe Interactions. 13: 1204-1213.
- Vadez V, Rodier F, Payre H, Drevon JJ, 1996. Nodule permeability to O<sub>2</sub> and nitrogenase-linked respiration in bean genotypes varying in the tolerance of N<sub>2</sub> fixation to P deficiency. Plant Physiology and Biochemistry. 34: 871-878.
- Vance E.D, Brookes PC, Jenkinson DS, 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology and Biochemistry 19: 703-707.
- Vincent JM 1970. A manual for practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Vinuesa P, Neumann-Silkow F, Pacios-Bras C, Spaink HP, Martinez-Romero E, Werner D, 2003. Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. Molecular Plant-Microbe Interactions 16:159-168.
- Yang J, Kloepper JW, Choong-Min R 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends Plant Science 14:1-4
- Zahran H H 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63: 968-989.
- Zahran H H 1986. Effect of sodium chloride and polyethylene glycol on rhizobial root hair infection, root nodule structure and symbiotic nitrogen fixation in *Vicia faba* L. plants. Ph.D. thesis. Dundee, Scotland: Dundee University.