RESUME :

Evaluation de l'amélioration de la fertilité des sols emblavés par une légumineuse fourragère en relation avec la symbiose rhizobium dans la région d'El Goléa.

Résumé : El Goléa est une région saharienne caractérisée par ses conditions climatiques sévères et la pauvreté de ses sols, qui limitent leur production agricole. Ce travail présente l'avantage et l'importance de l'association symbiotique de la souche BNL locale avec trois variétés de luzerne (la variété locale de la région et deux variétés introduites). Les résultats obtenus sur la quantité totale d'azote fixé dans une période de 192 jours sont de 391,44 kg/ha pour la variété locale et respectivement de 416,98kg/ha, 484,4 kg/ha pour les variétés introduites (Arabie Saoudite et Temacine). Concernant l'amélioration de la fertilité en azote du sol, la quantité d'azote restitué par la variété locale est plus importante avec 102,7 kg/ha dépassant les variétés introduites (Arabie Saoudite avec 88,7 kg/ha et la variété Temacine avec 84,7 kg/ha). Il apparait au terme de ce travail que la variété locale est la plus efficiente en association avec la souche BNL présente dans les sols d'El Goléa et par conséquent la meilleure dans l'assolement- rotation, comparativement aux deux variétés introduites.

Mots clés : El Goléa, azote, fixation symbiotique, souche locale BNL, variété locale, variété introduite.

SOMMAIRE

Page

- INTRODUCTION GENERALE. 1

Chapitre I: PRÉSENTATION DE LA RÉGION D'ÉTUDE

01)- Situation géographique 3

02)- Conditions climatiques 4

03)- Aperçu sur les ressources naturelles 4

04)- Aperçu sur les activités agricoles 5

Chapitre II) : L'AZOTE DANS LE SOL

01)- Les sources d'azote du sol 7

02)- les formes de l'azote du sol 8

03)- le cycle de l'azote dans le sol 8

04)- Les voies de pertes d'azote dans le sol 10

05)- Rôle physiologique de l'azote 11

CHAPITRE III) : LA LUZERNE ET SON IMPORTANCE

01)- Généralité sur les légumineuses 13

02)- L'origine de la luzerne 13

03)- Taxonomie de la luzerne 14

04)- Anatomie de la luzerne 15
05)- Les facteurs limitants de la culture 16
06)- Conduite de culture 16
07) – l'importance Agronomique de la luzerne 18

Chapitre IV : LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

01)- La fixation libre d'azote 21
02)- La fixation symbiotique 21
03)- Processus de la fixation 24
04)- Le siége de la fixation biologique « Le nodule » 25
05)-Les facteurs agissant sur la fixation symbiotique 27

Chapitre V : MATÉRIELS ET MÉTHODES

01)- Méthodologie de travail adoptée 30
02)- Mise en place de l'essai 30
03)-Matériels utilisés 33
04)-Méthodes 35
05)- Confirmation in vitro des critères symbiotiques 41

Chapitre VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

1)- Résultats 42
1-1)- Conditions expérimentales 42
1-2)- Présentation et analyse des résultats biométriques relatifs à l'association symbiotique Rhizobium-Luzerne fourragère. 43
2)- Discussions et interprétation des résultats. 53
2-1)- Les propriétés physicochimiques du sol. 53
2-2)-La nodulation et les nodosités. 54
2-3)- La matière sèche dans la plante. 54

2-4)- La matière azoté total dans le végétal. 54
2-5)- La quantité d'azote dans la plante. 55
2-6)- Quantité d'azote restituée dans le sol. 55
3)-Identification de la bactérie. 55
3-1)- Taille et couleur des colonies. 55
3-2) - Coloration de Gram. 56
3 -3)-Le test de nodulation. 57
3-4) - confirmation in vitro. 57
- CONCLUSION GENERALE. 58
- REFERENCE BEBLIOGRAFIQUE.
- ANNEXE.

LISTE DES FIGURES :

Figure 01 : La situation géographique de l'oasis d' El Goléa.

Figure 02 : La production des différentes variétés dans la région d'El Goléa **(2007-2010).**

Figure 03 : Cycle d'Azote.

Figure 04 : Développement d'un plante de luzerne.

Figure 05 : Une nodosité de légumineuse.

Figure 06 : Les différentes formes des nodosités.

Figure 07 : Evolution du nombre total des nodules des variétés selon les stades.

Figure 08 : Le nombre des différentes formes des nodules.

Figure 09 : Le pourcentage de la couleur rose des nodules pour chaque variété.

Figure 10 : Le pourcentage des tailles des nodules des trois variétés.

Figure 11 : Evolution du poids sec de la parties aérienne trois variétés selon les stades.

Figure 12 : Evolution du poids sec des racines des trois variétés selon les stades.

Figure 13 : Evolution de la MAT dans la partie aérienne des trois variétés selon les stades.

Figure 14 : Evolution de la MAT dans les racines des trois variétés selon les stades.

Figure 15 : La quantité d'azote dans les plantes des trois variétés selon les stades.

Figure 16: Evolution de la quantité d'azote dans le sol des trois variétés.

LISTE DES PHOTOS :

Photo 01 : Le dispositif expérimental.

Photo 02 : Le matériel biologique.

Photo 03 : Les germes des semences.

Photo 04 : Les tubes du teste de nodulation.

Photo 05 : Nodules sur les racines de la luzerne.

Photo 06 : Les différentes formes des nodules plurilobés rencontrés par les trois variétés.

Photo 07 : Un nodule plurilobé de la variété locale.

Photo 08 : Colonies de Rhizobium après l'incubation à 28°C.

Photo 09 : Coloration de Gram (G X 100).

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 01 : Valeur nutritive et digestible de la luzerne**.**

Tableau 02 : L'estimation des quantités d'azote fixé par différentes légumineuses cultivées.

Tableau 03 : Les bactéries fixatrices d'azote symbiotique des légumineuses.

Tableau 04 : Le résultat des analyses physico-chimiques de sol d'El Goléa.

Tableau 05 : Caractéristiques des semences.

Tableau 06 : Les moyennes des résultats d'analyse et des mesures expérimentales.

Tableau 07 : Evolution de la teneur en azote dans le sol emblavé par les trois variétés.

Tableau 08 : Les quantités d'azote restitué au sol.

Tableau 09 : La quantité total d'azote fixé biologiquement par les trois variétés.

LISTE DES ABRÉVIATIONS :

BNL : Bactéries Noudilant Légumineuses.

FG : La faculté germinative.

INRA : Institut Technique des céréales et fourrages.

MAT : La matière azoté total.

MO : La matière organique.

MS : La matière sèche.

PMG : Le poids de milles grains.

PSP : Le poids sec de la plante.

TN : La teneure en azote.

VL : La variété locale.

VAS : La variété Arabie Saoudite.

VT : La variété Temacine.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans la nature, l'azote est abondamment présent sous forme gazeuse N_2 dans l'air dont il présente près de 4/3 de l'atmosphère ou sous la forme minérale ou organique dans les sols et la matière vivante.

L'azote est un élément fondamental parmi les trois éléments majeurs (N, P et K). Il est le pivot de toute production végétale, son action positive sur les rendements des cultures fait de lui un élément clé de la nutrition des cultures**. (CTIFL, 1998 in BABI F, 2004)**

Les sols des régions sahariennes sont généralement pauvres en éléments nutritifs entre autre l'azote et le phosphore, donc l'utilisation des engrais minéraux reste la plus dominante et le seul moyen efficace pour l'obtention d'une production optimale, mais l'utilisation des engrais azotés présentent des nombreux inconvénients surtout dans ces région qui se caractérisent par des sols de texture sableuse. Parmi ces inconvénients, le coût élevé des engrais azotés (6000,00 DA le quintal d'Ammonitrate 33%), et la pollution de la nappe phréatique (lessivage des nitrates).

La symbiose rhizobia-légumineuses représente donc une alternative à l'utilisation des engrais azotés minéraux. En effet les légumineuses par leurs aptitudes de s'associer aux BNL (Bactéries nodulant les légumineuses) et de fixer des quantités très importantes d'azote atteignant des proportions de 150 à 400 kg / ha / an et permet ainsi d'améliorer la fertilité des sols agricoles**. (POSTAGATE, 1982 in AZZIZI, 2005).**.

La luzerne est l'une des légumineuses les plus utilisées vu son intérêt considérable dans les assolements et rotation **(Foury, 1954**), elle à un rôle important dans l'amélioration des qualités physiques et chimiques des sols cultivés, cette culture peut fixer jusqu'à 400 kg N/ ha / an.

Diverses méthodes sont utilisées pour l'évaluation des quantités d'azote apportées par le biais de la fixation symbiotique mais nous avons adopté dans ce travail la méthode d'évaluation par différence qui n'est pas très précise mais qui présente l'avantage de permettre, dans nos conditions, d'approcher les valeurs de cette fixation en azote. En effet cette méthode néglige la fixation libre et aussi toutes les voies des pertes d'azote surtout par le lessivage dans ce sol à structure sableuse par l'effet des irrigations quotidiennes.

Notre travail a pour but :

- réaffirmer l'importance de l'association symbiotique (Rhizobium-luzerne) surtout dans les zones sahariennes.
- comparer entre trois variétés de luzerne (VL, VAS, VT) et leurs efficiences dans la symbiose avec les souches locales de BNL de la région d'El Goléa.
- La sensibilisation sur l'importance de l'alternative à la fertilisation azotée par l'exploitation de l'association légumineuse – Rhizobium dans la région.
- La confirmation des autres travaux sur ce sujet.

Chapitre I: PRÉSENTATION DE LA RÉGION D'ÉTUDE

01)- Situation géographique :

L'oasis d'El-Goléa, c'est une oasis Algérienne qui se trouve au centre du Sahara à 870km au sud d'Alger, à 270km au Sud-ouest de Ghardaïa, à 410km au Sud-ouest d'Ouargla, 480km au Nord d'In Salah et 380km à l'Est-nord de Timimoune. Ses coordonnées géographiques Lambert se présentent comme suit:

- Altitude : 396m ;
- Longitude : 02° 52' Est ;
- Latitude : 30° 35' Nord.

Selon **CHAICH, (2006)**, L'oasis d'El-Goléa, s'étend sur une longueur d'environ une dizaine de kilomètres dans la vallée d'Oued Sagguar, dont la superficie totale est de 49000 Km ² **(Figure 01).**

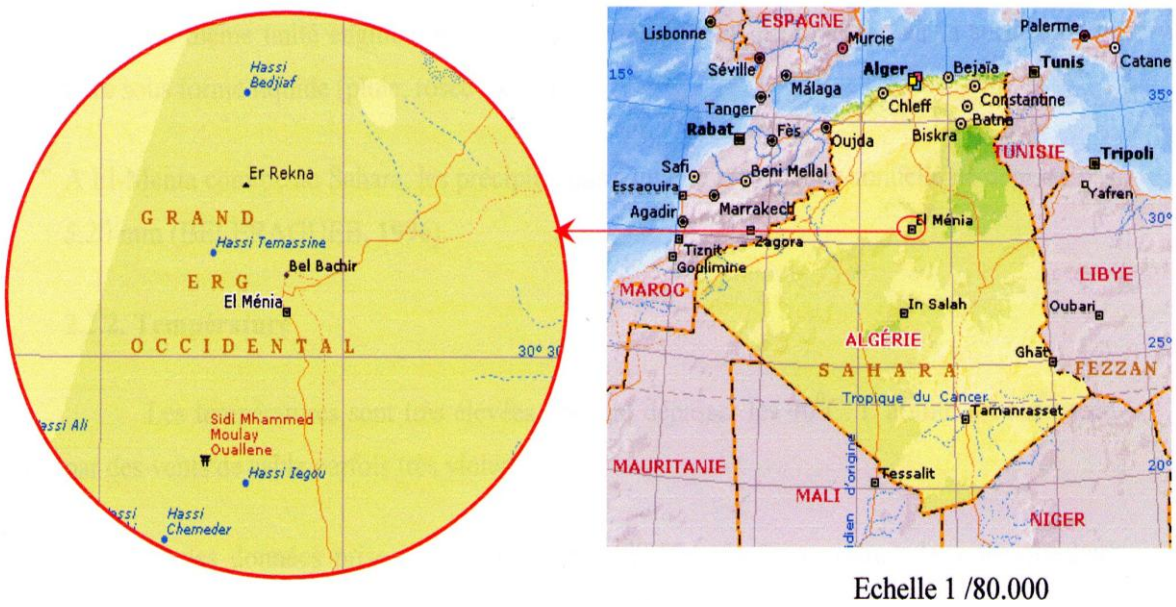


Figure 01 : Situation géographique de l'oasis d'El-Goléa (Encarta, 2005)

02)- Conditions climatiques :

La région d'El Goléa comme toutes les régions sahariennes se caractérise par un climat de type aride avec de fortes amplitudes thermiques entre la nuit et le jour et entre l'hiver et l'été. L'oasis d'El-Goléa est définie comme zone désertique ou l'évaporation potentielle excède toujours les précipitations, elle est caractérisée par son hiver rigoureux et froid et son été sec et chaud. **(BELERAGUEB, 1996 in ZEKKOUR, 2007)**

03)- Aperçu sur les ressources naturelles :

3-1)- Ressources en sol :

Comme dans toutes les régions sahariennes, le sol d'El-Goléa est de texture sableuse plus ou moins calcaire imprégné de matière organique et sec, pratiquement ce ne sont pas des sols au sens agronomique.

Sur les plateaux en dehors des palmeraies, l'érosion éolienne a décapé les éléments fins, ne laissant en surface que les éléments grossiers. Au niveau de la plaine alluviale (sols des palmeraies), les apports sont assez homogènes et on rencontre les sables fins et sable fins limoneux.

En profondeur la variabilité est plus grande, on observe des niveaux granilo-caillouteux et des niveaux argileux. **(BELERAGUEB, 1996 in ZEKKOUR, 2007).**

3-2)- Ressources en eau :

Comme dans la plupart des oasis du Sahara, les principales ressources hydriques disponibles sont d'origine souterraine. L'abondance en eau est un des critères les plus frappants d'El-Goléa, cette dernière est assurée par la présence, de haut en bas, de deux nappes :

- Nappe phréatique (superficielle) ;
- Nappe la nappe Albienne (artésienne).

3-2-1)- Nappe phréatique :

C'est une nappe superficielle, se trouvant dans les formations du quaternaire, elle circule dans les sables alluviaux de Oued Sagguar dans la vallée ou sont implantées les palmeraies d'El-Goléa **(BELERAGUEB, 1996 in ZEKKOUR., 2007).**

3-2-2)- Nappe Albienne:

Selon **METERFI (in CHAICHE, 2006**), sa profondeur avoisine les 200m de profondeur, cette nappe est contenue dans le continental intercalaire ; son eau est fossile emmagasinée au cours des périodes pluvieuses du quaternaire ; le sens de son écoulement est généralement Nord- Sud, comme elle se caractérise par une très faible minéralisation .

04)- Aperçu sur les activités agricoles :

L'activité agricole à El-Goléa est caractérisée essentiellement par la culture des arbres fruitiers associée au palmier dattier. Une tendance vers l'élevage est sentie par les superficies emblavées par les cultures fourragères (40% de la S.A.U.) dont la culture de luzerne occupe une place très importante **(CHAICHE, 2006).**

En effet, dans la zone d'El Meniaa cette culture a été introduite depuis l'année 1898, et, juste après la réalisation des premiers forages. Les premiers essais ont concerné plusieurs cultivars de luzerne parmi lesquelles la variété provenant de l'Arabie Saoudite et du Soudan ramenés par les tribus nomade des Chaanba.

A travers, les données fournies par la Subdivision agricole**.** Les niveaux de productions de la luzerne atteints ainsi que les principales variétés utilisées sont représentés dans la **figure 02** ci-dessous.

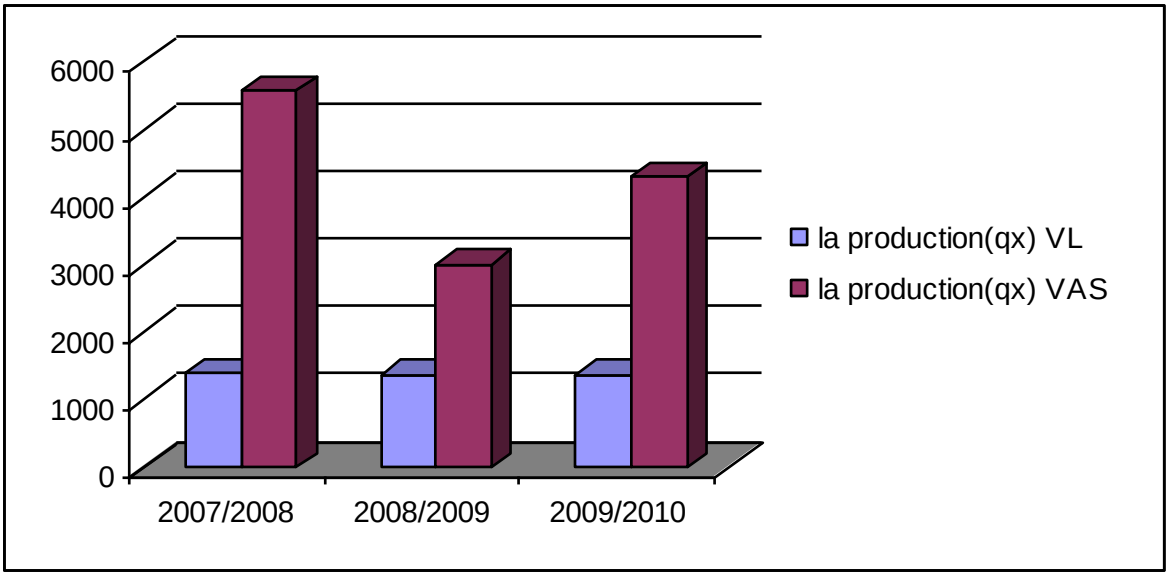


Figure 02 : La production des différentes variétés dans la région d'El Goléa durant (2007- 2010)

Il en ressort que le niveau production obtenus par la variété de VAS est plus élevée que la VL, et après la discussion avec les techniciens et les agricultures de cette type de production, l'augmentation de production lié avec la variété elle-même et non pas lié à d'autre condition (sol, climat, engrais, irrigation,….), mais l'inconvénient de la VAS est dans leur période de production qui est courte,(ne dépasse pas 05 ans) par apport de la VL qui dépasse 10 ans avec un production faible.

La production total de la luzerne dans ces trois derniers compagnes dans la région d'El Goléa est de 16965qx, la production de la VAS prend les 75,77% et la VL, 24,22% de cette production.

Chapitre II) : L'AZOTE DANS LE SOL

Depuis les travaux de **POTER (1975)**, nous savons que seulement 2% de l'azote présent dans le globe se trouvent recyclés en permanence dans la biosphère et constituent par conséquent la source essentielle du cycle biogéochimique. Le reste (98%) se trouve majoritairement dans les roches volcaniques et sédimentaires. **(CHELOUFI, 1991)**

01)- Les sources d'azote du sol :

Contrairement au calcium, au potassium et au phosphore, l'azote que l'on trouve dans les sols sous plusieurs formes ne provient pas de la dégradation des roches mais des autres sources :

A)- une source atmosphérique :

L'azote gazeux ou l'oxyde d'azote N2, qui constitue les 4/5 de l'atmosphère, mélange à l'oxygène. C'est la source primordiale d'azote du sol, qui s'y incorpore : - par les orges synthétisant, à partir de ce gaz, de l'acide nitrique HNO3, que les pluies entraîneront dans la terre ou il évoluera.

- par les bactéries fixatrices d'azote libres ou associées à des plantes. Ces bactéries l'utiliseront pour la synthèse de leurs protéines, dont se nourriront à leur tour les plantes.

B)- une source organique :

L'azote incorporé dans les matières organiques végétales ou animales. Cette source dérive évidemment de la première. Les bactéries qui dégradent les matières organiques libèrent l'azote sous des formes assimilables par les plantes.

C)- une source synthétique :

L'azote des engrais azotés synthétisés à partir de l'azote de l'air mais avec fort dépense d'engrais, celle du pétrole. (**SOLTNER, 2003)**

02)- les formes de l'azote du sol :

Dans le sol, l'azote peut existe sous trois formes principales représentant trois stades de décomposition biologique des matières organiques :

2-1)- l'azote organique :

L'azote dans les sols cultivés se trouve essentiellement sous forme organique avoisinant les 95% de l'azote total, **(BREMNER, 1967 ; STEVENSON et al, 1967 , in CHELOUFI , 1991).** L'azote organique est la réserve d'azote du sol. Il n'est pas directement utilisable par les plantes. La grande partie se trouve sous forme d'humus stable dosant 5% d'azote. **(SOLTNER, 2003)**

2-2)- l'azote ammoniacal :

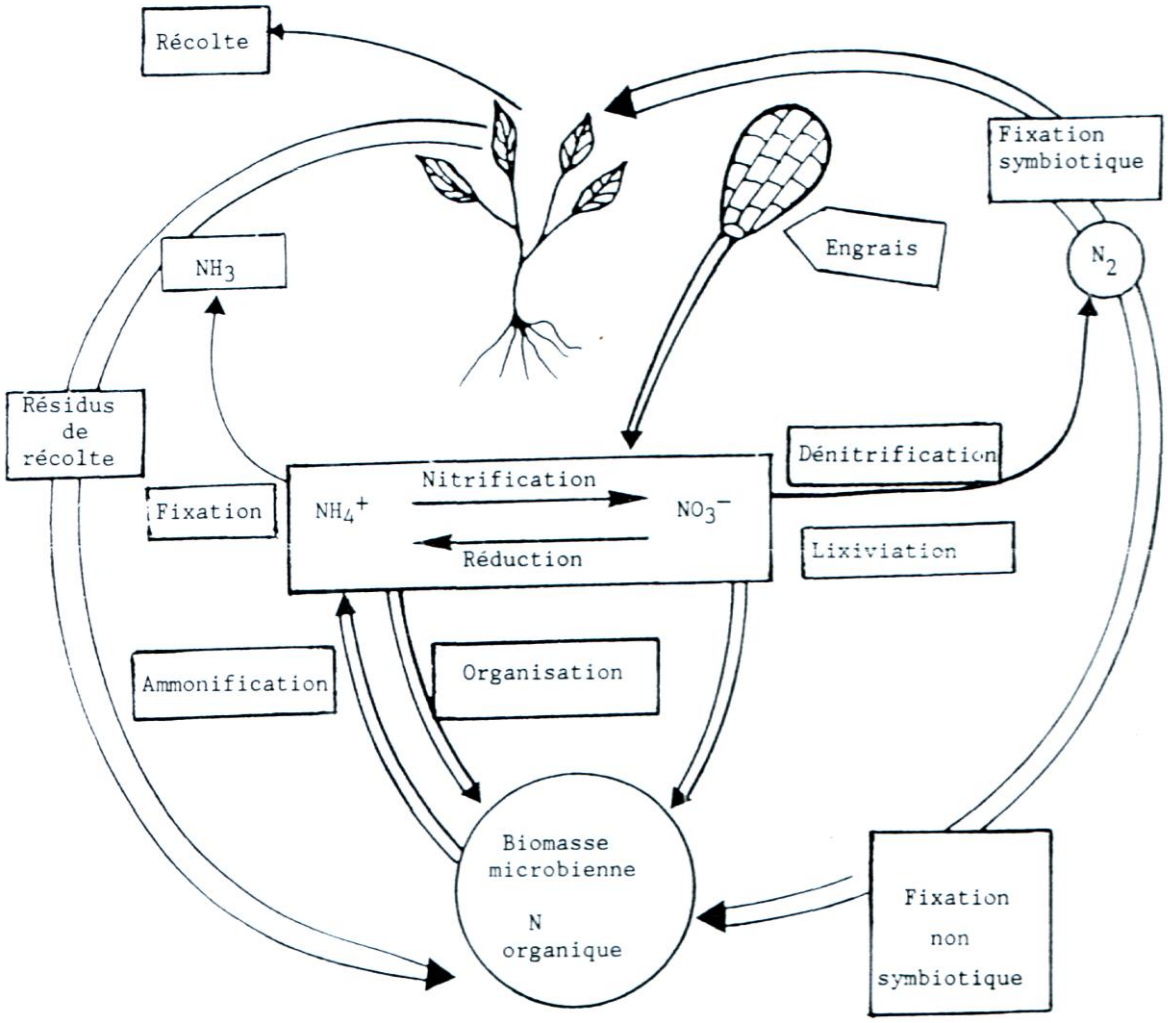
Est une forme transitoire, mais retenue par le système absorbant. Résultat de l'ammonisation, les ions NH4+ sont retenus par les charges négatives du complexe argilo humique.

2-3)- l'azote nitrique :

Très soluble, est la forme principale d'absorption de l'azote par les plantes. Bien que celles-ci puissent absorber les ions NH4+, ce sont les ions nitriques NO3- qu'elles utilisent surtout**. (SOLTNER, 2003)**

03)- le cycle de l'azote dans le sol :

La matière organique du sol, subit dans un premier temps un décomposition microbienne variée puis elle passe par différentes étapes **(ANONYME, 1887).**



<u>Figure 03</u> : Cycle de l'azote d'après GUIRAUD G, 1984.

3 -1)- Humification :

La décomposition de la matière organique aboutie à la formation de l'humus jeune puis finalement à l'humus stable cette transformation est induite par les micro-organismes du sol (bactéries et champignons), **(GROS, 1969).**

3 - 2)- Minéralisation :

La minéralisation de l'azote organique du sol réalisé par les micro-organismes, ce fait en deux temps :

a)- l'ammonification :

C'est le processus biologique le plus important qui influe sur le cycle de l'azote et sa disponible dans le sol **(MENGL et KERKBY, 1982).** Il faut noter aussi que pour être assimilable, l'azote organique doit subir sous l'influence des micro-organismes une série de transformation qui font passer successivement de la forme protéique à la forme acides amines ; ceux-ci sont transformés à leur tour en azote ammoniacale puis en azote nitrique **(BARBER, 1972 in MAACHI L, 2005).**

b)- la nitrification :

JUSSIAUX, 1980 considère que la transformation de l'azote ammoniacal en azote nitrique se fait sous l'influence des micro-organismes oxydants en deux étapes :

- **la nitrosation :**

Les nitrosomonas qui oxyde l'azote ammoniacal en azote nitreux.

- **La nitratation :**

Les nitrobacters oxydent l'azote nitreux en azote nitrique qui est mobile dans le sol, ce phénomène de nitrification à lieu dans des condition écologique extrêmement diverses : PH voisin de la neutralité, quantité suffisant de CO2 humidité en dessous de la capacité de rétention et une aération modérée **(DUCHAUFOUR, 1979 in MAACHI L, 2005).**

04)- Les voies de pertes d'azote dans le sol :

Les quantités d'azote minéral du sol, non assimilais par les plantes peuvent être perdues par trois chemins **;(CHOUAR W, 2006).**

- **La dénitrification**

Dans le milieu naturel il existe des bactéries qui ont la capacité de transformer les nitrates en azote moléculaire N_2 selon la réaction suivante :

NO3- _____NO2-_____ NO _____ N2

Les pertes par la dénitrification peuvent aller de quelques Kg à plusieurs dizaines de Kg/ha/an. **(MARIOTTI, 1996).**

- **Volatilisation de l'azote ammoniacal**

Une partie d'azote ammoniacal peut être perdue directement par volatilisation d'ammoniac dans un milieu alcalin et sous l'effet d'une alternance d'humectation et de dessiccation. **(RECOUS, 1987 in OUSTANI, 2006).**

- **Lessivage**

C'est l'entraînement d'azote nitrique vers la profondeur sous l'action de la percolation de l'eau. Ces pertes variant en fonction du type de climat, de la végétation, de la topographie et des propriétés physico-chimiques du sol. **(BARTHOLOMEW et FRANCIS, 1965).**

Le lessivage est de 20Cm pour 100mm de pluie en sol argileux **(LANGELET, 1975 in SOUSSI., 1998),** les pertes annuelles par lessivage, mesurées dans les stations équipées des cases lysimétriques peuvent varier de 30 à 150kg/ha en cases nues et de 3 à 80kg/ha en cases cultivées **(SOLTNER, 2005)**

05)- Rôle physiologique de l'azote :

L'azote est un constituant principal des protéines ; absorbé par la plante sous forme nitrique ou ammoniacale, l'azote s'unit dans la feuille et les racines aux acides dérivés des glucides avec lesquels il forme des acides aminés, éléments constructifs des protéines**. (SOLTNER, 3003).**

L'azote entre dans la composition des nucléoprotéines des noyaux des cellules, donc il se trouve en abondance dans les cellules jeunes. Il est donc un facteur déterminant de la croissance des organes végétatifs et c'est surtout la composition de ceux-ci qui est affectée par l'apport d'azote **(PRATS et CELEMENT G, 1970, In MAACHI L, 2005). COIC, 1980** montres que l'azote assure le développement et le maintien de l'appareil photosynthétique qui a un effet considérable sur l'utilisation de l'énergie lumineuse par le feuillage.

Pour **SOLTNER, 2003.** L'azote est un constituant essentiel du cytoplasme car il favorise :

- la synthèse des glucides grâce à l'augmentation du nombre de chloroplastes.
- La constitution des réserves azotées dans les graines.
- La multiplication des cellulaire donc la croissance des tissus.
- La multiplication des chloroplastes, puisque la chlorophylle est substance azoté d'où la couleur vert foncée des plantes après un apport d'azote.
- C'est un facteur de rendement, et parfois de qualité, puisqu'il augmente la teneur en azote des céréales.

L'azote est donc nécessaire à tous les stades de la plante : jeunes, croissance, reproduction et misse en réserve.

CHAPITRE III) : LA LUZERNE ET SON IMPORTANCE

01)- Généralité sur les légumineuses :

Les légumineuses sont un groupe de plantes à fleurs (angiospermes) dicotylédones, dont le fruit est une gousse de forme variable le plus souvent sec et capsulaire déhiscente par deux valves mais parfois à un seul compartiment la gousse peut être aussi indéhiscent, les fleurs des légumineuses sont très variable mais chez tout les espèces les bases des cinq sépales,des cinq pétales,possèdent habituellement dix étamines, les fleurs sont simples ou composés ordinairement alterne transformées en vrilles.

Les légumineuses comptant environ 18000 espèces de répartition mondiale, avec des espèces alimentaires (pois, fèves, haricot…) ornementales (arbre de judée…), de gomme (résine d'acacia) et fourragères (luzerne, soja,…), **(Encarta 2005)**

Les botanistes divisent cette famille en trois sous familles selon leurs caractères floraux :

Les mimosacées (mimosa, acacia), les caesalpiniacées (arbre de judée), et papilionacées (trèfle, luzerne), **(staton w. Retcoll ,1970)**

Les plus évolué des légumineuses avec environ 350 genres et 12000 espèces, constitué principalement de plantes herbacées**. (Encarta 2003)**

02)- L'origine de la luzerne :

Le centre d'origine de la luzerne le plus souvent mentionner est l'Iran. (**VERN Marle, 1993 in CHAIBA S, 1998).**

La luzerne **(*Medicago* *sativa* *L.*)** est l'une des plantes fourragères les plus répandues ns tout les continents. Sa culture remonterait à plus de 9000 ans, dans les hauts plateaux du

Caucases, l'Iran et la Turquie d'où elle serait répandue dans le monde entier. Au total la luzerne représente dans le monde prés de 32 millions d'hectares dont 14 millions en Amérique du nord ou elle est le mieux représentée pour moins de 600 000 hectares en France. **(MATHIEU M, 2002).**

03)- Taxonomie de la luzerne :

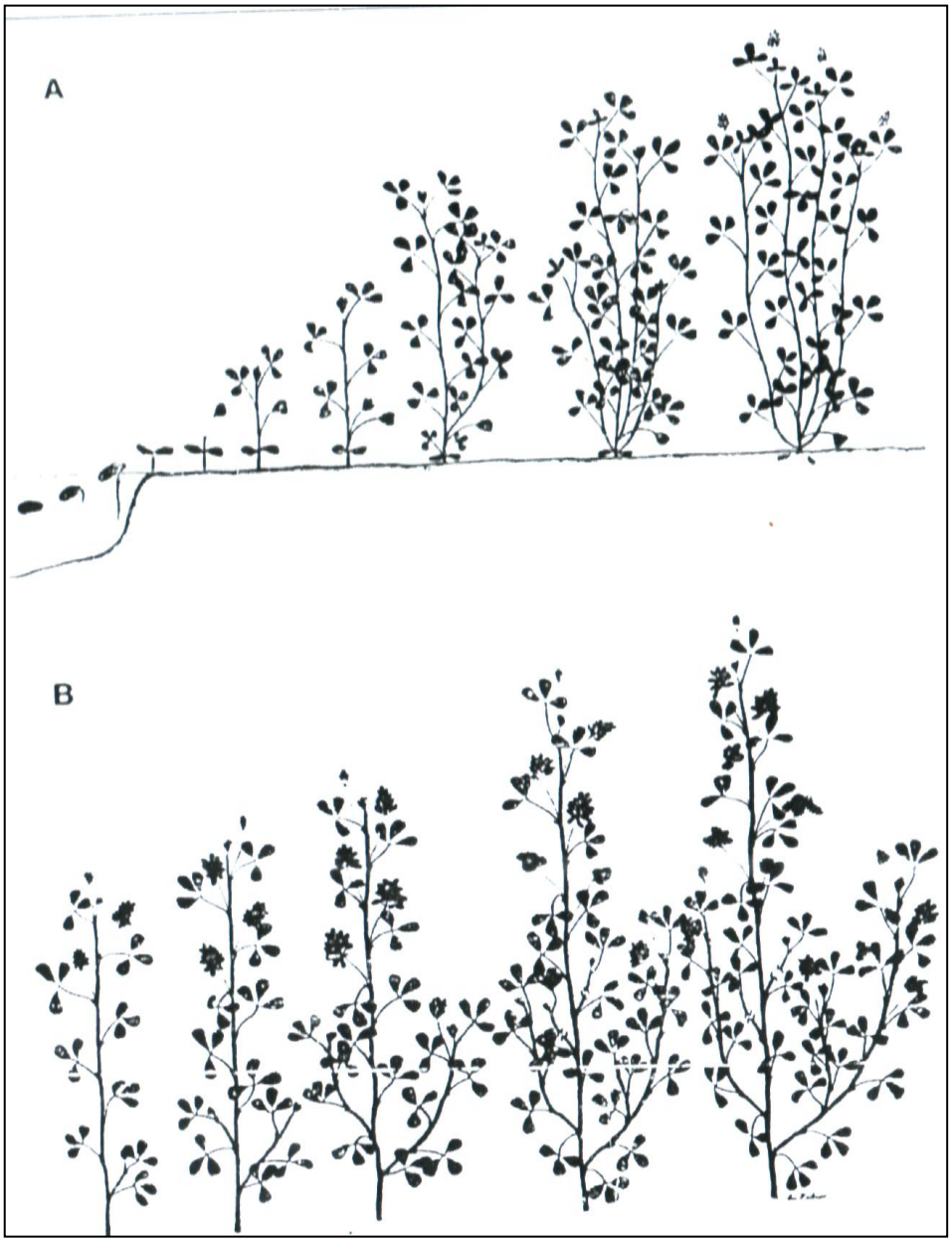
Classification systématique :

- Classe : Dicotylédones
- Sous classe : Dialypétale
- Ordre : Rosales
- Famille : Légumineuses
- Sous famille : Paplionacées
- Tribus : Trifoliées
- Genre : Medicago
- Nom scientifique: *Medicago sativa L* (**Ozanda, 1983, in CHAIBA S, 1998).**

04)- Anatomie de la luzerne :

Etant une dicotylédone. Deux cotylédons vont d'abord émerger à la levée. La première feuille est unifoliée, les feuilles suivantes sont composées de trois folioles rattachées à la tige par un pétiole. Au cours de son développement la première tige grandit en produisant des feuilles alternées. Le bourgeon axillaire de la première feuille unifoliée se développe ensuite pour donner une tige secondaire. Deux autres tiges secondaires démarrent à sa suite depuis le niveau des cotylédons (Figure 04).

La luzerne développe dans le même temps une racine pivotante principale et des racines secondaires plus ou moins ramifiées. **(MAURIES M, 2002)**



<u>Figure04</u> : Développement d'un plante de luzerne d'après MAURIES M, 1992

05)- Les facteurs limitants de la culture :

5-1)- la température :

Dans sa première année, le froid hivernal constitue le principal facteur limitant ; les gelées peuvent la détruire. Les années suivantes, elle peut résister à des fortes gelées. Les fortes chaleurs ne provoquent pas d'arrêt de croissance, cependant on observe une diminution de production.

5-2)- l'eau :

La luzerne résiste à la sécheresse quand son pivot pénètre profondément. Cependant elle est très exigeante en eau ; on apporte couramment jusqu'à 15 000 m3 d'eau par an/ha.

Suivant les expérimentations entreprises par différents centres de recherches, le rendement maximum correspond à une consommation d'eau voisine de l'ETP, par contre la meilleure efficience de l'eau exprimée en kg de MS correspond à une consommation d'eau inférieure à l'ETP

mois	**9**	**10**	**11**	**12**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
nombre d'irrigation	**3**	**2**	**1**	**1**	**1**	**2**	**2**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**

5-3)- le sol :

Pour une bonne implantation d'une luzernière, le sol doit être :

- profond (sans obstacles, croûte, calcaire, roche).
- Sans discontinuité (semelle de labour).
- Sain, sans humidité excessive.
- Pas acide, au moins neutre.

06)- Conduite de culture :

Les opérations nécessaires à une bonne conduite de culture de luzerne se résument chronologiquement par ce qui suit :

6-1)- préparation du sol :

- labour profond (40 à 50 cm) en hiver pour un semis de printemps
- reprise de labour à la fin de l'hiver
- avant semis, façons superficielles pour obtenir un sol finement émietté dans les 5 premiers centimètres.

6-2)- semis :

- dose : 25 à 30 kg / ha avec une profondeur de 2 cm
- mode : de préférence en lignes (semoir à céréales) avec écartement de 25cm
- date : en automne (début septembre), au printemps (début mai)

D'après les observations faites dans les stations de recherches, la production de la première année ce semis d'automne est supérieur à celle du printemps. Par contre celle des autres n'est pas modifiée. **(ITDAS, BISKRA)**

6-3)- la fertilisation :

La luzerne est très exigeante en acide phosphorique (100 à 150 / ha), en potassium (500 / ha), en chaux et en certains oligo-éléments : Mo, Zn, Mg, Cu, Fe, Cl, Br….. **(Anonyme, 1993)**.

6-4)- l'entretien :

Généralement les luzernières sont envahies par les adventices dans la phase d'installation. Dans ce cas il faut pratiquer un désherbage :

- désherbage manuel
- binage mécanique si l'écartement entres les lignes permet

Désherbage chimique au 2.4.D. **(ITDAS, BISkRA)**

6-5) – la récolte :

Le fauchage de la luzerne à préfloraison, laisser la luzerne fleurir complètement une fois dans l'année de façon à permettre aux plantes de constituer des réserves pour les périodes difficiles. Eviter toute manipulation superflue du foin, pour éviter des pertes de folioles.

Utiliser de la luzerne verte pour l'alimentation des animaux après préfannage de 24 à 48 h afin de prévenir les météorisations. Le nombre de coupe 10 à 14 coupes, et la production en vert 100 t et plus. **(TOUTAIN G, 1992)**

06-6)- Aspect phytosanitaire:

La luzerne est sujette à beaucoup d'ennemis de culture. Des maladies causées parles différents agents phytopathogenes (champignons, bactéries, virus, mycoplasmes, excès ou des carences nutritionnelles ainsi que d'autres facteurs abiotiques) ainsi que des ravages d'arthropodes sont répertoriés nuisibles.

Selon **PFITZENMEYER et DUTHIL (in BAAMEUR M, 1998),** La seule méthode de lutte efficace contre ces ennemis, économiquement possible, est d'ordre génétique par la sélection de variétés résistantes. La lutte chimique, par l'emploi des fongicides, peut être utilisée contre les maladies cryptogamiques mais elle est peu rentable. Par contre, l'utilisation des semences désinfectées pour lutter contre *Ascochyta* (taches noires) et les *anthrachnoses* (taches en losanges) et l'emploi des insecticides contre *Cecidomyces* sont recommandés. Pour la prévention également, on doit choisir des semences décuscutées (indemne de cuscute). Enfin, si les attaques sont particulièrement graves, on tachera de faire des récoltes aussi précoces que possibles et pratiquer la rotation.

07) – l'importance Agronomique de la luzerne:

La luzerne est un excellent engrais vert par son système radiculaire le plus développé, qui provoque par son enfouissement l'accumulation plus importante en azote. **(BENABDELKADER, 1991),** et des quantités importantes en éléments minéraux tel que le potassium et l'acide phosphorique **(INRA, 1965)**. En effet, après défrichement, des nodosités

présentes sur les racines, il ya restitution dans le sol une masse importante de MO ainsi que les résidus azotés **(tableau 02)**. Elle a un rôle important dans l'amélioration des qualités physiques et chimique des sols cultivés. **(FOURY, 1954 in CHIBA S, 1998). La** luzerne s'adapte facilement à des milieux divers et possède une bonne aptitude à résister à des conditions sèches ou froides. **(MATHIEU M, 2002). Elle constitue, par conséquent, un excellent précédent cultural dans la rotation des cultures.**

Par ailleurs, étant très appréciée par les cheptels aussi bien en vert qu'en sec. **(TOUTAIN G, 1992).** La luzerne est considérée, comme le meilleur fourrage dans l'alimentation du bétail **(tableaux n° 01)** par sa production de fourrage de bonne qualité au cours d'une longue période (printemps, été, automne) ainsi que sa longévité (4 à 6 ans).

Tableaux 01: Valeur nutritive et digestible de la luzerne.

stade	MS (g/kg)	MO (g/kg)	valeur énergétique			valeur azotée MA (g/kg MS)	minéraux	
			UFL	UFV	EM		Ca	P
floraison	251	881	0,55	0,56	1960	118	20	1,8

(ALIBES et TISSERAND, 1981 in CHAIBA S, 1998).

Tableaux 02 : estimation des quantités d'azote fixé par différentes légumineuses cultivées (valeurs extrêmes entre parenthèses).

espèce	azote fixé kg/ha
luzerne	200(56-463)
trèfles	183(45-673)
lupin	176(145-208)
fèverole	210(45-552)
pois	65(52-77)
lentille	101(88-114)
soja	75(1-168)

(SOLTNER, 2007)

En conclusion, il en ressort que les principaux avantages de la luzerne résident dans sa productivité, la régularité de son rendement, sa facilité d'installation et son faible prix de revient. **(GUY, 1976 in CHIBA S, 1998).**

Chapitre IV : LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

Sachant que l'azote gazeux de l'atmosphère ne peut être utilisé directement par les plantes mais celui-ci peut parvenir aux plantes que par des voies indirectes. La plus importante de ces voies est la fixation biologique par les bactéries libres ou associées (symbiotiques). **(SOLTNER, 2007).**

01)- La fixation libre d'azote :

Elle est réalisée par des bactéries dites diazotrophes qui sont des bactéries libres vivant dans le sol et ayant la capacité de fixer librement l'azote grâce a un enzyme qui appelée la nitrogénase (enzyme identique chez tout les bactéries fixatrice d'azote).

Ces bactéries, comportent trois familles :

-**Les Azotobacters,** bactéries aérobies, l'espèce la plus courante est Azotobacter chroococcum hétérotrophe pour le carbone, ils vivent en association avec des bactéries cellulolytiques, et fixent de 10 à 20 mg d'azote/g d'ose consommé.

-**les clostridiums**, bactéries anaérobies, exemple Clostridium pasteurianum. Egalement hétérotrophes pour le carbone elles fixent de 2 à 12 mg d'azote/g d'ose consommé

-**les Cyanobactéries ou Cyanophyceés**,(anciennement algues bleues), par exemple Nostic ou Anaboena, elles sont autotrophes (fixe le carbone par leur chlorophylle) et fixent l'azote même à l'obscurité à partir des oses qu'elles synthétisent ou trouve dans leur alimentation**.**

La quantité d'azote fixé par cette voie est estimée par 10 à 50 kg/ha/an.

(SOLTNER, 2007).

02)- La fixation symbiotique :

C'est en 1838 que l'agronome français **Boussingault** montra que les légumineuses pouvaient assimiler l'azote de l'air, et que cette fixation était liée à la présence sur leurs racines de nodosités ou nodules colonisés par des bactéries. Ces bactéries (Rhizobiums), découvertes par **Hellriegel** et **Wilfarth en 1886**. Ces dernières sont connues par leur capacité d'établissement d'une relation de mutualisme avec famille des légumineuses.

Les deux partenaires de la symbiose fixatrice d'azote sont caractérisés par leur spécificité qui est le résultat d'un échange de signaux chimique, une souche de rhizobia donnée ne peut infecter et noduler n'importe quelle légumineuse**. (PELMONT, 1992 in AZIZI S, 2005).**

D'après **SOLTNER, 2007**, la quantité d'azote fixé par cette voie est estimée par 50 à 100 kg/ha/an, jusqu à 350 kg.

2-1)- le partenaire plante : « Légumineuse »

C'est **BOUSSINGAULT, 1838** ; qui mit en évidence l'aptitude des légumineuses à utiliser l'azote atmosphérique, mais seulement cinquante ans plus tard que **HILLIEGEL et WILFARTH** démontrent de façon indiscutable que seules les légumineuses modulées sont capables de fixer l'azote atmosphérique et le siège de la fixation se trouve dans les nodules. **(NUTMAN, 1965 in DOMMREGUE et MANGENOT, 1970). (Voir le Chapitre III)**

2-2) – le partenaire bactérien: « Rhizobium »

A l'état libre dans le sol, les Rhizobiums sont difficilement identifiable ; seule la propriété d'induire la formation de nodule sur le système racinaire des légumineuses permet de les reconnaître**. (BLONDEAU, 1980 in LABASSI M, 1991).**

La famille des Rhizobiacées est constituée par un ensemble hétérogène de bactéries ; le genre Rhizobium est de gram-négatifs, de forme bâtonnet (0,5-0,9 x 1,2-3 um), aérobie, non sporulant chimiohétérotrophes ; qui peuvent infecter les racines et parfois le tiges des légumineuses pour y forme des nodules (structure aussi désignées sous terme nodosités). (**DOMMERGUES et DUHOUX et DIEM, 1999 et SINGLETON P, 2005)**

Le pH optimal de croissance se situe entre 6,5 et 7,2 et ils sont très mobiles quand ils sont jeunes. Parmi les propriétés des ces bactéries, nous retenons :

- L'infectivité, qui est la capacité des bactéries à pénétrer dans la racine de la plante hôte, d'induire la formation d'un cordon d'infection puis d'une nodosité.
- L'efficience, caractérise l'aptitude à fixer l'azote moléculaire.
- La spécificité d'hôte, ne permet qu'à certaines souches d'entrer en symbiose avec une légumineuse donnée**. (DOMMERGUES et MANGENOT 1970, in LABASSI, 1991)**

2-2-1) - La classification du Rhizobium :

Cette fixation est réalisée grâce aux bactéries appartenant à la famille des Rhizobiacées actuellement désignées par les BNL (bactéries nodulant les légumineuses) et ayant connu beaucoup de modification taxonomique. La classification la plus récente est résumée dans le tableau 02 :

2-2-2)-La nitrogénase et son fonctionnement :

La réaction de la fixation de N_2 est catalysée par un complexe enzymatique appelé nitrogénase, qui est constitué de deux composantes :

- la protéine molybd-ferrique ou **dinitrogénase,** cette protéine est le site de réduction de N2, c'est un tétramètre de poids moléculaire de 245 KD.

- la ferro-protéine ou **dinitrogénase-réductase**, cette deuxième protéine fournit les électrons à la dinitrogénase c'est un homodimère de poids moléculaire de 64KD.

C'est deux protéines sont conservées chez tous les organismes fixateurs deN2, les électrons nécessaires à la réaction sont fournis par un puissant donneur d'électrons,la dinitrogénase-réductase accepte un électron et se complexe avec deux molécules de Mg-ATP,puis s'associe avec la dinitrogénase pour former un complexe enzymatique actif .il y transfert d'un électron de la dinitrogénase-réductase à la dinitrogénase et simultanément,il y a libération de deux molécules de Mg-ADP et de phosphate.

Puis les deux composants de la nitrogénase se séparent et la dinitrogénase-réductase set prête à recommencer le transport d'un électron vers la dinitrogénase. Lorsque la molécule de dinitrogénase est suffisamment réduite, le substrat N2 est réduit en NH3.

La réduction de protons en H_2 se produit en même temps que la réduction de N_2, et requiert autant de protons qu'il y a d'électrons impliqués dans la réduction de N_2.

L'azote ammoniacale formé est ensuit incorporé dans le glutamate, puis suit voies métaboliques divers. **. (DOMMERGUES et DUHOUX et DIEM, 1999).**

2-2-3)- la leghémoglobine :

Un nodule de légumineuses est un système aérobie, quand il fonctionne bien il contient toujours une forte concentration de leghémoglobine, ce pigment a une forte affinité pour l'oxygène**. (APPLERBY, 1974 in BOUABOUB K, 1991).**

La leghémoglobine est une hemoprotiéne qui n'a pas pu être détectée dans les organes végétaux autres que les nodules des légumineuses.

(APPLEBY, 1974. in LABASSI M, 1991)

La leghémoglobine, très proche de l'hémoglobine du sang, colore en rose ou rouge les nodosités. Synthétisées à partir de la plante hôte, elle reste dissoute dans le cytoplasme des cellules des nodules. Or, si dans le sang l'hémoglobine est un transporteur d'oxygène, son rôle

est à peu près le même chez les plantes fixatrices ; elle assure aux bactéries l'oxygène dont elles ont besoin **(SOLTNER, 2007**).

03)- Processus de la fixation :

Plusieurs stades ont été déterminés dans ce processus

A- Absorption des bactéries sur les racines :

L'absorption des Rhizobiums sur les racines de la plante hôte est un phénomène de reconnaissance cellulaire faisant intervenir des récepteurs de surface chez les deux partenaire de la symbiose. des expériences ont permis de montrer que les Rhizobium s'attachent en quelques minutes en général de façon polaire sur les cellules corticales et les poils absorbants à l'extrémité de la racine de leur hôte**.(TURGEON et BAUER, 1982 in BOUABOUB K, 1991).**

B- Infection et genèse du nodule :

L'infectivité varie d'une souche à l'autre et peut présenter des degrés très variables. A l'intérieure du poil absorbant, les Rhizobiums sont entourés par un cordon d'infection, ce dernier traverse les cellules corticales. Lorsque le cordon d'infection est sur le point d'atteindre une cellule tétraploïde préexistant dans le cortex, il y a stimulation de la division de cette cellule tétraploïde et des cellules voisines.

C- Maturité nodulaire :

Les Rhizobiums sont libérés dans le cytoplasme des cellules de l'hôte par une invagination du plasmalemme du cordon, qui constituera la membrane enveloppe des bactéries. Ces dernières se transforment ensuite en bactéroides. **(DENARIE et TRUCHET, 1979 in BOUABOUB K, 1991).** C'est au cours de cette phase que la leghemoglobine se forme colorant en rose la zone infectée et que l'azote moléculaire est fixé**. (DOMMERGUES et MANGENOT, 1970 in BOUABOUB K).**

D- Phase de dégénérescence :

La dégénérescence du nodule se propage du centre à la périphérie, elle se manifeste par la lyse des bactéroides et la disparition de la leghémoglobine, cette phase aboutit à la libération des bactéries dans le sol. **(BOUAB0UB K, 1991).**

04)- Le siége de la fixation symbiotique : « Le nodule »

Le nodule de légumineuses est le résultat d'interactions fort complexes entre le partenaire bactérie (Rhizobium) et la racine à laquelle il s'est spécifiquement associé. **(RIGAUD J, 1985).** Dans le nodule, le Rhizobium augmente de dimension, change de forme pour devenir un bactéroide**. (BOUABOUB K, 1991).**

4-1)-La formation et la structure des nodules :

Les nodules sont le siège d'une interaction symbiotique entre d'une part, la bactérie qui fixe l'azote atmosphérique (N_2) et le fournit à la plante hote sous une forme assimilable (NH_3) et d'autre, la plante hote qui procure à la bactérie un micro habitat exceptionnellement favorable et les substrats carbonés provenant de la photosynthèse.

Dans tous les cas, le nodule comporte, en allant de l'extérieur vers l'intérierieur, l'épiderme et le cortex externe, le parenchyme nodulaire (appelé antérieurement cortex interne), qui renferme les tissus vasculaires et la zone centrale infectée, qui est le siége de la fixation de la N2. Dans cette zone toutes les cellules ne sont pas infectées, sauf chez certaines espèces comme *Arachis hypogaea* et *Sesbania rostrata. (***DOMMERGUES et DUHOUX et DIEM, 1999).**

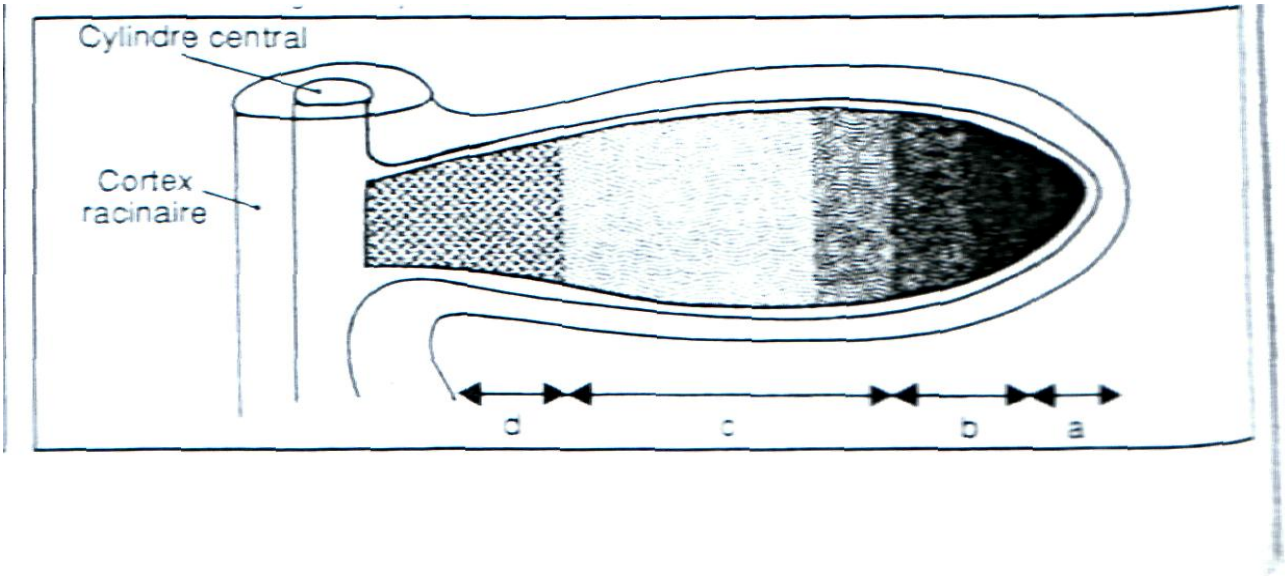


Figure 05 : Une nodosité de légumineuse d'après SOLTNER, 2007.

a : zone méristématique; **b** : zone de cellules récemment infectées ;

c : zone de tissus bactérien actif ; **d** : zone de dégénérescence.

4-2)- Les formes des nodules :

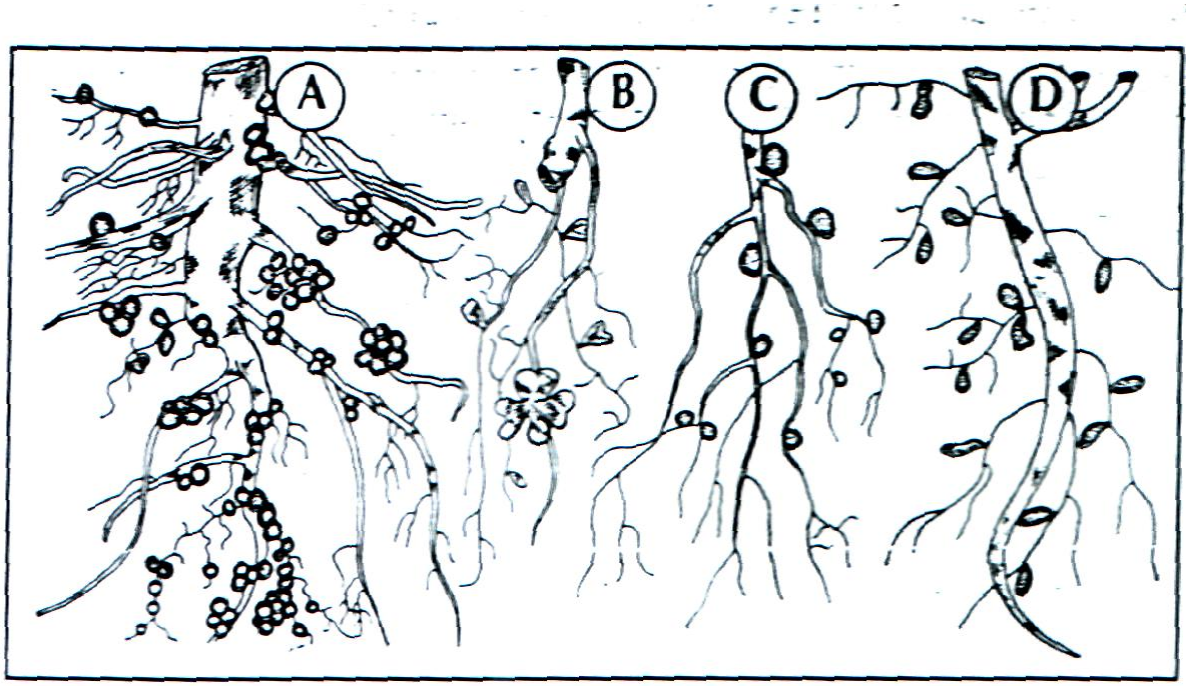


Figure 06 : Les différentes formes de nodosités d'après BOULARD B .

A : sphériques chez le soja ; **B** : bifurquées chez la luzerne ;
C : globuleuse chez le pois ; **D** : ovoïdes chez le trèfle blanc.

4-3)- Nodules déterminés et indéterminés :

On distingue deux types de nodules : les nodules **indéterminés**, qui comportent un méristème nodulaire persistant, et les nodules **déterminés**, chez lesquels ce méristème n'existe pas (par méristèmes on entend ici un ensemble de cellules en voie de division qui se perpétue tel quel et non simplement un ensemble de cellules qui se divise activement pendant un certain temps pour se différencier ultérieurement). Le type de nodule formé est déterminé par la plante hote et non par la souche de rhizobium. Les nodules déterminés existent chez les légumineuses comme le soja, l'organogenèse nodulaire débute par des divisions des cellules corticales externes de la racine

(Newcomb et al, 1979). Les nodules indéterminés a d'abord été décrit chez des espèces tempérées comme le pois, la luzerne ; on l'a ensuite découvert chez *Mimosa scabrella* et *Leucaena leucocephala*. **.(DOMMERGUES et DUHOUX et DIEM, 1999).**

05)-Les facteurs agissant sur la fixation symbiotique :

La fixation symbiotique peut être perturbée grâce à des facteurs d'origine externe liée au milieu soit d'origine interne liée au Rhizobium et plante hôte, ces facteurs peuvent influés sur la fixation d'azote atmosphérique.

5-1)- Facteurs internes :

La symbiose entre plante légumineuse et *Rhizobium* implique un processus de reconnaissance spécifique dont chaque espèce de *Rhizobium* ne peut infecter qu'une gamme bien précise des espèces de légumineuses, cette gamme peut être large comme chez la souche «*Rhizobium* sp. *NGR234* », et peut être très étroite comme chez la souche « *Sinorhizobium meliloti* » qui ne sont pas actives que sur les racines de la luzerne. **(FRANÇOIS et GAUDRY, 1997).**

. De nombreux travaux récents sur la symbiose végétale démontrent que la fixation symbiotique ne peut s'exprimer que si le Rhizobium présente un grand pouvoir d'infectivité des racines et aussi génétiquement compatible avec sa plante hôte.

Selon une expérience faite pour déterminer la présence et l'efficience des Rhizobium autochtones spécifiques des légumineuses alimentaire cultivées en Tunisie, il a été démontré que le taux de la fixation symbiotique exprime le degré de l'affinité génotypique entre les deux partenaires puisque pour une même variété de légumineuse, l'inoculation avec différents isolats engendre des rendements largement différents **(DAHMANE et al, 1995).**

5-2)- Les facteurs externes :

- La température :

D'après **SAXENA et SINGH (1987) et WERY (1987), in AZIEZ et MAHKTOUB (1995)**, les extrêmes de températures affectent sérieusement la fixation d'azote et l'infection racinaire. Selon une expérience faite sur l'effet de température sur la fixation et l'assimilation

de l'azote chez le pois chiche, a montrée que l'activité nitrates réductase, l'activité réductrice d'acétylène ainsi que la teneur en nitrate du pois chiche sont sensible à l'action directe de température. En effet des plants de pois chiche soumis à des températures extrêmes développent une ARA faible, par contre des températures moyennes de l'ordre de 25°C semblent favoriser cette activité **(KICHOU et SAHRAOU, 2001)**

- La lumière :

Il existe une relation entre l'intensité lumineuse, la photosynthèse, la nodulation et la fixation. La lumière intervient indirectement sur la fixation d'azote, en effet, un point d'éclairement accroît à la fois le membre de nodules et la fixation d'azote **(LAWN et BRUN, 1974 in LABASSI M, 1991).**

-L'eau :

Le déficit hydrique provoque une diminution de pois frais, du nombre des nodules et de l'ARA **(CHEBOUTI et ABDELGHERFI, 2000). OUNANE (1995),** démontrent que les gros nodules sont capables de résister mieux au déficit hydrique et maintenir une bonne activité nitrogénase que les petites nodules et cela due à la présence d'un parenchyme cortical plus épais qui empêche ou réduit leur déshydratation

- La salinité :

La nodulation en général est inhibée si la salinité atteint 8 mmhos/cm. Ce phénomène se caractérise davantage par une diminution du nombre de nodosités que par une réduction de leur poids **(SINHA, 1980 in LABASSI M, 1991)**

- Le pH:

Selon **DOMMERGUES et MANGENOT (1970)**, l'acidité peut provoquer une mauvaise assimilation des éléments minéraux à cause de la toxicité allumique et manganique et une diminution de l'absorption de calcium et de molybdène. Le pH neutre ou légèrement alcalin semble donc entre plus favorable au phénomène de la nodulation et de la fixation de l'azote. Lorsque la plante est nodulée, la fixation d'azote elle-même est peu sensible au pH, car la plante renferme un système efficace de régulation on interne du pH.

- L'azote :

L'existence de nitrates et des ions ammoniums en abondance dans le sol inhibe la fixation symbiotique **(HELER et al, 2007).** Pour **MAZE in DUCULOT (1932) ,**

Lorsque le milieu nutritif est suffisamment pourvu en nitrate, les sucres sont utilisées pour la synthèse albuminoïde il n'en reste pas assez pour jouer dans les poils radiculaire un rôle attractif sur le microbe. Ainsi, elles provoquent l'avortement du cordant d'infection lors les stades précoces d'initiation qui va entraîner une diminution du nombre des nodules par plante **(FRANÇOIS et GAUDRY, 1997).** Malgré tout ça, il est conseillé d'apporter une faible dose de nitrate au début de cycle de croissance des légumineuses pour couvrir l'insuffisance de la fixation d'azote liée à la mise en place progressive des nodules.

- Phosphore :

Le phosphore est un élément reconnu comme étant indispensable à la vie du monde végétal. Ceci signifie qu'en son absence le développement de toute forme de vie végétale n'est réalisable**.(LABASSI L, 1991).**

- Potassium :

Les travaux de **MENGEL et al, (1974)** sur la fève montrent que les doses croissantes de potassium apportées à la plante augmentent significativement le nombre et le poids des nodules.

- Les oligoéléments

Les fixateurs en besoins d'oligoéléments comme le fer, le cuivre, le cobalt, le molybdène et le bore **(VILIN, 1997).** Ces éléments sont nécessaires à des doses infiniment faibles **(SOLTNER, 2001).** Le molybdène et le fer jouent un rôle important dans le fonctionnement de la nitrogénase **(HELLER et al, 2007, in BEN BESSISSE Y, 2010)**

Chapitre V : MATÉRIELS ET MÉTHODES

01)- Méthodologie de travail adoptée :

L'objet de ce travail est l'évaluation de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique in situ, la méthodologie adoptée dans ce travail consisté à étudier tous les partenaires de l'association symbiotique et qui sont (rhizosphère, luzerne et la souche de rhizobium) dans le but d'estimer au mieux la quantité totale d'azote fixée biologiquement dans la région d'El-Goléa (site expérimental). A cet effet, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- **i.** La caractérisation du milieu par les analyses physico-chimique du sol et de l'eau avant le semis dans le site d'expérimentation ;
- **ii.** suivi de l'évolution de la teneur en azote dans le sol et le végétal tout au long de notre expérimentation ;
- **iii.** mise en évidence de l'association symbiotique avec les trois cultivars de luzerne et identification des souches de BNL ;
- **iv.** suivi comparatif de l'évolution des critères symbiotiques différents cultivars de luzerne ;
- **v.** confirmation au laboratoire des critères symbiotiques des associations (souches locales de BNL / variétés de luzerne) dans les conditions contrôlées (in vitro)

La méthode de différence consistant à évaluer approximativement la quantité de N_2 fixé biologiquement, pendant une période de temps, au niveau du végétal et au niveau du sol a été utilisée, pour atteindre l'objectif du présent travail.

02)- Mise en place de l'essai :

2-1)- Le dispositif expérimental :

Le dispositif utilisé, c'est le bloc aléatoire complet de 09 parcelles (O3 variétés de luzerne et 03 répétition) puisque le sol est homogène et on a un seul traitement qui est la variété. Avec des parcelles élémentaires de 2m de longueur sur 1m de largeur chacune**.**

2-2)- Mise en place de la culture :

2-2-1)- Le travail du sol :

Pour arriver à obtenir un sol bien ameubli, on a effectue un travail du sol qui passe par les étapes suivantes :

- Pré irrigation a été effectuée un jour avant le labour.
- Labour profond: a été fait manuellement à l'aide d'une houe pour une profondeur qui dépasse le 30 cm pour bien ameublie le sol.
- Confection des parcelles: après hersage, on procéde à la confection des parcelles d'une superficie de 2m² chacune.

2-2-2)- Epandage d'engrais:

A cause de la faible fertilité du sol, en raison de sa texture sableuse et sa teneur faible en matière organique, on a à utilise fosphactyle, (acide phosphorique soluble 14%, phosphore 22%, potassium 18%, azote 3%, et le reste des éléments ce trouvent en traces) dans chaque parcelle après le labour.

2-2-3)- Préparation du lit de semence :

Pour l'obtention d'une surface bien homogène qui permet une répartition convenable de l'eau et un semis homogène, on a réalisé un nivellement par râteau.

2-2-3-1)-Le semis:

- Le semis a été effectué le **15/09/2010**, c'est la période convenable pour le semis de la luzerne.
- La dose de semis appliquée est 30Kg/ha soit environ 6,5g/parcelle.
- Le mode de semis à la volée dont la dose est bien répartie sur toute la parcelle, puis les semences sont enfouis à une profondeur de 3cm d'environ.

2-2-3-2)- L'irrigation :

L'irrigation a été effectuée une fois par semaine, avec un système d'irrigation traditionnel, submersion.

Photo01 : le dispositif expérimental.

03)-Matériel utilisé :

3-1)- Echantillons de sol:

Des échantillons du sol ont été prélevés dans le site de notre expérimentation à profondeur de 15 cm dans le stade 01 et 20 cm dans le deuxième stade et 25 cm dans la troisième stade, et ramenés au laboratoire pour analyses physicochimiques.

3-2)- Echantillons d'eau :

Pour connaitre les caractéristiques de l'eau d'irrigation un échantillon d'eau a été ramené au laboratoire pour analyse

3-3)- Matériel végétal :

Trois (03) différentes variétés ont fait l'objet de notre expérimentation à savoir

- la variété d'El-Goléa : considérée comme variété locale qui est la plus anciennement utilisée dans la région d'El Goléa;
- la variété T'émacie : considérée comme variété locale dans une autre région Saharienne du sud est algérien ;
- Arabie saoudite : considérée comme variété introduite et commercialisée par les réseaux d'approvisionnement et tés utilisée dans la région d'El Goléa.

3-4)- Matériel microbiologique :

3-4-1)- collection et conservation des nodules

Les nodosités apparaissant sur les racines des trois variétés de luzerne prélevée sont conservées dans des tubes contenant un dessiccateur ($CaCl_2$).et ramenés au laboratoire pour isolement et identification des souches de BNL.

Photos 02) : le matériel microbiologique.

3-4-2)- Milieu de culture :

Pour la culture des souches du rhizobium, on a utilisé le milieu de culture Yeast Extra Mannitol Agar (YEMA), dont la composition est la suivante :

- KH_2PO_4 : 0,4g,
- NaCl : 0,1g,
- $MgSO_4$: 0,2g,
- Extrait de levure : 0,5g,
- Mannitol : 10g,
- Agar : 15g,
- Eau distillée : 1000ml

Le pH est ajusté à 6,8 en suite la solution est stérilisé par autoclavage à 120°c pendant 20min. A cause de l'absence d'un milieu sélectif rend l'obtention de souche pure très difficile. Pour cela, on ajoute 1ml d'une solution de rouge Congo à 2,5% à 1000ml de milieu YEMA dont le rhizobium absorbe faiblement le rouge Congo par rapport à d'autre contaminant. **(VINCENT, 1970).**

3-4-3)- Milieu Farhaeus : (solution nutritive sans azote) **(VINCENT, 1970)**

-Macroéléments :

$NaH2PO_4$: 0,15g

$KH2PO_4$: 0,1g

$CaCl_2$: 0,1g

$MgSO_47H_2O$: 0,12g

Eau distillée : 1000ml

-Micro-éléments :

H_3BO_3: 2,86g

$MnSO_4$: 2,08g

$ZnSO_4$ $7H_2O$: 0,22g

$CuSO_4$ $5H_2O$:0,08g

Na_2MoO_4: 0,11g

Eau distillée: 1000ml

- Préparation de fer citraté :

Fe-citraté: 0,05g

Eau distillée: 10ml.

3-4-3)-Appareillage : (voir annexe).

04)-<u>Méthodes</u> :

4-1)- Analyses physico-chimiques du sol :

Elles ont porté sur les propriétés suivantes: granulométrie, densité apparente, conductivité électrique, pH , calcaire total, matière organique et azote total.

04-1-1)- Granulométrie :

Cette analyse a été réalisée au niveau de laboratoire des travaux publics des sols (LTPS) Ouargla, par la méthode de tamisage à voie sèche pour les éléments grossiers et pour les éléments fins. On se base sur la loi de STOCKES par la méthode de sédimontométrie. **(SOLTNER, 2005)**

04-1-2)- Densité apparente:

Elle est déterminée par mesure de poids de terre/volume de terre en place.

04-1-3)- Mesure de conductivité électrique :

Elle est obtenue par conductimètre sur des extraits 1/5.

04-1-4)- Mesure de pH :

Les mesures ont été effectués sur des extrais 1/2 ,5 à l'aide d'un pH-mètre.

04-1-5)- Dosage de calcaire total:

Il est effectué par la méthode de gazométrie par le calcimètre de Bernard.

04-1-6)- Matière organique :

La matière organique est déterminée après dosage du carbone organique par la méthode d'Anne.

04-1-7)- Azote total : Réalisé par la méthode de KJELDAHL.

4-2)- Analyse de l'eau d'irrigation :

Pour connaitre les caractéristiques de l'eau nous avons mesuré salinité à l'aide d'un conductivimètre et le pH par un pH-mètre.

4-3)- Détermination de la faculté germinative :

Pour déterminer la qualité de la semence on s'est basée sur le test de faculté germinative dans un phytotron réglé à 25°c pendant 4 jours puis on réalise un comptage des semences germées.

4-4)- Paramètres biométriques :

4-4-1)- Mesure de la croissance :

Les mesures de croissance ont été effectuées parce que ils ont un lien indirect avec la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique dont lorsque le processus de fixation se déroule dans la bonne état la biomasse végétal sera importante **(POUSSET, 2002).**

Toutes les mesures ont été prises dans trois stades bien déterminés :

- La première coupe (stade début floraison), le **28/12/2010**.
- La deuxième coupe (stade début floraison), le **17/02/11**.
- La troisième coupe (stade début floraison), le **26/03/11**.

Dans ces mesures on a intéressé par la croissance de la partie aérienne et celle de la partie souterraine.

4-4-1-1)- Partie aérienne :

Les mesures concernent les paramètres suivants:

- Poids sec **(PSPA)** : après séchage dans l'étuve à 60°C pendant 48h, les parties aériennes des plantes prélevées au centre de chaque parcelle sont pesées.

4-4-1-2)- Partie souterraine :

- Nombre, taille et forme des nodules : les plantes choisis au hasard, sont soigneusement déterrées en évitant la perte des nodosités. Leur nombre, leur taille ainsi que leur forme constituent des critères ayant un lien direct avec l'efficience symbiotique.
- Poids sec **(PSPS):** après séchage dans l'étuve à 60°C pendant 48h, les parties souterraines (racines) des plantes.

4-4-2)- Analyses chimiques :

Pour arriver à quantifier l'azote fixé par le biais de la fixation symbiotique (objectif de ce travail), on réalise un dosage d'azote total par la méthode de KJELDAHL. Sur la matière végétale et aussi au niveau du sol dans différentes stades

- dosage d'azote total dans la partie aérienne : pour chaque stade on prélève dix plantes de chaque parcelle puis sécher à 60°c pendant 24h et les broyer ensemble pour avoir un échantillon pour chaque variété.

En fin on passe au dosage d'azote selon la méthode de KJLDAHL.

- Dosage d'azote total dans la partie racinaire pour les mêmes stades.
- Dosage d'azote total dans le sol: à chaque stade, lorsque on arrache les plantes on ramasse le sol de la zone de rhizosphère dans des sachets en plastiques puis on les séchés à l'air libre, ensuite tamisé en 2mm, enfin on dose l'azote total par la méthode de KJELDAHL **(SOLTNER, 2005)**

4-4-3)- Détermination de la quantité de l'azote fixé dans le sol :

La quantité de l'azote est déterminée à partir de la teneur en azote dans le sol par la formule : Poids sol × teneur en azote,

Poids sol = profondeur racines efficace (m) × densité apparente du sol (t/m³) × 10000(m²). **(Anonyme, 1965).** La profondeur racinaire de la 1er stade = 15cm, et de la 2éme stade = 20 cm, et pour la 3éme stade = 25 cm.

Ensuite, la différence entre les quantités d'azote obtenu dans le stade T0 (avant la mise en culture) et le stade T3 (la troisième coupe), période de 192 jours, c'est la quantité produite par la fixation symbiotique.

4-4-4)- Isolement et identification des bactéries symbiotiques :

Cette phase consiste à l'isolement de la bactérie et l'étude de ses caractères phénotypique permettant de l'identifier. A cet effet, les étapes successives d'étude sont résumées dans ce qui suit :

4-4-4-1) –désinfection des nodules:

Les nodosités conservées au $CaCl_2$ sont imbibées dans l'eau distillée pendant 15mn. Elles sont désinfectées par passage dans l'eau de javel pendant 1mn puis dans l'éthanol à 90% pendants 30 secondes. En fin les nodules sont rincés dans cinq bains d'eau distillée stérile.

4-4-4-2)- Extraction des bactéries :

Les nodules désinfectées sont écrasées dans une goutte d'eau distillée stérile à l'aide d'une spatule flambée ; la suspension obtenue est étalée dans les boites de pétri contenant du milieu YEMA. Les boites sont ensuite mises en incubation à 28°c

4-4-4-3) - Coloration de Gram:

La purification est suivie d'une coloration de Gram, et les isolats Gram négatifs sont retenus.

4-4-4-4)- Purification:

Après trois à quatre jours d'incubation, les colonies bactériennes présumées appartenir au genre Rhizobium, sont reconnaissables par la non absorption du rouge Congo et à leur aspect gommeux et translucide. On réalise des repiquages successifs sur YEMA pour éliminer les autres contaminants.

4-4-4-5)- Test de nodulation :

Le test de nodulation est un critère important dans la caractérisation des souches de *Rhizobium*, extraits des nodosités des différentes variétés de luzerne ne peuvent être identifiés comme rhizobium qu'après avoir prouvé leur capacité à former des nodosités sur leur plante hôte en conditions bactériologiques contrôlées,

Le test est réalisé sur milieu liquide « milieu Farhaeus » , c'est une culture dans des tubes au laboratoire de l'université de ITASS. Tout le matériel utilisé est stérilisé, le dispositif de culture en milieu liquide est stérilisé par autoclavage à 120°c pendant 20mn.

4-4-4-5-1)- Stérilisation et germination des semences :

Les semences de la luzerne sont stérilisées par rinçage dans l'eau de javel pendant 3mn, puis rincées dans trois bains d'eau distillée stérile.

En suite, ces semences sont mises à germer, dans des boites pétries contenant l'eau gélosé stérile (7g /l), dans un phytotron à 25°c.

Photo03 : les germes des semences

4-4-4-5-2) - Mise en culture et inoculation :

Les tubes (22x15) contenant une languette de papier kraft (pour assurer la remontée de l'eau par capillarité) sont remplis jusqu'à 2/3 de leur volume de solution nutritive (sans azote).

Après trois jours, lorsque les feuilles cotylédonaires apparaissent, les plantules sont transférées dans les tubes et leur ouverture est fermée par du papier aluminium.

Chaque test a connu 03 répétitions et 03 témoins pour chaque variété. La totalité des tubes sont couvert à moitié par une boite de carton trouée pour assurer la protection de sa partie racinaire de la lumière. L'ensemble est placé dans endroit ensoleillé prés d'une fenêtre. A la suite de cela, l'inoculum est préparé avec l'isolat prélevé à partir du milieu YEMA et dilué par l'eau distillée stérile, l'inoculation est réalisée par injection de cette suspension au niveau des racines à l'aide d'une seringue qui a été réaliser une semaine après la mise en culture.

Photo04) : les tubes du test de nodulation.

05)- Confirmation in vitro des critères symbiotiques :

Après l'observation des nodules et afin de confirmer in vitro les critères symbiotiques (nombre, forme et couleur des nodules), nous avons continué le suivi de notre dispositif cité ci-dessus en le mettant dans le phytotron.

Chapitre VI: RESULTATS ET DISCUSSIONS

1)- Résultats :

1-1)- Conditions expérimentales :

1-1-1)- Propriétés physicochimique du sol et de l'eau dans le site d'expérimentation :

Le tableau ci-dessus résume les résultats obtenus suite aux différentes analyses physicochimiques du sol.

Tableau 04 : Résultats des analyses physicochimiques de sol d'El Goléa

Granulométrie	
Sable grossier (%)	30
Sable fin (%)	65
Limon (%)	3
Argile (%)	1
Analyses chimique	
Calcaire total (%)	4,38
Conductivité Electrique (d S/cm)	0,35
Densité apparente (g/cm³)	1,32
pH	7,80
MO (%)	0,54
C (%)	0,48
Azote total (%)	0,0035

Selon les échelles de **SOLTNER (2005),** les valeurs indiquées (tableau 04), montrent que le sol étudié présente une texture sableuse avec une très faible fraction en argile, une structure non dégradé où la densité est de 1,32,*un* pH alcalin de 7,80 et une valeur de conductivité faible de 0,35dsm/cm. En plus, ce sol se caractérise par fertilité assez faible, un taux de matière organique très faible, associée à une faible teneur en calcaire.

Concernant la qualité de l'eau, utilisée pour l'irrigation des parcelles d'expérimentation, elle se caractérise par une faible conductivité électrique (CE de 0,26 d S/m) et un pH neutre 7,00.

1-1-2)- Faculté germinative :

Les semences utilisées présentent les caractères résumés dans le Tableau 05**.**

La faculté germinative est satisfaisante, car d'après **FOURY ,1954 in CHAABNA, 2001,** elle doit être considérée comme satisfaisante si elle est supérieure de 89%.

Tableau 05: caractéristiques des semences.

variétés	PMG (g)	FG	couleur
VL	2,54	94%	jaune clair
VAS	2,67	93%	jaune plus foncé
VT	2,63	95%	jaune foncé

1-2)-Présentation et analyse des résultats de l'association symbiotique Rhizobium-Luzerne fourragère :

Le tableau 06 présente les moyennes des résultats obtenus dans les trois stades pour cette expérimentation.

Tableaux 06 : les moyennes des résultats et d'analyses et des mesures expérimentales :

		PSPA (g/m²)	PSPR (g/m²)	nbr des nod	taille des nod (mm)	Formes des nod			couleur des nod	QNPA (kg/ha)	QNPR (kg/ha)	QNS (kg/ha)
						mon	bi	plu				
VL	SI	1200	460	8,5	3,4	31	7	12	98%rose	42,00	12,05	105,4
	SII	2200	920	10,54	4,2					99,00	25,30	124
	SIII	2800	1580	10,56	5,1					105,00	42,34	172
VAS	SI	1520	700	7,45	2,5	35	8	7	95%rose	39,22	17,92	89
	SII	2520	1400	8,54	3,2					111,63	37,25	106
	SIII	3220	2300	9,14	4,5					116,56	60,26	158
VT	SI	2260	800	7,12	2,7	34	3	10	96%rose	62,15	20,00	83
	SII	3260	1620	8,5	4,0					142,46	42,44	104
	SIII	4200	2600	9,12	3,8					128,52	66,56	154

PSPA : poids sec de la partie aérienne.
PSPR : poids sec de la partie racinaire.
nbr : nombre.
nod : nodules.
QNPA : la quantité d'azote total dans la partie aérienne.
QNPR : la quantité d'azote total dans la racine.
QNS : la quantité d'azote total dans le sol.

1-2-1)- La nodulation :

1-2-1-1)- Observation des nodules :

La mise en évidence de l'association symbiotique a été traduite par l'observation des nodules sur les racines pour les trois variétés, « Arabie saoudite » et « El-Goléa » et la variété « Temacine » »14 jours après le semis.

Photo 05) : Nodules sur les racines de la luzerne.

1-2-1-2)- Le nombre de nodules :

L'analyse des résultats obtenus (annexe) montre que la variété d'El-Goléa présente un nombre total des nodules plus important que la variété d'Arabie saoudite et la variété Temacine. Au premiers stade, la variété ''El-Goléa présente dans le premier stade une valeur moyenne de 8,50 nodules par plante alors que la variété ''Arabie saoudite'' présente 7,45nodules par plante et la variété 7,12 nodules pour le même stade. Par ailleurs, la figure 07 ci-dessous illustre l'évolution du nombre des nodules au cours des trois coupes.

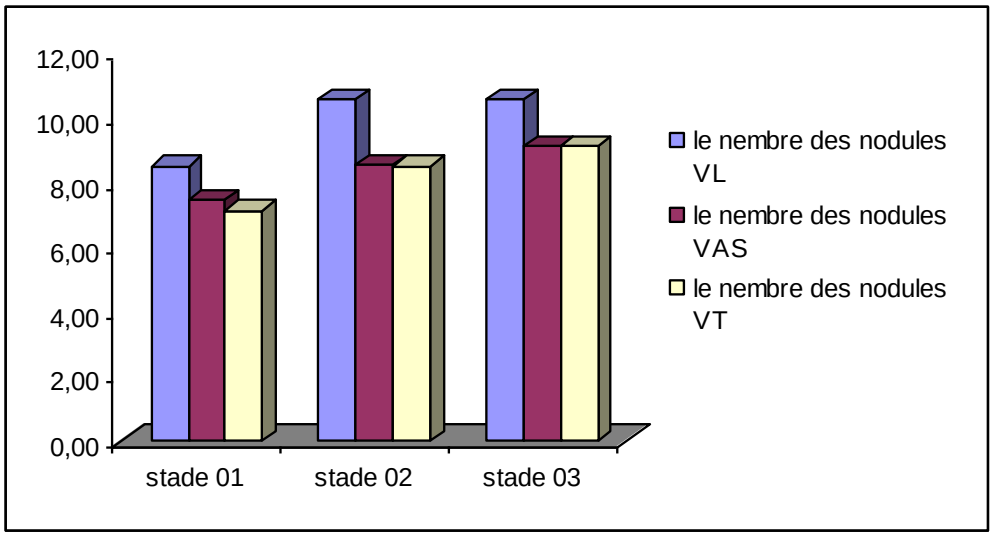


Figure 07: Evolution du nombre total des nodules des différents stades.

1-2-1-3)- Forme et couleur des nodules :

Les nodules sur les racines de la variété locale d'El-Goléa sont de couleur rose avec une forme allongée généralement simple et parfois ramifiée. Elles sont réparties sur toute la racine mais surtout sur les racines secondaires comme chez la variété Arabie saoudite et la variété Temacine.

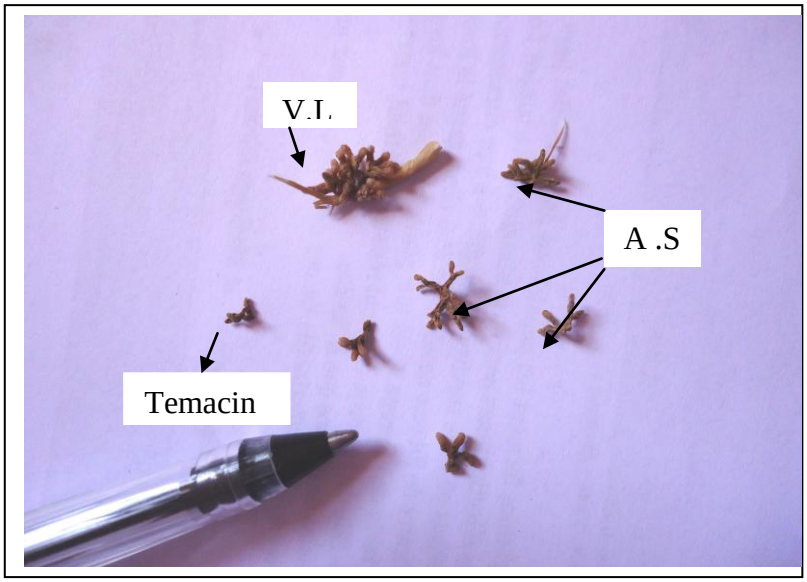


Photo 06 : les différentes formes des nodules plurilobés rencontrées par variété.

La forme des nodules selon le nombre des lobes elle diffère d'une variété à l'autre,le pourcentage des différentes formes des nodules obtenus dans un lot de 50 nodules pris au hasard pour chacune des variétés et dans le meme stade est présenté dans la Figure 08 :

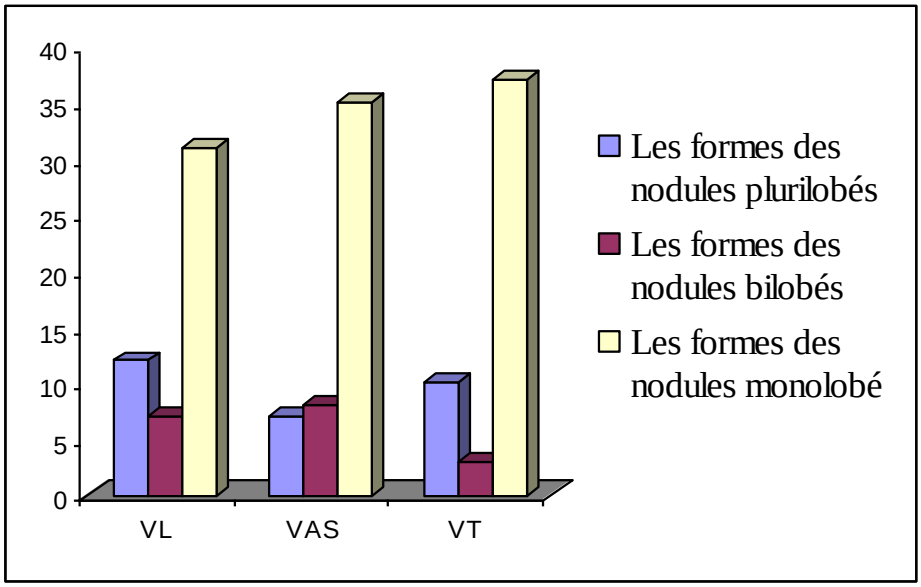


Figure 08 : le nembre des différentes formes des nodules obtenus dans 50 nodules pour chaque variété dans le méme coupe.

La VL présente un nombre de nodules plurilobés imporatnt que les autres variétés **(photo 07)**, après vienne la VT dans cette forme, la forme bilobée est importante dans la VAS.

Photo 07 : un nodule plurilobé de la variété local.

Le pourcentage de couleur rose des nodules et toujours des nodules obtenus dans un lot de 50 nodules pris au hasard pour chacune des variétés et dans le meme stade est présente dans la Figure suivants :

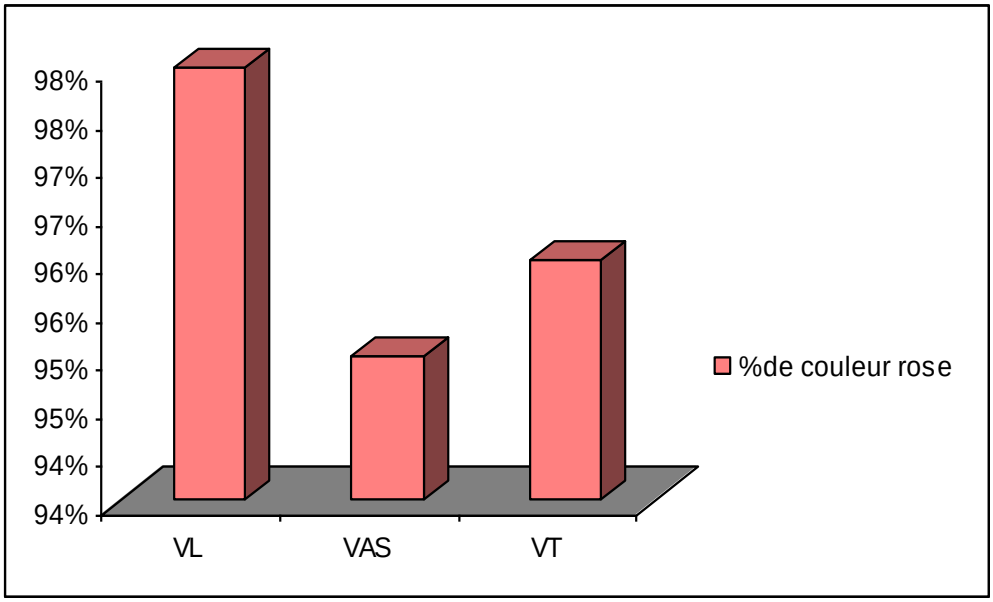


Figure 09 : pourcentage du couleur rose des nodules obtenus dans 50 nodules pour chaque variétés dans le meme stades.

1-2-1-4)-La taille :

La taille des nodules varie généralement de 01 à 06 mm . Il est à observer qu' exceptionnellement une longueur voisine de 01cm a été enregistrée pour 03 nodules au niveau de la VL. La figure 10 présente le pourcentage des différentes tailles de nodules obtenus dans un lot de 50 nodules pris au hasard pour chacune des variétés et dans le meme stade.

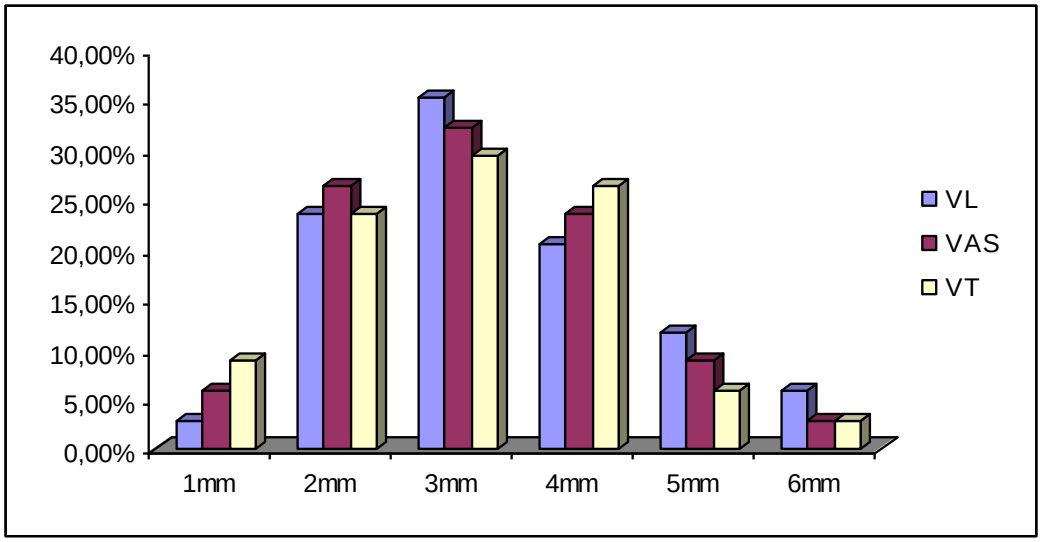


Figure 10) : Pourcentage des différentes tailles obtenues dans 50 nodules pour chaque variété dans la même coupe.

D'après les résultats obtenus on remarque que les tailles les plus dominantes sont de 2 à 4mm, après vienne la taille de 5 et 1mm.

1-2-2)- Le poids sec de la partie aérienne :

L'évolution de la matière sèche est en augmentation au cours des trois coupes pour les trois variétés, le poids le plus important est de la variété Temacine et Arabie saoudite et après vienne la variété locale d'El-Goléa **(Figure11).** La variété Temacine présente le poids le plus important 2260g/m² dans la première fauche et dans la troisième fauche avec une moyenne de 4200 g/m². La variété AS dans le troisième stade présente 3220 g/m² et pour la VL dans ce stade présent 2800 g/m².

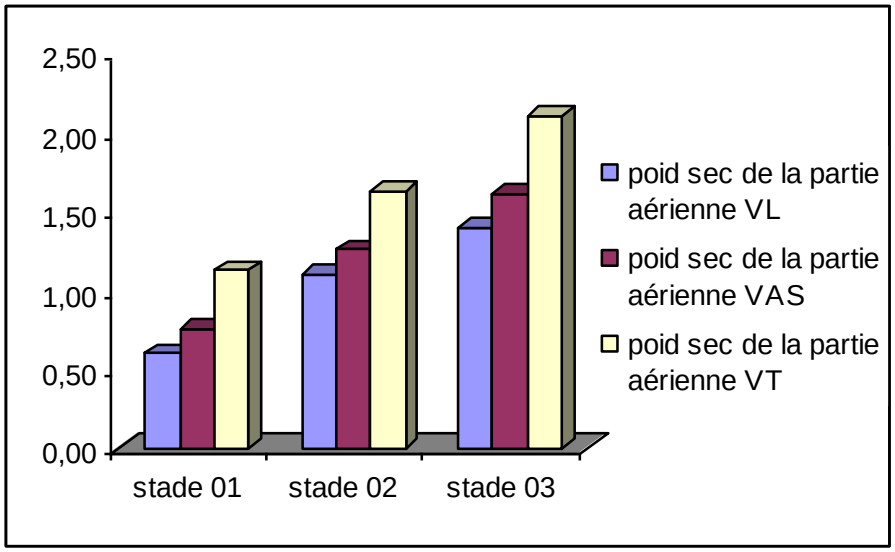


Figure 11: Evolution du poids sec de la partie aérienne des variétés selon les stades par (g/plante).

1-2-3)- Le poids sec des racines :

Pour le poids sec des racines dans la 2éme coupe la VT présente 1620g/m², la VAS 1400g/m² et la VL donne 929g/m² . Le poids des racines dans les différents stades elle est présente dans la Figure suivante :

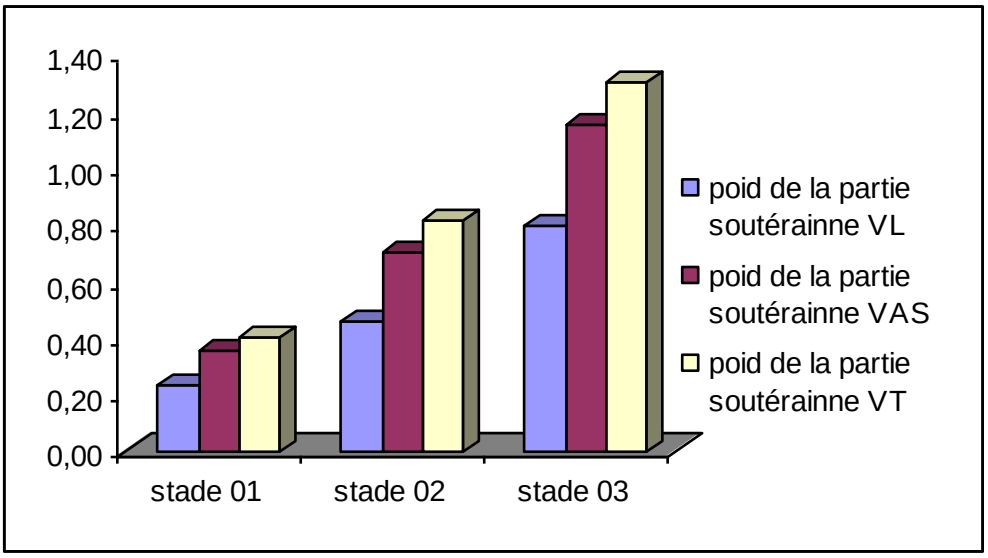


Figure12: l'evolution du poids sec des racines des variétés selon les stades par (g/plante).

1-2-4)-La teneur en azote :

1-2-4-1)-La teneur en azote dans la partie aérienne :

Le dosage en azote total dans la matière sèche pour les trois variétés, démontre que la teneur en azote varie selon les stades **(Figure 13).** Cependant, la variété ''El-Goléa présente des teneurs en azote plus élevés que les autres variétés dans tous les stades. Avec un écart plus important au premier stade.

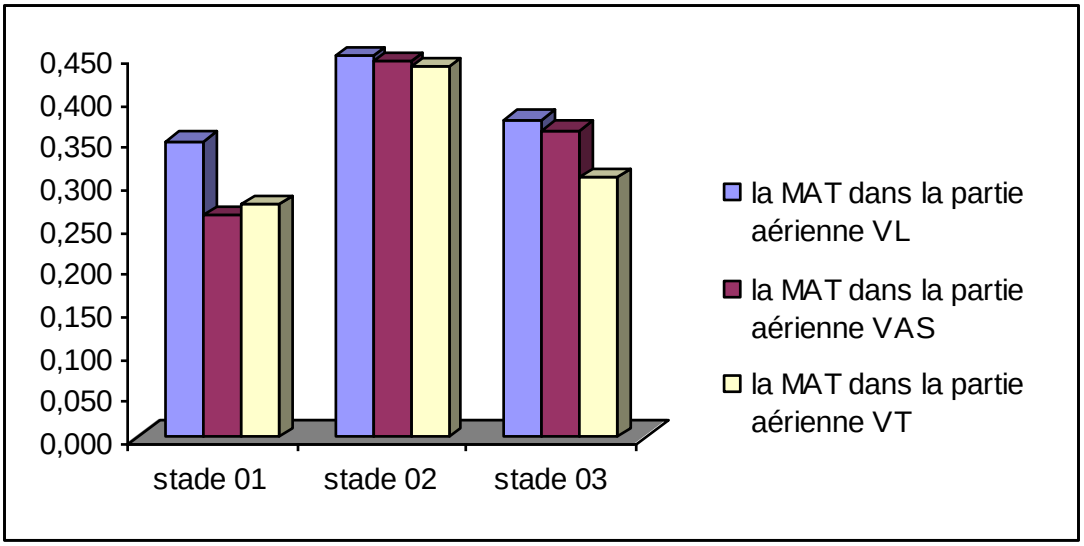


Figure13 : Evolution de MAT dans la partie aérienne des variétés selon les stades (%).

1-2-4-2)- La teneur en azote dans la partie souterraine :

La teneur en azote dans les racines varie selon les variétés, la VL présent la teneur la plus important par rapport a la VAS et la VT dans les trois stades. La Figure 14 présente les résultats obtenus :

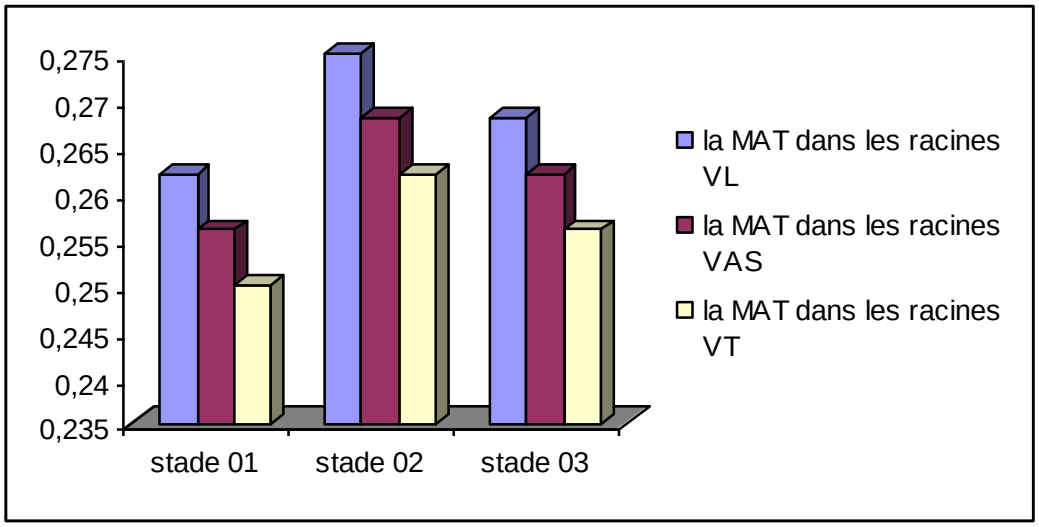


Figure 14 : la MAT dans les racines des trois variétés selon les stades (%).

1-2-4-3)- La quantification de l'azote dans la plante :

La quantité d'azote dans la plante c'est la quantité d'azote dans les deux parties aérienne et souterraine et qui est estimée par kg/ha, la Figure 15 présente les résultats obtenus :

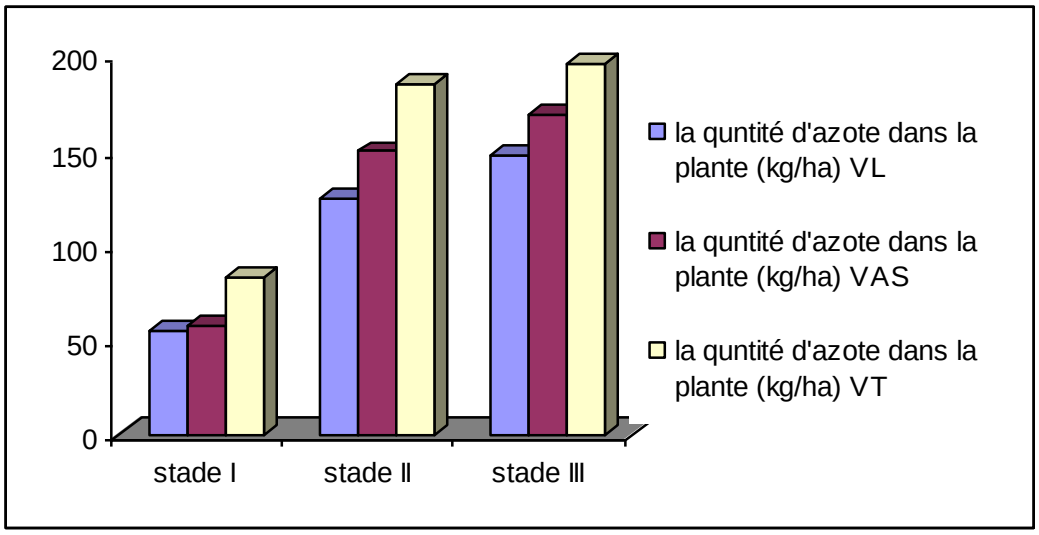


Figure 15 : la quantité d'azote dans la plante des trois variétés dans les différents stades (kg /ha).

D'après les résultats obtenus on remarque que la quantité d'azote dans la VT elle est importante par rapport a la VAS et la VL dans les différents stades, dans la 3éme la VT donne 195,08 kg/ha et la VAS donne 167,82, la VL, 147,34 kg/ha et dans le même stade.

1-2-4-4)- La teneur en azote dans le sol :

Les résultats obtenus après dosage du sol des parcelles d'expérimentation avant et après la mise en culture des 3 variétés de luzerne sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 07 : Evolution de la teneur en azote dans le sol emblavé au niveau des trois variétés de luzerne dans la région d'EL Goléa (%).

TN avant la mise de culture	TN dans le 1er stade			TN dans la 2éme stade			TN dans la 3éme stade		
	VL	VAS	VT	VL	VAS	VT	VL	VAS	VT
0,0035	0,0054	0,0045	0,0042	0,0063	0,0054	0,0053	0,0087	0,0080	0,0078

L'analyse de ce tableau met en évidence l'augmentation de la teneur en azote dans le sol emblavé par les 03 variétés de luzerne durant les trois coupes. Les résultats obtenus montrent bien que cette augmentation est plus importante dans les parcelles de la VL que celle sous les parcelles de la VAS et la VT.

1-2-4-5)-La quantification d'azote restituée au sol :

La quantité d'azote dans le sol estimée par hectare est en augmentation au cours des trois coupes. la VL présente les meilleures résultats dans tous les stades (106, 124 et 172 kg /ha), les résultats de la VAS et la VT dans les même stades sont , respectivement de, 89, 106, 158 et 83, 104, 154 (Kg/Ha), les résultats sont présenté dans la figure 16 ci-dessous.

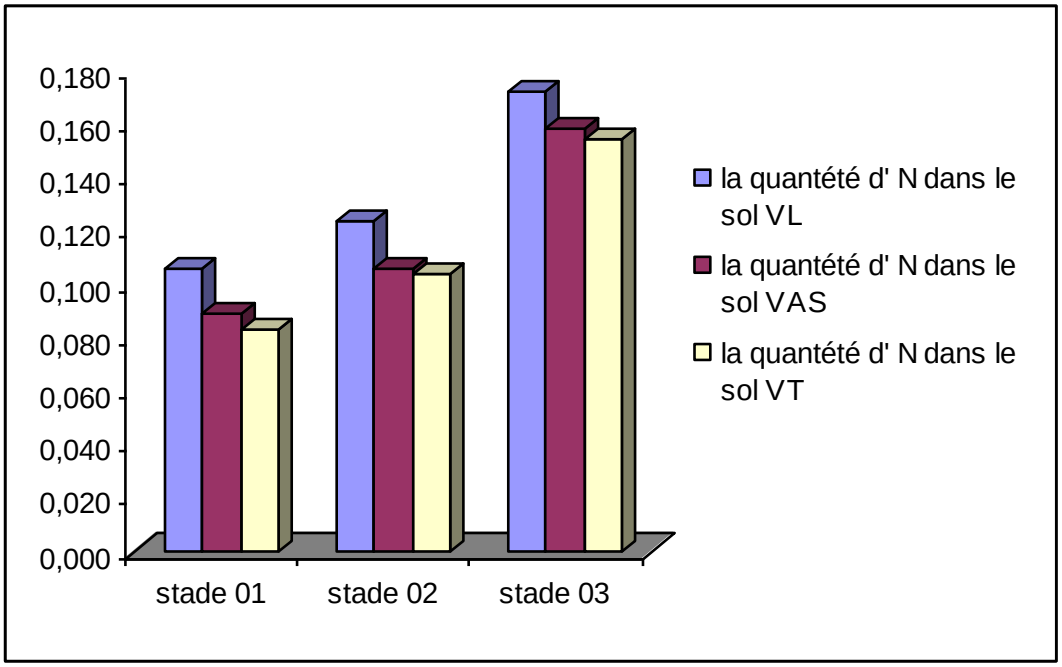


Figure16: L'évolution de la quantité d'azote dans le sol des trois variétés selon les stades par (t/ha).

La quantité d'azote restitué dans le sol est calculée à partir de la différence de la quantité d'azote aux différents stades pour chaque variété d'une part et la quantité d'azote existante avant la mise en culture, le tableau ci dessous présente les quantités d'azote restitué des trois variétés dans les 03 stades :

Tableaux 08 : les quantités d'azote restitué au sol.

	la quantité d'azote restitué dans le sol (kg/ha)		
	stade I	stade II	stade III
VL	36,1	54,7	102,7
VAS	19,7	36,7	88,7
VT	13,7	34,7	84,7

D'après les résultats obtenus on remarque que la quantité d'azote restitué dans les blocs de la VL est, toujours la plus importante par rapport à les autres blocs de la VAS et la VT.

1-2-4-6)- Estimation totale de l'azote fixé biologiquement :

La quantité totale de l'azote fixé biologiquement calculée représente la somme de l'ensemble des quantités d'azote dans le végétal (partie aérienne+ partie souterraine) et la quantité restitué dans le sol. Les quantités total fixé biologiquement par les trois variétés dans les différentes stades est résumes dans le Tableaux 09 :

Tableaux 09 : la quantité totale d'azote fixé biologiquement par les différentes variétés.

	la quantité total d'azote fixé biologiquement (kg/ha)		
	stade I	**stade II**	**stade III**
VL	**90,15**	**179,00**	**250,04**
VAS	**76,84**	**185,58**	**265,52**
VT	**95,85**	**219,60**	**279,78**

Les résultats montrent que la quantité totale d'azote fixé va augmenter par les stades dans touts les variétés et en remarque que dans le dernier stade la quantité d'azote fixé par la VT est de 279,78 et par la VAS, 265,52 dans le même stade et pour la VL est de 250,04 kg/ha. Dans un période de 192 jour la quantité total d'azote fixé biologiquement par la VT est de 484,39 kg/ha, et 416,98 par la VAS et la quantité d'azote fixé biologiquement par la VL est de 391,44 kg/ha

2)- Discussions et interprétation des résultats :

2-1)- Les propriétés physicochimiques du sol :

Les paramètres de milieu de la région d'El Goléa présente des propriétés favorables pour la vie microbienne et la fixation symbiotique, le pH (7,8) est plus ou moins alcalin et la salinité faible (0,35ds/cm) de ce sol ne posent pas des problèmes et présente pas des propriétés nuisibles au processus de symbiose Rhizobium légumineuse.

2-2)-La nodulation et les nodosités :

L'observation des 1ers nodules sur les racines a été enregistrée au niveau des 03 variétés après 14 jours de la date de semis. Cette durée avoisine celle obtenue par **BEN BSSISSE Y**, **2010,** dans la région d'El Goléa qui observe les nodules après 16 jours.

Comme il est cité dans la partie bibliographique, le nombre, la couleur ainsi que la forme des nodules sont autant des facteurs qui permettent l'évaluation de l'activité fixatrice d'azote **(DOMMERGUE, 1999).** Le nombre des nodosités chez la variété d'El-Goléa et la proportion comparativement élevée (12%) des nodules plurilobés et le pourcentage de la couleur rose (98%) sont plus importants que les nodules chez la variété d'Arabie saoudite et la variété Temacine. Donc l'efficience est plus importante chez la variété locale traduisant l'adaptation des 02 partenaires avec les conditions du milieu.

L'analyse statistique faite pour le nombre des nodules dans les trois stades présente dans les premiers stades et le 3^{éme} stade un coefficient de variation CV < 12% qui sont successivement 6,40 et 4,54 (Tableau 01, Tableau 02 et Tableau 03 Annexe 1), et dans le deuxième stade est de 13 ; en interprètent cette résultats par les erreurs au moment de prélèvement des racines (fragilité des racines secondaires).

2-3)- La matière sèche dans la plante :

La culture de la luzerne présente une production en matière sèche croissant durant le cycle de croissance, d'après **MAURIES, (2004)**, le rendement en matière sèche est variable selon l'âge de la culture.

Les analyses statistiques des trois variétés dans les trois stades présentes un CV< a 12%(voir annexe). Les résultats obtenus pour la matière sèche montre que la quantité de la MS produite par la VT est la plus importante et après vienne la VAS et la VL. Ces résultats sont lies au caractère génétique de la variété elle-même.

La production des trois variétés en MS elle est importante et montre qu'on a une bonne alimentation surtout en azote qui est un élément indispensable du développement des plantes et est ramené aux plantes grâce à la fixation symbiotique.

2-4)- La matière azoté total dans le végétal :

La teneur en azote dans le végétal est en diminution au cours du cycle de croissance à cause de l'augmentation de la quantité de la matière sèche, d'après **MAURIES, (2004),**

La matière azoté totale dans la VL est importante par rapport aux autres variétés, ce qui montre que la VL est la plus efficiente dans le processus de la fixation symbiotique à cause de leur adaptation au conditions du milieu et avec la souche BNL locale de la région d'El Goléa ce qui présenté par leur résultats (nombre, taille, forme, et couleur des nodules).

2-5)- La quantité d'azote dans la plante :

On remarque que malgré la teneur d'azote dans la VL est important par rapport qui celle trouvé dans la VAS et la VT, mais la quantité d'azote dans la VT et la VAS est important par rapport à VL, par ce que la quantité d'azote dans la plante à une relation avec leur matière sèche et la matière sèche est plus important dans la VT et la VAS.

2-6)- Quantité d'azote restituée dans le sol :

La culture de la luzerne entraîne un enrichissent du sol en azote ou la quantité d'azote est en augmentation au cours des trois stades, malgré toutes les voies de perte il y a une augmentation de la quantité d'azote restituée dans le sol. Dans un intervalle de 192 jours, la quantité d'azote restitué est de 102,7 kg/ha par la VL et 88,7 kg/ha par la VAS, et la VT restitué dans le sol une quantité de 84 kg/ha. Et n'oublie pas que ce résultat va augmenter par la restitution de la culture par leurs racines qui reste dans le sol après l'arrachage de culture.

Ces résultats les plus importantes présente l'importance de la culture dans la fertilisation des sols agricoles et dans la rotation (culture de tête) et l'amélioration des propriétés physico-chimiques par leur restitution dans le sol et par leur système racinaire la plus important qui augmente l'aération et amélioré leur structure.

3)-Identification de la bactérie :

3-1)- Taille et couleur des colonies :

Après incubation sur le milieu de YEMA à 28°c et purification répétée, des colonies de couleur blanche vers crème d'une forme circulaire et mucoïde **(Photo 08)** ont été observées**..**

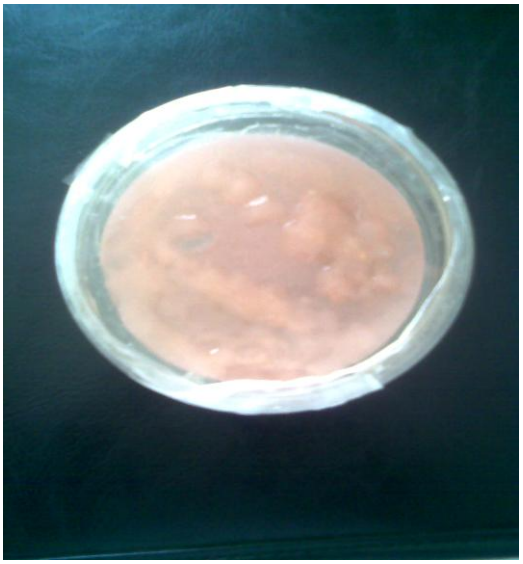
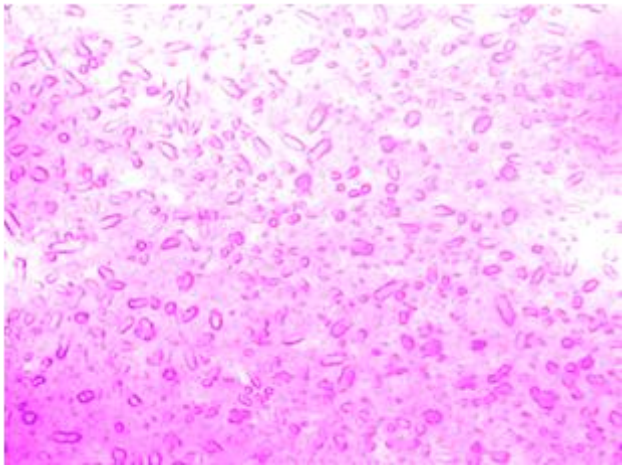


Photo 08 : Colonies de Rhizobium après l'incubation à 28°C.

Cela confirme les données bibliographiques **(Prescott et al, 2003; DUHOUX et Nicol, 2004 in AMRI- T, 2008)** qui stipulent que *Le Rhizobium* forme des colonies incolores, banches ou couleur crème, sur milieu de culture contenant du mannitol et de l'extrait de levure. **Selon VINCENT (1970),** la couleur blanche due a le non absorption la couleur du rouge qui est un colorant qui n'est pratiquement pas absorbé par *les Rhizobiums*, contrairement à la plupart des bactéries. La taille des colonies, après 48h les colonies présentent un diamètre varie entre 4mm à 5mm, donc la qui confirme elle aussi que nous sommes en présence de la genre Rhizobium à croissance rapide.

3-2) - Coloration de Gram:

Sous microscope à un grossissement de (Gx100), les bactéries sont sous forme des cocobacilles colorées en rose **(Photo9)**, alors les bactéries isolées sont des Gram négative, c'est un résultat qui confirme toutes les données bibliographiques. Citons parmi les quelles **DOMMERGUE et al (1998)** disant que la famille des *Rhizobiacées* sont des bactéries en bâtonnets gram-négatif aérobies.



<u>Photo9)</u> : Coloration de Gram (G x100)

3-3)-Le test de nodulation :

Après 13 jours de l'inoculation, on a observé la formation des nodules sur les racines des plantules pour les trois variétés. Ce test important confirme et authentifie la responsabilité de la souche isolée qui fait partie des *Rhizobiacées*. Cependant, d'après les données bibliographiques, il s'agit d'une souche locale de l'espèce *<u>Sinorhizobium</u>* *<u>meliloti</u>* **(DOMMERGUE, 1999).** La caractérisation moléculaire est utilisée actuellement à travers le monde, permettra de spécifier la souche isolée.

3-4)- Confirmation in vitro :

Les résultats n'ont pas pu être obtenus (mort des plantules) après 20 jours à cause des problèmes rencontrés au laboratoire (réglage du phytotron).

CONCLUSION GÉNÉRALE

A la fin de ce travail qui se basé à présenter l'importance de la fixation biologique de l'azote atmosphérique par le biais de la symbiose BNL- luzerne dans la région d'El Goléa et on en conclut ce qui suit :

- Les trois partenaires de la symbiose (rhizosphère, souches et variété locale de la région d'El Goléa) permettent de fixer des quantités importantes d'azote atmosphérique (391,044 kg/ha) dans un période de 192 jours ;
- Durant la même période (192 jours), les 02 variétés de luzerne introduites fixent biologiquement des quantités totales d'azote plus importantes. (416,98 kg/ha pour la VAS, et 484,392 kg/ha pour la VT) en relation avec leur production supérieure en M.S. et non avec les teneurs en azote qui est nettement faibles par rapport à la variété locale.
- Concernant la production de matière sèche de la partie aérienne, la VT et la VAS présente des quantités de la MS plus importante que la VL, et mettent en évidence leur supériorité en terme fourrage et alimentation ;
- L'étude des critères symbiotiques (nombre, forme, taille et couleur de nodule) démontrent que le couple luzerne locale – souche locale présente les meilleures efficiences traduisant la compatibilité entre les partenaires locaux.

- Comparée aux 02 variétés introduites, la supériorité de la restitution de l'azote au sol (102,7 kg/ha) de la VL exprime l'efficience des ressources génétiques adaptées ;

L’ensemble des ces résultat présente la place la plus importante de cette association et l’importance de la luzerne surtout au terme de fertilité du sol, particulièrement la restitution par la variété locale qui est la meilleure l’un des trois dans l’assolement rotation que celle dans la production de matière sèche, ces quantités d’azote restent dans le sol peut être exploité pour une céréale d’été, qui en besoin d’environ de 120 N kg/ ha**. (BABI F, 2004)**

Au terme de ce travail, il en ressort que la fixation symbiotique d’azote représente une alternative importante à la fertilisation azotée minérale surtout dans une région saharienne. De ce fait, il semble très intéressant d’exploiter ce processus et le généraliser pour améliorer la fertilité des sols. Ayant une importance économique et écologique considérable, la généralisation de cette alternative semble très bénéfique pour le développement de l’agriculture et pour cela il faut donc multiplier les études dans ce sujet intéressant.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- **ANONYME, 1987** : Larousse Agricole, 154-159p.
- **AUBERT G, 1978** : Méthodes d'analyses des sols, ed, Centre National de documentation pédagogique Marseille, p 185.
- **AZIZI S, OULED AMRANE S, 2005** : caractérisation phénotypique des souches de rhizobium associées à quelques légumineuses de la région d'El Goléa, mémoire de D E U A, 40p.
- **BAAMEURE M, 1998** : Comportement de quelques variétés introduites et population Sahariennes de luzerne dans la région de Ouargla, Mémoire d'Ingénieur, ANFS/AS, Ouargla, p 77.
- **BABI F, 2004** : Contribution à l'étude de la fertilisation azotée potassique sur blé dur sous pivot à Hassi Ben Abdallah (Ouargla), Mémoire d'Ingénieur, ANFS/AS, Ouargla, p 125.
- **BEN ABDELKADER F, 1991** : Contribution à l'étude de l'influence de fertilisation phosphatée sur la processus de la fixation biologique de l'azote moléculaire par quatre variétés locales de luzerne, Mémoire d'Ingénieur, INFS/AS,Ouargla, p 111.
- **BOUABOUB K, 1991 :** L'influence des nitrates sur la fixation symbiotique de l'azote chez le pois chiche, Mémoire d'ingénieur, INA Alger, p 55.
- **BOUDEBBOUS I, 2009 :** Comportement et caractérisation de quelques populations sahariennes variétés introduites de luzerne pérenne, Mémoire d'Ingénieur, INFS/AS, Ouargla, P 36.

- **BOULGHITI M et ZENNOU M, 2007 :** Contribution à l'inventaire faunistique et floristique de Sebkhet El Maleh (El Goléa), Mémoire d'Ingénieur, ANFS/AS, Ouargla, p 66.
- **CHAABNA A, 2001** : Situation des cultures fourragères dans le sud du Sahara septentrional algérienne et caractérisation de quelque variété introduite et population sahariennes du luzerne cultivée, thèse Magistère, ANFS/AS, Ouargla, p 124.
- **CHAIBA M, 1998** : L'importance et rôle de brise vent sur le comportement de quelques variétés introduites et populations Sahariennes de luzerne dans les palmeraies de Hassi Ben Abdellah région de Ouargla, Mémoire d'Ingénieur, ANFS/AS, Ouargla p 61.
- **CHAICHE C, 2006** : Contribution à l'étude de l'évolution des effectifs de peuplement avien à sebhet El maleh (El Goléa), Mémoire Ingénieur, ANFS/AS, Ouargla, p 69.
- **CHAOUKI I, 2010** : Comportement et caractérisation de quelques populations sahariennes et variétés introduites de luzerne pérenne dans la région d'Ouargla (cas de Hassi Ben Abdallah),Mémoire d'Ingénieur, ANFS/AS, Ouargla, P 25
- **CHELOUFI H, 1991** : Etude du devenir de fertilisants azotés minéraux dans quatre types de sols cultivés lorrains : conséquences agronomiques et écologiques, Thèse Doctorat INPL, ENSAIA, NANCY (France) ,143p.
- **CHOUAR W, 2006** : Effet du cumul de pluie hivernale sur la réponse du cultivar WAHA à la fertilisation azotée. Mémoire de Magister, Batna, P 66.
- **DOMMERGUES Y, DUHOUX E, DIEM H, 1999** : Les arbres fixateurs de l'azote, ed, CRAD, édition espace34, FAO, IRD, P 499.
- **FRANCOIS J et GAUDRY M, 1997** : Assimilation de l'azote chez les plantes (aspect physiologique, biochimique et moléculaire), ed, INRA, P 422.

- **LABASSI M, 1991** : L'effet de la fertilisation phosphate sur la capacité de fixation de l'azote et sur le rendement d'une variété de pois chiche, Mémoire d'Ingénieur INA Alger, p 59.
- **MAACHI L, 2005** : Etude du comportement d'une céréale à grains sous centre pivot dans la région de Ouargla : évaluation de l'efficience de l'irrigation et de fertilisation azotée. Mémoire d'Ingénieur, ANFS/AS, Ouargla, 90P.
- **MAURIES M, 1992 :** La luzerne culture récolte conservation et utilisation, ed, France Agricole Paris, p 565.
- **OUASTANI M, 2006** : Contribution à l'étude de l'influence des amendement organique (fumier de volaille et fumier de bovin) sur l'amélioration des sols sableux non salés dans la région sahariennes (cas de Ouargla), thèse Magistère, ANFS/AS, Ouargla, p 187.
- **RIGAUD Jean et GADAL Pierre, 1985** : Nutrition azotée des légumineuses, Ed, INRA Paris, P 556.
- **SEBILLOTTE M, 1999 :** Fertilité et systèmes de production, Ed, INRA (France), p 463.
- **SINGLETON P, 2004** : Bactériologie (pour la médecine, la biologie et les biotechnologies) ,6éme édition, ed, DUNOD, P 525.
- **SOLTNER D, 2001** : Les bases de la production végétale, Tome3, la plante et son amélioration, 3éme Ed, P 304.
- **SOLTNER D, 2003** : Les bases de la production végétale, le sol et son amélioration, TOME I, 23éme Ed, p 464.
- **SOLTNER D, 2005** : Les bases de la production végétale, Tome 1, le sol et son amélioration 24 Ed, P 472.

- **SOLTNER D, 2007** : Les base de la production végétale, biologie végétale et amélioration des plantes, TOME III, 5éme Ed, p 373.
- **TOUTAIN G, 1992** : De la recherche au développement, ed, Institut National de la recherche Agronomique,p 300.
- **VINCENT. M, 1970:** A manual for the particle study of the root nodule bacteria. IBP handbook n° 15, Blackwell sci, public Oxford, p 164.
- **WILSON, 1982** : La luzerne culture et utilisation, ed, l'institut technique des céréales et fourrages Paris, 24P.

REFERENCES ELECTRONIQUES:

- http://fr- wikipededia.org/wiki/fixation-biologique-l'azote.
- www. FAO. org.
- Encarta, 2003.
- Encarta, 2005.

ANNEXE 1 :

Tableaux 01 : Les différentes dates des coupes et des opérations.

date de semis	**15/09/2010**
date de levée	**17/09/2010**
l'apparition des nodosités	**29/09/2010**
début bourgeonnement	**14/11/2010**
début floraison	**24/12/2010**
première coupe	**28/12/2010**
deuxième coupe	**17/02/2011**
troisième coupe	**26/03/2011**
la mise en culture dans les tubes	**08/05/2011**
l'inoculation des tubes	**15/05/2011**
la mise en culture en pots	**10/05/2011**

Tableau 02 : Résultats des analyses statistiques de la 1er stade :

	Nombre nodules	**poids sèche partie aérienne**
SCT	**9, 39**	**0,67**
SCb	**6,05**	**0,20**
SCt	**2, 39**	**0,40**
Sce	**0,95**	
DLt	**8**	
DLb	**2**	
DLt	**2**	
Dle	**4**	
Vb	**3,025**	**0,10**
Vt	**1,195**	**0,225**
Ve	**0,237**	**0,005**
CV%	**6,40**	**8,52**
Sig	**S**	**S**
T F	**5 ,04**	**45**
Sig	**NS**	**S**
PPDS		
t 5%		**0,138**
t 1%		**0 ,23**

Tableau 03 : Résultats des analyses statistiques 2éme stade :

	Nombre nodules	poids sèche partie aérienne
SCT	20,97	2 ,69
SCb	0,37	0,6
SCt	14,11	1,99
SCe	6,49	0,1
DLt	8	
DLb	2	
DLt	2	
Dle	4	
Vb	0,18	0,30
Vt	7,05	0,99
Ve	1,62	0,025
CV%	13	9,5
Sig	NS	S
T F		39,6
Sig		S
PPDS		
t 5%		0,35
t1%		0,59

Tableau 04 : Résultats des analyses statistiques de la 3éme stade :

	Nombre nodules	poids sèche partie aérienne
SCT	**25,73**	**6,03**
SCb	**0,39**	**1,8**
SCt	**17,06**	**3,93**
SCe	**8,28**	**0,30**
DLt	**8**	
DLb	**2**	
DLb	**2**	
Dle	**4**	
Vb	**0,195**	**0,9**
Vt	**8,865**	**1,96**
Ve	**2,07**	**0,075**
CV%	**4,54**	**10,9**
Sig	**S**	**S**
T F	**4,12**	**26,2**
Sig	**NS**	**S**
PPDS		
t 5%		**0,62**
t 1%		**1,02**

SCT : somme carré des écarts Total
SCb : somme carré des écarts bloc
SCt : somme carré des écarts traitements
SCe : somme carré des écarts erreur
DLt : degré de liberté total
DLb : degré de liberté bloc
DLt : degré de liberté traitement
DLe : degré de liberté erreur
PPDS : plus petite différence significatif

Vb : variance bloc
Vt: variance traitement
Ve : variance erreur
CV : coefficient de variation
Sig : signification
NS : non significative
S : significative
T F: test Fisher,

ANNEXE 02 :

Tableau 05 : Longueur des tiges (cm) par plante au premier stade

	B I			B II			B III		
	VL	VAS	VT	VL	VAS	VT	VL	VAS	VT
1	44	55	35	52	57	40	35	49	45
2	26	54	48	39	44	39	40	39	45
3	46	47	54	33	59	47	40	32	41
4	46	44	45	48	50	30	29	45	49
5	42	58	54	47	46	68	41	43	31
6	46	58	55	54	44	57	34	43	38
7	42	55	56	47	29	49	39	38	43
8	46	44	56	46	46	42	33	30	22
9	43	47	39	39	42	43	29	39	29
10	42	39	45	33	43	42	30	48	49

Tableau 06 : Longueur des tiges (cm) par plante stade au deuxième stade

	B I			B II			B III		
	VL	VAS	VT	VL	VAS	VT	VL	VAS	VT
1	46	59	62	50	90	70	45	80	61
2	55	65	65	60	80	60	55	79	62
3	47	58	75	63	70	65	47	70	59
4	46	55	84	57	71	65	55	66	70
5	40	50	77	50	65	60	44	65	65
6	55	45	88	51	62	60	43	82	55
7	50	44	80	48	64	70	56	70	56
8	44	52	87	49	66	63	54	67	58
9	40	49	60	52	62	72	46	68	60
10	45	55	59	50	68	59	45	69	67

Tableaux 07 : Longueur des tiges (cm) par plante stade au troisième stade

	B I			B II			B III		
	VL	VAS	VT	VL	VAS	VT	VL	VAS	VT
1	50	60	63	60	75	65	60	62	63
2	69	45	62	68	72	63	59	70	64
3	52	50	59	65	68	60	55	69	65
4	55	52	60	62	82	58	61	56	66
5	62	49	65	61	70	70	57	66	61
6	60	48	60	55	73	72	62	63	76
7	54	55	61	53	69	65	55	59	65
8	53	60	58	52	65	63	60	76	61
9	60	62	63	54	72	57	54	79	72
10	59	54	59	59	69	72	59	65	69

ANNEXE 03 :

Coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classifier. Son avantage est de les classer les bactéries en deux grands groupes: bactéries dites Gram+et bactéries dite Gram**.** Cette coloration fait à partir des cultures sur YEMA on prépare des lame bien étalée en couche mince, séchée ce et fixée. Puis coloré selon les étapes suivantes :

- Couvrir la lame de violet de Gentiane pendant une minute ;
- Chasser le violet avec du Lugol et en suite couvrir la lame avec le Lugol pendant30 secocdes ;
- Décolorer au mélange alcool-acétone (v/v) jusqu'à la décoloration totale du frottis.
- Laver à l'eau de robinet courante ;
- Couvrir la lame d'une solution de Fushine pendant 1minute ;
- Laver à l'eau, séché la lame et observer a immersion.

ANNEXE 04 :

Matériels utilisés

- **Appareillage**
  - Autoclave
  - Bain marie
  - Balance électrique
  - Etuve
  - Four pasteur
  - Microscope optique
  - Observateur de colonies
  - Plaque chauffante
  - Réfrigérateur
  - pH-mètre
  -
- **Verreries**
  - Becher
  - Boite de Pétrie
  - Entonnoirs
  - Erlen-Meyer
  - Fiole
  - Flacons
  - Lame et lamelles ;
  - Pipettes pasteur ;
  - Tubes à essais munis de bouchant en métal
  - Verre de montre
  - Tube à essai 50ml
- **Autres matériels**
  - Anses de platine
  - Papier Kraft
  - Papier aluminium
  - Papier filtre;
  - Pince en platine
  - Pissettes

  - Papier Kraft
  - Pendhoff

- Spatules