



HAL
open science

Étude du comportement hivernal d'associations luzernes annuelles-Rhizobium en régions méditerranéennes : élaboration de la matière sèche et fixation d'azote

Kholoud Sultan-Tubeileh

► To cite this version:

Kholoud Sultan-Tubeileh. Étude du comportement hivernal d'associations luzernes annuelles-Rhizobium en régions méditerranéennes : élaboration de la matière sèche et fixation d'azote. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2001. Français. NNT : 2001INPL030N . tel-01750360

HAL Id: tel-01750360

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750360>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE



ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE
ET DES INDUSTRIES ALIMENTAIRES



LABORATOIRE AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT

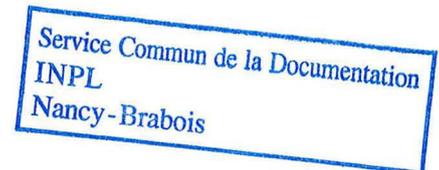
(M) 2001 SULTAN-TUBEILEH, K.

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L' INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Discipline: Sciences Agronomiques



Présentée par

Kholoud SULTAN-TUBEILEH

**ETUDE DU COMPORTEMENT HIVERNAL D'ASSOCIATIONS LUZERNES
ANNUELLES-RHIZOBIUM EN REGIONS MEDITERRANEENNES.
ELABORATION DE LA MATIERE SECHE ET FIXATION D'AZOTE**

Soutenue publiquement le 16 mai 2001
devant la commission d'examen composée de

M. A. GUCKERT	Professeur, ENSAIA-INPL	Président
M. M. OBATON	Directeur de Recherches, INRA Montpellier	Rapporteur
M. J-F. SOUSSANA	Directeur de Recherches, INRA Clermont-Ferrand	Rapporteur
M. C. ROBIN	Chargé de Recherches, INRA-ENSAIA	Examineur
Mme. H. TOUCHANE	Professeur, Université d'Alep	Examineur

à un très cher ami

...à Ashraf

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, il est temps d'exprimer ma reconnaissance profonde à Monsieur le Professeur Armand Guckert pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour ses conseils judicieux, ses remarques constructives et pour avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie vivement Monsieur Gustave Gintzburger d'avoir dirigé le travail mené au champ et d'avoir réuni tous les éléments pour faciliter ma tâche à l'ICARDA.

Je voudrais exprimer ma gratitude à Monsieur Michel Obaton pour les discussions que nous avons eues, ses conseils pertinents et d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes sincères remerciements vont à Monsieur Jean-François Soussana d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

J'adresse ma reconnaissance profonde à Monsieur Christophe Robin pour ses conseils judicieux et sa gentillesse et d'avoir accepté à juger ce travail en tant qu'examineur.

Je remercie également Madame Hayat Touchane pour le temps qu'elle m'a accordé et pour le jugement du travail en tant qu'examineur.

Je remercie également le Gouvernement français représenté par l'ambassade de France à Damas de m'avoir accordé l'opportunité de poursuivre mes études en France.

Je tiens à remercier Mesdames Monika Zaklouta, Raya'an Khatib, Khawla Taha et Messieurs Samir El-Seba'i, Murraray Singh, Fadel Afandi, Elias Khoudari pour leur collaboration lors de ma présence à l'ICARDA.

Mes remerciements vont également à Amina, Dominique, Michel et Patrice pour leur aide pendant les expérimentations et les analyses. Je remercie aussi Madame Susset et Madame Claude pour leur soutien moral et leur disponibilité. Je n'oublie pas de remercier Claude Bréchet à l'INRA de Nancy pour l'analyse d'échantillons de ¹⁵N.

Un grand merci à mes amis Sawsan, Reneh, Roula, Thoraya, Valentina, Mahwash, Inaya, Hanan, Faiza, Osama, Nabil, Atef, Abou-Fadi ainsi que Christine, Céline, Iman, Nora, Joëlle et Leila.

Enfin, j'exprime ma reconnaissance à tous les membres de ma famille pour leur soutien permanent.

Table des matières

<i>Introduction</i>	11
<i>Chapitre I. Synthèse Bibliographique</i>	15
1. Système de production agricole en zones méditerranéennes	16
2. Conditions climatiques des zones méditerranéennes	17
3. Augmentation de la production agricole par l'introduction des légumineuses annuelles	18
3.1. Système de rotation Céréale-Légumineuse pâturée "Ley Farming System"	18
3.2. Application de l'expérience australienne "Ley Farming System" en régions méditerranéennes	18
3.3. Introduction des luzernes annuelles en assolement avec les graminées	20
3.3.1. Les luzernes annuelles : Abondance et écologie	20
3.3.2. Intérêt agro-économique	22
3.3.2.1. Production de fourrages	22
3.3.2.2. Enrichissement du sol en azote	23
3.3.2.3. Mise en valeur de la jachère	24
4. Contraintes face à l'expansion des surfaces cultivées en luzernes annuelles dans le bassin méditerranéen	24
4.1. Faible adaptation des variétés introduites	24
4.2. Faible nodulation des variétés locales	25
4.3. Effet des basses températures sur la croissance des plantes, la formation des nodosités et la fixation d'azote	26

5. Amélioration de la croissance de la luzerne annuelle en zones méditerranéennes	29
5.1. Sélection des cultivars de luzernes annuelles adaptés aux basses températures	29
5.2. Sélection des souches de <i>Sinorhizobium</i> spécifiques et adaptées au climat local	30
6. Conclusions et objectifs de recherche	31
 <i>Chapitre II. Matériel et Méthodes</i>	33
1. Etude au champ	34
1.1. Mise en place et suivi des expérimentations	34
1.1.1. Matériel végétal et microbien	34
1.1.2. Dispositifs expérimentaux au champ	36
1.1.3. Conduite des parcelles expérimentales	37
1.1.4. Mise en culture et application des traitements	37
1.2. Croissance et développement des luzernes	39
1.3. Relevés météorologiques	39
2. Etude en conditions contrôlées	40
2.1. Mise en place de l'expérimentation	40
2.1.1. Matériel biologique	40
2.1.2. Prégermination des semences	41
2.1.3. Préparation des inoculum	41
2.1.4. Dispositif de culture	41
2.1.5. Mise en route de l'expérimentation	42

2.1.6. Apports hydriques et minéraux	43
2.1.7. Conditions de culture	43
2.2. Croissance et développement des luzernes	44
3. Etude de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique et méthodes d'estimation de l'azote fixé	44
3.1. Activité réductrice de l'acétylène	44
3.2. Utilisation des isotopes de l'azote	45
3.3. Procédure de détermination de l'azote fixé	48
3.3.1. Activité réductrice de l'acétylène (ARA)	48
3.3.2. Dilution isotopique de ^{15}N	49
4. Traitement statistique	50
 <i>Chapitre III. Etude au champ de la croissance et du développement de luzernes annuelles.....52</i>	
1. Conditions climatiques	54
1.1. Température du sol à 10 cm de profondeur	54
1.2. Pluviométrie	54
2. Morphologie et cycle du développement des luzernes annuelles	55
2.1. Stades de développement	55
2.1.1. Germination	55
2.1.2. Réalisation du stade 5-7 feuilles	56
2.1.3. Floraison	56
2.1.4. Formation de gousses	57
2.2. Surface foliaire	57

2.2.1. Période froide	57
2.2.2. Fin du printemps	58
2.3. Production de matière sèche	58
2.3.1. Période froide	59
2.3.2. Fin du printemps	59
3. Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique	60
3.1. Temps nécessaire pour la formation des nodosités	60
3.2. Nombre et distribution des nodosités	61
3.3. Mesures de la fixation de l'azote atmosphérique	62
3.3.1. Activité nitrogénase	62
3.3.2. Utilisation de la méthode de la dilution isotopique (^{15}N)	63
4. Discussion	65
 <i>Chapitre IV. Etude en conditions contrôlées de la croissance et du</i>	
<i>développement de luzernes annuelles.....</i>	<i>72</i>
1. Premier essai	73
1.1. Apparition foliaire	74
1.2. Production de la matière sèche	75
1.2.1. Premier échantillonnage	75
1.2.2. Deuxième échantillonnage	76
1.3. Fixation d'azote	77
1.3.1. Temps nécessaire pour la formation des nodosités	77
1.3.2. Echelle de notation des nodosités	78
1.3.3. Activité nitrogénase	78

1.3.4. Quantité d'azote total des plantes	79
2. Deuxième essai	80
2.1. Apparition foliaire	80
2.2. Production de la matière sèche	81
2.2.1. Premier échantillonnage (63 jours)	81
2.2.2. Deuxième échantillonnage (96 jours)	82
2.3. Fixation d'azote	83
2.3.1. Formation des nodosités	83
2.3.2. Echelle de notation des nodosités	84
2.3.3. Quantité d'azote fixé	84
2.3.4. Quantité d'azote total des plantes	85
3. Discussion	86
<i>Chapitre V. Discussion Générale.....</i>	90
<i>Chapitre VI. Conclusions Générales et Perspectives.....</i>	94
<i>Références Bibliographiques.....</i>	99
<i>Annexes.....</i>	110
Annexes 1 : Caractéristiques physico-chimiques des sols du Centre International des Recherches Agronomiques dans les Régions Arides et Semi-arides à Tel-Hadya en 1997-1998.....	111

Annexe 2 : Dispositif expérimental de la première expérimentation au champ (saison 1998).....	112
Annexe 3 : Dispositif expérimental de la deuxième expérimentation au champ (saison 1999).....	113
Annexe 4 : Plante de référence : (Orge, cultivar Arabi Aswad)	114
Annexe 5 : Echelle de notation des nodosités (d’après Corbin <i>et al.</i>, 1977).....	115
Annexe 6 : Caractéristiques physico-chimiques de la terre utilisée dans les expérimentations en conditions contrôlées.....	116
Annexe 7 : Détermination de la capacité au champ.....	117
Annexe 8 : Solution nutritive de McKnight (1949) déficiente en azote.....	118
Annexe 9 : Calcul de la quantité d’engrais azoté et de la quantité d’azoté marqué ajoutés aux pots en conditions contrôlées.....	119
Annexe 10 : Calculs de la quantité de N fixée selon la méthode de la dilution isotopique.....	120
<i>Résumé</i>.....	121
<i>Abstract</i>.....	123

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'augmentation constante de la population mondiale, et en particulier dans les pays du Tiers Monde nécessite l'optimisation de l'utilisation des ressources disponibles et l'amélioration des systèmes d'exploitation agricole. En même temps, notre environnement devient de plus en plus fragile. Il semble ainsi plus important que jamais de réaliser un équilibre entre les ressources disponibles et les besoins croissants.

Dans les pays de l'Afrique du nord et de l'ouest d'Asie (WANA: West Asia and North Africa), la mise en jachère reste un système très utilisé. Ce système contribue à la conservation du sol et à la reconstitution de sa fertilité. De plus, il facilite la minéralisation de la matière organique, ce qui permet la libération d'azote nécessaire pour la croissance des plantes. Malgré cette perte des terrains agricoles par la mise en jachère, il est encore possible d'augmenter les surfaces destinées à la culture des plantes fourragères grâce aux terrains marginaux non exploités. Cependant, la solution à ce problème de surfaces cultivables n'est pas si simple. En effet, un autre problème apparaît lorsque l'on parle de l'exploitation des terrains marginaux étant donné que la majeure partie de ces surfaces se trouve loin des côtes dans l'arrière pays où les conditions climatiques ne sont pas toujours favorables. Le climat prédominant dans ces zones est continental avec un été chaud et un hiver froid (de novembre jusqu'en mars) durant lequel des périodes de gel peuvent arriver (Chatterton et Chatterton, 1984 ; Cocks, 1989).

La production en pâtures à partir des bonnes terres cultivables est limitée et ne peut pas, seule, satisfaire les besoins de l'ensemble des pays méditerranéens. Ces terres contribuent de moins en moins au calendrier fourrager des zones méditerranéennes semi-arides et arides en raison de leur extrême état de dégradation (Gintzburger, 1994).

Alors que les graminées des prairies assurent surtout le rendement et la repousse rapide, les légumineuses assurent la qualité du fourrage, notamment en matières azotées, en calcium et en phosphore. De plus, la fixation symbiotique d'azote par l'activité des nodosités associées aux légumineuses représente un intérêt agronomique et environnemental en réduisant l'apport d'engrais chimiques au sol (Peoples *et al.*, 1995).

Nous avons choisi d'étudier les luzernes annuelles étant donné leur importance agro-économique et leur adaptation aux conditions méditerranéennes classiques. Les luzernes annuelles peuvent, en raison de leur aptitude à se resemmer naturellement et à maintenir dans le sol une quantité importante de graines, plus que d'autres espèces cultivées, tamponner les fortes irrégularités pluviométriques et thermiques caractérisant ces régions. Ainsi, la productivité élevée de ces espèces, qu'elles soient seules ou associées à des graminées, fait de ces plantes des bons candidats dans les efforts visant à augmenter la production fourragère. Les capacités élevées des luzernes annuelles à fixer l'azote atmosphérique peuvent en faire de précieux outils de reconstitution de la fertilité des sols épuisés par une pratique continue et assez extensive de la céréaliculture. Elles peuvent aussi contribuer à la production et à l'amélioration des sols marginaux.

L'utilisation raisonnée des luzernes ou trèfles souterrains en remplacement de fourrages semés annuellement sur les jachères, constitue la base du "Ley-Farming System" développé en Australie (Puckridge et French, 1983 ; Crawford *et al.*, 1989). Ce système consiste à employer une rotation Céréale-Légumineuses annuelles pâturées pour réduire les coûts de production et augmenter les rendements.

L'obtention de plantes adaptées aux conditions prédominantes dans une région passe par l'une des deux voies suivantes :

- amélioration génétique : cette voie implique des techniques classiques d'amélioration par croisement des génotypes existants pour obtenir des hybrides ayant rassemblé les caractères positifs des deux parents. L'amélioration génétique peut être également réalisée en modifiant certains gènes contrôlant certains caractères. Cette modification génétique aboutit à l'obtention de nouvelles variétés, voire d'espèces, avec des caractères prédéfinis.
- acclimatation et sélection des variétés : ces méthodes classiques reposent sur la sélection des variétés ayant les meilleures performances dans les conditions locales.

Nous avons essayé de trouver les associations luzerne-*Sinorhizobium* les mieux adaptées aux conditions méditerranéennes. Le temps nécessaire pour l'amélioration des variétés par croisement et les critiques récentes vis-à-vis des organismes génétiquement modifiés nous ont encouragé à essayer d'obtenir des associations *Medicago-Sinorhizobium*

adaptées aux conditions climatiques locales sans avoir à emprunter des voies de modification génétique. L'obtention des associations capables de fixer l'azote atmosphérique et de croître en période froide représente un enjeu agronomique et économique pour les pays méditerranéens.

Nous débuterons ce travail par la synthèse des connaissances actuelles sur les pâturages dans les zones méditerranéennes d'un point de vue socio-agronomique, puis nous aborderons les contraintes face à l'expansion des surfaces cultivées en luzerne annuelle dans le bassin méditerranéen ainsi que les facteurs affectant ce processus, en particulier les facteurs environnementaux. Parmi ces facteurs, nous nous intéresseront aux basses températures qui affectent la croissance de la luzerne ainsi que la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Au cours de cette revue bibliographique nous aborderons la situation actuelle de la production fourragère dans les régions méditerranéennes. Nous nous intéresserons en particulier au déficit de pâtures pendant l'hiver. Notre cas d'étude sera les luzernes annuelles, leur intérêt agronomique et économique. Puis, nous évoquerons les contraintes liées à l'introduction comme fourrage des luzernes annuelles en assolement avec des graminées. Parmi ces contraintes, nous étudierons des facteurs relatifs aux luzernes et d'autres relatifs à l'environnement. Nous nous proposons d'examiner en particulier l'effet des basses températures sur l'association luzerne-*Sinorhizobium*.

1. Systèmes de production agricole en zones méditerranéennes

Dans les pays de l'Afrique du Nord, du Proche Orient et du Moyen Orient (connus sous le nom abrégé de WANA), la production céréalière en sec et la production animale (en particulier ovine) ont longtemps été étroitement associées dans un système équilibré de rotation céréale-jachère en relation avec les zones de parcours. Les céréales produisaient du grain pour l'alimentation humaine (blé et orge), et animale (orge), ainsi que des résidus de culture (pailles, fanes de légumineuses) destinés à alimenter les troupeaux ovins et bovins.

Durant les dernières décennies, une augmentation de la production céréalière s'est opérée au détriment des surfaces destinées à la culture des plantes fourragères aggravant ainsi la crise de production fourragère déjà installée dans certains pays de la zone WANA. De plus, les besoins en fourrages et pâtures augmentent constamment avec l'accroissement du cheptel qui a doublé dans les trente dernières années (Gintzburger, 1994 ; Nordblom *et al.*, 1995). Ce déséquilibre entre les ressources fourragères et les besoins des troupeaux a engendré le surpâturage et la perte du rôle fourrager des parcours (Gintzburger, 1994). A titre d'exemple, la charge animale sur parcours en Algérie en 1956 était de l'ordre d'une Unité Ovine (U.O.) par 4 ha alors que ce paramètre a augmenté pour atteindre 1 U.O. par ha en 1985 (Gintzburger, 1994). Actuellement, le nombre d'ovins et caprins dans cette région s'élève à 410 millions selon les estimations de la FAO (FAO, 2000).

Cependant, les surfaces en jachères actuellement non exploitées dans les régions de WANA représentent un énorme potentiel. Etant estimées à 30 millions d'hectares (Carter,

1978), ces surfaces pourraient être en partie affectées à une production fourragère améliorée, ce qui permettrait d'aider à combler le déficit dans les pays concernés. De même, l'exploitation des terrains marginaux dans les zones steppiques en arrière pays pourrait aider à alimenter les troupeaux ovins et bovins (Le Houérou, 1969). Toutefois, l'exploitation des terrains marginaux dans l'arrière pays pour la production fourragère demeure défavorisée par les conditions climatiques prédominantes dans ces régions (Cocks et Ehrman, 1987 ; Le Houérou, 1989).

A part les basses températures, il existe certains facteurs limitant la production fourragère tels que le stress hydrique, la carence en éléments minéraux (notamment le phosphore) ou le pH élevé du sol. Néanmoins, nous nous intéressons à l'effet des basses températures sur la croissance de luzernes annuelles parce que ce facteur reste la contrainte majeure que rencontre la production fourragère pendant la période hivernale.

2. Conditions climatiques des zones méditerranéennes

Les arrières pays du bassin méditerranéen (en particulier dans les pays situés au sud et à l'est de la Méditerranée) sont caractérisés par des étés chauds et secs et des hivers pluvieux et froids (Chatterton et Chatterton, 1984). La température hivernale varie d'une région à l'autre au sein de la zone WANA et elle est plus basse dans l'arrière-pays méditerranéen. La température moyenne du mois de janvier (le mois le plus froid de l'année) est de l'ordre de 6,2°C à Alep (Syrie), 7,1°C à Mosul (Irak), 4,6°C à Batna (Algérie) et 8,2°C à Amman (Jordanie) (Halse, 1993). A part les bandes côtières, ces régions sont considérées comme semi-arides ou arides. En effet, la pluviométrie moyenne dans les régions semi-arides est comprise entre 300 et 600 mm an⁻¹ alors qu'elle ne dépasse pas 150 mm an⁻¹ dans les zones arides (Le Houérou, 1989).

Dans ces conditions, les basses températures deviennent le facteur limitant pour la croissance des plantes fourragères lorsque l'eau n'est pas le facteur limitant (Gintzburger, 1994). Les basses températures entraînent des difficultés d'adaptation notamment pour les plantes récemment introduites et posent des problèmes sérieux dans ces pays, qui dépendent économiquement de l'agriculture. Par conséquent, le problème de déficience de fourrages dans ces pays devient encore plus critique pendant la saison froide allant de novembre jusqu'en mars (Gintzburger *et al.*, 1990).

3. Augmentation de la production agricole par l'introduction des légumineuses annuelles

Les luzernes annuelles ou “médocs” constituent les espèces préférées pour remplacer les jachères du fait de leur abondance naturelle dans toutes les zones WANA et de leur adaptation aux sols alcalins prédominants dans la région (Robson, 1969). De plus, l'introduction des luzernes annuelles et des trèfles souterrains en rotation avec les grandes cultures (céréales) représente une étape vers une agriculture durable économiquement rentable (Nordblom, 1993), bénéfique pour le sol (Seklani et Hassen, 1990) et contribuant à satisfaire les besoins des troupeaux (Riveros *et al.*, 1993). Des essais pionniers mettant en œuvre des légumineuses annuelles ont été élaborés en Australie dans le cadre du “Ley Farming System”.

3.1. Système de rotation Céréale-Légumineuse pâturée “Ley Farming System”

Ce système consiste à employer une rotation Céréale-Légumineuses annuelles pâturées pour réduire les coûts de production et augmenter les rendements. Les cultures céréalières ainsi que les plantes fourragères de l'Australie méridionale sont originaires de la zone WANA (Halse, 1993). Ces espèces ont été introduites avec l'installation des européens sur ce continent et l'arrivée des bateaux transportant les semences des régions situées à l'ouest du bassin méditerranéen. L'utilisation délibérée des légumineuses pour le pâturage a commencé en 1890 d'une façon limitée avec l'ensemencement du trèfle souterrain dans les régions recevant une précipitation annuelle supérieure à 600 mm (Gladstones et Collins, 1983). L'utilisation raisonnée des médocs annuelles ou des trèfles souterrains sur les jachères constitue la base du “Ley Farming System” (Puckridge et French, 1983 ; McWilliams, 1988). La diffusion de cette pratique a été lente et l'application du système Ley Farming dans les régions productrices de céréales en Australie occidentale a été proposée par Dunne et Shier (1934). La mise en application de ce système d'assolement des légumineuses avec les graminées a considérablement amélioré les productions céréalière et ovine en Australie Méridionale dans un système de gestion durable, produisant des céréales, de la laine et de la viande (Nordblom, 1993).

3.2. Application de l'expérience australienne “Ley Farming System” en régions méditerranéennes

La réussite des chercheurs australiens à cultiver des variétés de luzerne annuelle et de trèfle souterrain en assolement avec les graminées a intéressé les chercheurs dans les pays

méditerranéens. Cette expérience australienne est extrapolable aux régions méditerranéennes pour deux raisons :

- similitude du climat d'une grande partie de l'Australie Méridionale avec celui de la zone méditerranéenne surtout au niveau des pluies hivernales
- les espèces australiennes utilisées dans l'assolement sont d'origine méditerranéenne.

Ainsi, plusieurs programmes de recherche ont été lancés dans les zones méditerranéennes en vue d'améliorer la productivité des plantes et surtout des cultures fourragères. Les premiers essais ont été effectués en Tunisie et en Algérie. En Tunisie, Doolette (1976) a étudié des cultivars australiens de *Medicago truncatula* alors que Saunders (1976) a utilisé des écotypes locaux de médics pour les adapter au froid en Algérie. Bien que ces deux auteurs ait attiré l'attention sur l'utilisation de luzernes annuelles, aucun de ces projets n'a abouti à la diffusion commerciale de médics (*Medicago* annuelles).

En Libye, un projet basé sur l'expérience australienne pour la mise en valeur de 100000 hectares a rencontré des difficultés liées à la taille considérable des surfaces visées (Halse, 1993). Toutefois, ce projet a réussi à établir des pâtures de luzerne dans une surface de 45000 hectares répartis sur 9 sites recevant des précipitations annuelles de 130 à 250 mm. Le projet jordanien, qui a duré 8 ans, avait pour but d'introduire, dans la phase jachère d'un assolement céréale-jachère, des pâtures de luzernes annuelles capables de se régénérer. Ce projet a rencontré des problèmes au niveau de l'adaptation des cultivars australiens. Cependant, il a montré la possibilité d'utiliser des cultivars locaux tels que *M. rigidula* et *M. rotata* qui ont présenté une bonne adaptation aux conditions du pays (Halse, 1993). Des projets similaires ont été initiés en Iraq (Halse et Trevenen, 1985), Syrie, Jordanie, Iran et Turquie (Halse, 1993). Dans chacun de ces pays, l'application de l'expérience australienne a rencontré des difficultés liées aux pratiques culturelles prédominantes, ne facilitant pas l'introduction de nouvelles pratiques et cultures innovantes.

Les difficultés qui empêchent la réussite du "Ley Farming System" dans le bassin méditerranéen résident dans les difficultés socio-économiques rencontrées dans les zones favorables (les principales zones de production agricole). Dans les zones marginales

(essentiellement l'arrière-pays), la faible nodulation et la mauvaise adaptation des variétés australiennes introduites constituent les contraintes principales.

Dans le but de surmonter ces difficultés socio-économiques, un projet international a été mis en place à l'ICARDA (Centre international de recherches agricoles dans les régions arides) situé à Tel Hadya près d'Alep en Syrie. Les chercheurs de l'ICARDA ont agi à 3 niveaux : écologique, agronomique et sociologique (Cocks, 1993). L'approche écologique consiste à réunir une collection de semences des plantes « Germplasm Collection » utilisables en "Ley Farming System". Dans ce but, la flore légumineuse a été collectée et les espèces ont été cultivées en rotation pour déterminer celles capables de réussir. Les cultivars seront ainsi adaptés aux conditions environnementales et au système de Ley-Farming. Au niveau agronomique, ce projet vise à améliorer la productivité de troupeaux et des céréales. Le point principal de cette approche est d'utiliser des intrants à faible coût : fixation biologique d'azote et pâtures auto-régénérantes. La troisième approche du projet de l'ICARDA ambitionne de construire des relations entre les scientifiques et les paysans grâce aux centres nationaux de recherches et expérimentateurs des pays concernés.

3.3. Introduction des luzernes annuelles en assolement avec les graminées

Le genre *Medicago* comprend environ 55 espèces annuelles et pérennes qui poussent naturellement dans les régions méditerranéennes. Les luzernes annuelles sont des plantes vivaces, leurs tiges portent des feuilles trifoliées à folioles finement dentées au sommet. La longueur des folioles est de l'ordre de 10 à 45 mm et la largeur est de 3 à 10 mm. L'inflorescence de la luzerne est en grappes ovales ou rondes de 4 à 40 fleurs. Ces fleurs sont le plus souvent violettes ou pourpres mais elles peuvent être de couleur jaune, blanche ou bleue. Les bourgeons à fleur commencent à sortir entre le sixième et le quatorzième nœud.

3.3.1. Les luzernes annuelles : Abondance et écologie

La répartition écologique des espèces de luzerne est liée principalement à la pluviométrie, l'altitude et la texture du sol (Zoghlami *et al.*, 1996). La fluctuation de la pluviométrie au cours des années dans les régions méditerranéennes induit une variabilité climatique, ce qui favorise la présence des luzernes annuelles. Les médics, en général, se trouvent dans des situations ouvertes comme les prairies, pâturages, et jachères et rarement dans les forêts. La distribution des luzernes annuelles et pérennes dans ces régions est illustrée

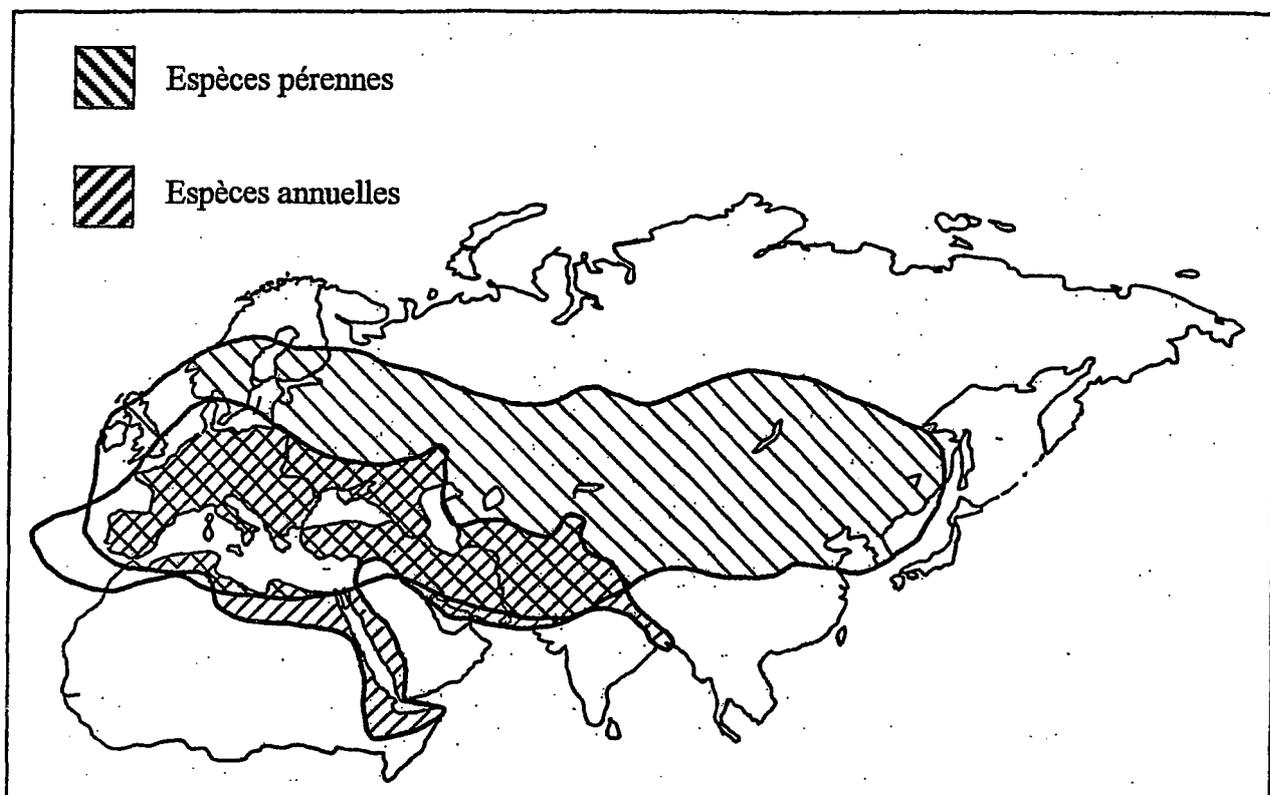


Fig. 1.1. Abondance naturelle des espèces de *Medicago spp.* en Afrique du Nord, Europe et Asie (d'après Reid *et al.*, 1993).

en Figure 1.1. Les espèces de luzernes annuelles les plus abondantes sont *Medicago rotata*, *M. noeana*, *M. truncatula*, *M. polymorpha*, *M. aculeata* et *M. rigidula*. Nous nous sommes intéressés particulièrement aux deux dernières espèces qui sont décrites ci-dessous :

1. *Medicago aculeata* (Gaerth.) : cette espèce (Fig. 1.2) est divisée en deux variétés selon la présence et l'absence d'épines. L'écotype *M. aculeata* 80 présente des gousses épineuses alors que les gousses de *M. aculeata* 5099 n'en portent pas. *M. aculeata* abonde essentiellement en Afrique du Nord et dans l'ouest de la Méditerranée. Elle pousse sur des sols argilo-limoneux ayant un pH supérieur à 7 (Reid *et al.*, 1993). Elle est plutôt rare dans les pays situés au nord de la Méditerranée telles que la moitié nord de l'Espagne, la France et la Grèce (Prosperi *et al.*, 1991). Cette espèce est considérée comme la meilleure espèce capable de remplacer les espèces australiennes (de haute performance) étant donné sa tolérance au froid (Webber, 1993). Néanmoins, elle nécessite la présence de *Sinorhizobium* spécifique pour donner une production satisfaisante (Bounejmate *et al.*, 1992). Les écotypes de *M. aculeata* utilisés dans cette étude sont l'écotype 80, provenant de l'Algérie, et l'écotype 5099, originaire de Tafila, Jordanie. Ces deux écotypes sont tolérants au froid mais le dernier nécessite la présence de souches spécifiques et efficaces de *Sinorhizobium* dans le sol. Nous avons choisi les écotypes *M. aculeata* 80 et *M. aculeata* 5099 parce qu'ils ont montré une performance prometteuse lors d'un essai préliminaire si l'on apporte le *Sinorhizobium* spécifique (Obaton *et al.*, 1996).

2. *Medicago rigidula* (L) All. : espèce de taille moyenne, généralement velue (Fig. 1.3). Les gousses sont ovoïdes à cylindriques, dures, épineuses, de 8 à 10 mm de diamètre avec 4 à 7 spires jointives. Le poids de 1000 graines est de l'ordre de 4 grammes. Elle se reconnaît facilement car c'est une des seules espèces dont les gousses sont entièrement recouvertes de poils. Cette espèce pousse préférentiellement dans les pays de la partie occidentale de la Méditerranée dans les sols calcaires présentant un pH supérieur à 8. Plusieurs chercheurs ont rapporté que c'est une espèce tolérante au froid (Abdelguerfi *et al.*, 1988) et bien adaptée aux conditions méditerranéennes (Francis et Katznelson, 1977 ; Cocks et Ehrman, 1987). Cependant, le degré de tolérance au froid n'est pas identique chez tous les écotypes de cette espèce. A titre d'exemple, l'écotype 716 provenant de la Syrie (Jisr El-Shoghour) est tolérant au froid alors que l'écotype 1919 originaire de Tripoli, Liban est moins tolérant aux basses températures (Abd El-Moneim et Cocks, 1986).



Fig. 1.2. *Medicago aculeata*.

3.3.2. Intérêt agro-économique

Les luzernes annuelles sont des plantes fourragères à fort potentiel nutritif, riches en protéines (10% dans les parties aériennes sèches et 20% dans les graines), en minéraux et en vitamines. On les utilise comme pâturage, et sous forme d'ensilage et de fourrage pour les bovins et les moutons. Ces plantes sont capables de s'adapter à des conditions climatiques très différentes. D'autre part, ces espèces sont sensibles à l'acidité (Peoples *et al.*, 1998) et bien adaptées aux sols alcalins prédominants dans le bassin méditerranéen (Nazari-Dashilbrown, 1993). La présence, sur les racines, de nodosités contenant des bactéries symbiotiques capables de fixer l'azote atmosphérique rend ces plantes très peu dépendantes de la fourniture d'engrais azotés. Pour la même raison, après la culture de la luzerne, le sol se trouve enrichi en matière azotée dont pourra bénéficier la culture suivante.

Les semences de luzernes annuelles sont majoritairement dures. Cette dormance (vernalisation) permet au peuplement de se reconstituer en dépit d'accidents climatiques (gels, sécheresse) et d'assurer la gestion du pâturage.

L'introduction des luzernes annuelles en assolement avec les céréales présente plusieurs intérêts agronomiques détaillés ci-dessous :

3.3.2.1. Production de fourrages

L'utilisation de la luzerne annuelle avec l'objectif de concevoir des systèmes de culture plus intensifs contribue à satisfaire les besoins de l'élevage (Zoghلامي *et al.*, 1996). La production de matière sèche par les médics est supérieure à d'autres légumineuses fourragères. Dans une revue bibliographique, Peoples *et al.* (1995) ont comparé la production de matière sèche chez 3 espèces fourragères : *Medicago littoralis*, *Trifolium repens* et *Trifolium subterraneum*, cultivées chacune en association avec d'autres espèces pâturées. Avec un apport de 50 kg N ha⁻¹, *M. littoralis* produit 9,9 tonnes MS ha⁻¹ contre 6 tonnes ha⁻¹ pour *T. subterraneum* et 3,4 tonnes ha⁻¹ pour *T. repens*. La production assurée par *M. littoralis* représente 29% de la production fourragère totale de sa pâture, contre 24% pour *T. subterraneum* et 22% pour *T. repens*. Dans un essai effectué sur plusieurs sites en Syrie, Cocks *et al.* (1993) ont illustré qu'une pâture de médics a produit 6 à 8 t MS ha⁻¹ an⁻¹ en 1986/1987. Le rendement a atteint 9 à 10 t MS ha⁻¹ an⁻¹ pendant une année plus humide.



Fig. 1.3. *Medicago rigidula*.

Des différences inter-variétales existent au niveau de la production fourragère. Papastilianou (1993) a montré que la quantité de matière sèche produite au stade formation de gousses par une culture de luzerne annuelle à Chypre (précipitation de 200-260 mm) varie entre 4600 et 7500 kg ha⁻¹ selon la variété et la souche bactérienne. Pour *M. rigidula*, cette quantité est comprise entre 5000 et 6000 kg ha⁻¹ (Papastilianou, 1993), ce qui présente une quantité de fourrage intéressante.

3.3.2.2. Enrichissement du sol en azote

Un autre avantage représenté par la luzerne est l'amélioration des propriétés du sol. D'une part, elle limite l'érosion et, d'autre part, elle contribue à l'enrichissement du pool d'azote du sol grâce à l'association avec *Sinorhizobium*. Papastilianou (1987) a montré qu'une culture de luzerne annuelle à Chypre apporte au sol entre 80 et 101 Kg N ha⁻¹ an⁻¹. Toutefois, cette quantité est variable car elle est fonction de différents facteurs tels que l'efficacité de l'association luzerne-*Sinorhizobium*, la température, les précipitations et le type du sol (Papastilianou, 1993). Ainsi, en absence d'apport azoté, Butler (1988) a rapporté que la quantité d'azote fixée par une culture de *Medicago littoralis* en Australie Méridionale à climat méditerranéen a atteint 102 kg N ha⁻¹ an⁻¹. Lorsque la quantité d'azote apportée passe à 50 kg N ha⁻¹, cette culture ne fixe que 52 kg N ha⁻¹. La fixation symbiotique d'azote réalisée par l'activité des nodosités associées aux légumineuses, représente donc un intérêt agronomique et environnemental en réduisant l'apport d'engrais chimiques au sol ce qui réduit les coûts de production et également diminue les risques de lessivage des nitrates (ce qui limite les problèmes de pollution des nappes phréatiques).

L'amélioration de la teneur du sol en azote se reflète sur la culture suivante. Papastilianou (1987) à Chypre a constaté qu'après une culture de luzerne annuelle, le rendement de l'orge en grains est de l'ordre de 3,9 tonnes ha⁻¹ contre 1,6 tonnes ha⁻¹ si l'orge est cultivé après orge et 1,0 tonnes ha⁻¹ dans le cas d'une culture d'orge après ray-grass. La performance de l'orge est meilleure après une *Medicago* qu'après d'autres légumineuses comme le pois-chiche (Papastilianou, 1987).

3.3.2.3. Mise en valeur de la jachère

La jachère sous différentes formes (nue, verte et herbeuse) est une nécessité à laquelle ont recours les agricultures des zones semi-arides et arides pour équilibrer biologiquement leur système de production.

La jachère herbeuse dans les pays du bassin méditerranéen est pratiquée dans les zones recevant une précipitation aux alentours de 300 mm par an. Bien que cette jachère fournisse une pâture à faible coût (Jaritz, 1982), elle consomme l'eau et les éléments nutritifs du sol et favorise la prolifération des mauvaises herbes au détriment de la sole de céréale suivante (Gintzburger, 1994). Abdelguerfi (1993) a montré que la culture de la luzerne annuelle dans les terrains non utilisés pour les céréales peut augmenter la production en fourrages et assurer ensuite la conservation de ces sols. L'utilisation raisonnée des luzernes sur les jachères permettrait d'augmenter sensiblement le rendement des céréales en rotation grâce à l'augmentation de la fertilité azotée du sol. Par conséquent, le remplacement des jachères par la culture de luzerne se traduit par une augmentation de la production animale, un prolongement de la durée de pâturage, une diminution de coût d'opérations agricoles, une réduction de l'érosion du sol, une augmentation de la teneur en matière organique et une amélioration de la structure du sol (Riveros *et al.*, 1993).

4. Contraintes face à l'expansion des surfaces cultivées en luzerne annuelle dans le bassin méditerranéen

Nous avons déjà souligné les difficultés que rencontre la culture des luzernes annuelles en assolement avec les céréales. Parmi ces difficultés, nous nous intéressons particulièrement aux problèmes liés à l'adaptation des variétés australiennes introduites et à la nodulation des variétés locales.

4.1. Faible adaptation des variétés introduites

Lors de l'introduction du "Ley Farming System" en Afrique du Nord, le choix de variétés de céréales ne posait pas de problème (Maatougi, 1993). Par contre, le choix de cultivars de médics se limitait aux disponibilités commerciales australiennes en semences. Au moment de l'application du système "Ley Farming", les surfaces destinées aux médics dans l'ouest de l'Algérie ont été de 15000 hectares en 1973 (Maatougui, 1993). Il ne restait de cette surface en 1978 qu'un peu plus de 5300 ha avant que ces pâtures de médics ne disparaissent

complètement en 1980. Ce système étant trop complexe pour les paysans algériens étant donné qu'il nécessitait la gestion de deux systèmes de production intégrés, céréales et troupeaux (Maatougui, 1993).

En dehors de facteurs strictement socio-économiques dans les zones climatiquement favorables de production, les cultivars utilisés souffraient des hivers rigoureux sur les steppes nord-africaines (Maatougui, 1993). L'utilisation principale sur de très grandes surfaces des cultivars australiens Jemalong (*M. truncatula*) et Robinson (*M. scutellata*) sur les Hauts-Plateaux algériens devait contribuer au rejet de ce système de Ley Farming (Maatougui, 1993). Des études écologiques et agronomiques ultérieures devaient confirmer la faible résistance au froid des cultivars Jemalong et Robinson, et de l'ensemble des cultivars australiens introduits et développés pour des hivers doux (Prosperi *et al.*, 1989 ; Zoghلامي *et al.*, 1996).

4.2. Faible nodulation des variétés locales

L'inefficacité de la nodulation constitue la contrainte majeure affectant l'établissement de l'association légumineuse-*Sinorhizobium* dans les zones méditerranéennes (Materon et Cocks, 1988). Ceci est dû au fait que les *Medicago* annuelles sont très spécifiques en ce qui concerne les souches de *Sinorhizobium* capable de former des nodosités. Il est fréquent qu'une *Medicago* introduite dans un nouveau sol ne rencontre que des populations de *Sinorhizobium meliloti* inefficients ou faiblement efficaces. Il ne se forme que des nodosités petites qui ne fixent pas ou peu l'azote atmosphérique. Les luzernes annuelles ne peuvent exprimer leur potentiel qu'en présence des souches de *S. meliloti* compatibles et capables de former des nodosités efficaces (Materon, 1993), donc dans le cas de ces sols l'inoculation devient possible. Pour étudier les caractéristiques symbiotiques et la spécificité des souches bactériennes, ce même auteur a conduit des expérimentations avec 247 souches de *Sinorhizobium meliloti* isolées de différents sols arables de différents pays de l'ouest d'Asie et sur 6 espèces de *Medicago*. Selon la qualité des nodosités et la vigueur des plantes, les souches bactériennes ont été classées en trois groupes : hautement efficaces, partiellement efficaces, inefficaces et pas de nodulation. La proportion de souches inefficaces de *Sinorhizobium meliloti* dans les sols syriens, jordaniens et turcs est supérieure à celle observée au Liban et à Chypre. Pour *M. rigidula*, la proportion de ces souches dans les sols jordaniens est de l'ordre de 70 à 80% du nombre total des souches par rapport à moins de 20% à Chypre.

Cependant, des souches efficaces de *S. meliloti* pour chacune des 6 espèces de *Medicago* ont été trouvées dans les cinq pays et ont déjà montré une performance satisfaisante au champ. Il a conclu qu'il est pertinent d'inoculer les semences de luzerne annuelles avec les souches compatibles (et capables de remplacer les souches indigènes) au semis pour assurer une nodulation efficace et un bon établissement des pâtures.

Papastylianou (1987) a constaté que la proportion d'azote provenant de la fixation est relativement faible (50 à 70% de l'azote total). Ceci indique qu'il est probablement encore possible d'augmenter cette proportion par l'amélioration de l'efficacité du processus de fixation via la sélection des souches de *Sinorhizobium* mieux adaptées aux conditions climatiques de la région méditerranéenne.

4.3. Effet des basses températures sur la croissance des plantes, la formation des nodosités et la fixation d'azote

L'effet des basses températures n'a pas été beaucoup étudié chez les luzernes annuelles. Ainsi, en plus des résultats concernant les luzernes annuelles, nous utiliserons des données obtenues chez d'autres légumineuses.

Le froid affecte toutes les activités du végétal. Prospero (1993) a montré que le gel détruit les feuilles et les tiges des médics conduisant à une réduction de la surface foliaire photosynthétique, ce qui affecte la croissance de la plante. Les basses températures affectent la plante à tous ses stades de développement de la germination jusqu'à la maturité. Alors que la germination peut se faire à des températures comprises entre 1°C et 37°C, elle est beaucoup plus rapide à 37°C par rapport à 1°C (Plancquaert, 1968).

L'effet du froid sur les plantes dépend de la durée d'exposition de celles-ci aux basses températures et de l'état hydrique du sol (Dart et Day, 1971 ; Paquin *et al.*, 1987). Les basses températures inhibent la croissance de la plante et augmentent la durée nécessaire pour accumuler la matière sèche. En revanche, elles ne réduisent pas forcément la capacité des plantes à prélever les éléments minéraux du sol et les transporter afin de s'en servir quand la plante rencontre à nouveau des conditions favorables (Bigot et Boucaud, 1994).

Les basses températures entraînent des changements dans le flux d'eau provenant des racines (Macduff *et al.*, 1989). D'autre part, la physiologie du végétal est modifiée par le froid. Une réduction remarquable de la quantité des protéines est détectée chez les plantes cultivées aux basses températures par rapport à celles qui se sont développées à une température de 25°C (Smith, 1970).

La température de la zone autour des racines (la rhizosphère) affecte plusieurs processus de la symbiose *Sinorhizobium*-légumineuse (Lie, 1974). L'effet de la température de la rhizosphère sur la symbiose est complexe et varie selon la plante hôte, les cultivars de chaque espèce et les souches de *Sinorhizobium* (Bowen et Kennedy, 1959 ; Pate, 1961 ; Lie, 1971). En affectant la photosynthèse et la nodulation des racines, les basses températures affectent la fixation d'azote. Toutefois, tous les paramètres jouant sur la fixation d'azote n'ont pas la même température limite (Dart et Day, 1971). Les nodules nécessitent des températures comprises entre 7 et 15°C pour se développer (Gibson, 1977). L'activité de la nitrogénase existe encore à des températures inférieures à 5°C, bien qu'elle subisse une réduction à ces basses températures (Obaton *et al.*, 1996). Il est maintenant admis que la demande en azote des parties aériennes régule l'activité nitrogénase en situation de contrainte (Hartwig *et al.*, 1994); ainsi, une réduction de croissance de la plante peut exercer un rétro-contrôle sur la fixation via une réduction de la demande en azote.

D'après la littérature, l'étape particulièrement sensible aux basses températures (8-10°C) est la pénétration de *Sinorhizobium* dans la racine et la formation de tissus bactériens (Lindemann et Ham, 1979 ; Mathews et Hayes, 1982 ; Walsh et Layzell, 1986 ; Lynch et Smith, 1993). Dans une revue bibliographique traitant l'effet des conditions environnementales sur la symbiose légumineuse-*Sinorhizobium*, Gibson (1971) a rapporté que les basses températures retardent l'infection des poils absorbants plus que la formation des nodosités, leur développement ou l'assimilation d'azote. La température limite pour que l'infection des racines par le *Sinorhizobium* se déroule est de 7°C (Gibson, 1977). En conditions contrôlées, l'infection des plantes de soja (*Glycine max*) par *Bradyrhizobium japonicum* a été retardée d'un jour lorsque la température de la rhizosphère est de 17,5°C par rapport à une température de 25°C (Zhang et Smith, 1994). Cet effet des basses températures devient plus fort en baissant la température jusqu'à 15°C, ce qui provoque un retard supplémentaire de 2 jours de l'infection. Des résultats similaires sur le soja et d'autres

légumineuses des régions sub-tropicales montrent que les basses températures de la rhizosphère réduisent la formation des nodosités et leur fonctionnement (Jones et Tisdale, 1921 ; Hardy *et al.*, 1968 ; Roughley et Date, 1986). La chute de la température de 25°C à 10°C réduit la croissance des nodosités et la fixation d'azote (par plante) chez le soja suite à l'inhibition de l'infection et de la formation des nodosités (Mathews et Hayes, 1982). Encore chez le soja, Lynch et Smith (1993) ont observé qu'une température de 15°C restreint l'infection et le développement des nodosités retardant ainsi le démarrage de la fixation d'azote jusqu'au 4^e au 6^e semaines après l'inoculation au lieu de 2 semaines à 25°C. Ce retard de développement des nodosités à 10°C se reflète sur la fixation d'azote qui ne représente que 9% de celle observée à 25°C à 6 semaine après l'inoculation. De même, Zhang *et al.* (1995) ont rapporté chez le soja que pour des températures comprises entre 25 et 17°C, la baisse de température d'un degré induit un retard du démarrage de la fixation d'azote de l'ordre de 2,5 jours. En dessous de 17°C, la baisse d'un degré retarde la fixation d'azote de 7 jours. Ces derniers auteurs en concluent que l'infection et le développement des nodosités sont sensibles à la baisse de la température au point que l'exposition du végétal à une température de 19°C au lieu de 21°C pendant quelques jours ralentit la fixation d'azote et réduit l'accumulation d'azote et la croissance des plantes.

Cet effet du froid sur l'infection et la formation des nodosités se répercute sur la fixation d'azote. Lynch et Smith (1993) ont montré qu'une exposition des plantes de soja à 15°C après l'inoculation retarde la fixation de 4 à 5 semaines et réduit la teneur en azote total de la matière sèche des plantes par rapport à une température de 25°C. De plus, les basses températures affectent aussi la formation des nodosités en réduisant la différenciation des bactéroïdes, bien que la masse des nodosités soit plus importante à 10°C qu'à 18°C chez le soja (Fyson et Sprent, 1982). En effet, les nodosités de grande taille formées à 10°C seront capables de fixer l'azote deux fois plus vite que celles formées à 18°C, ce qui permet d'obtenir des nodosités qui ont un grand potentiel à fixer l'azote dès que le sol se réchauffe au printemps (Fyson et Sprent, 1982).

Le froid a un incidence sur d'autres paramètres importants pour la fixation d'azote. Roughley et Dart (1970) ont rapporté que les basses températures affectent le nombre et la distribution de nodosités sur les racines secondaires. Les nodosités formées à 7°C sont moins

nombreuses que celles formées à 18°C et il existe très peu de nodosités sur les racines secondaires à 7°C.

Les études menées en laboratoire jusqu'à maintenant se sont rarement intéressées à la croissance de la légumineuse inoculée, à la vitesse de formation des nodules ou à l'efficacité de la fixation de l'azote en conditions de basses températures. Ces études se sont généralement déroulées sous températures optimales (20 à 30°C) favorisant la réponse de la nitrogénase (Hoglund, 1979). Ces dernières températures sont très supérieures à celles des sols en période hivernale froide lorsque les légumineuses fourragères et pastorales se développent.

L'effet des basses températures sur la symbiose varie selon l'état hydrique du sol et la disponibilité en éléments minéraux. Hatch et Macduff (1991) ont montré que la fixation d'azote est moins sensible aux basses températures en présence de faibles concentrations d'azote combiné dans le sol.

5. Amélioration de la croissance des luzernes annuelles en zones méditerranéennes

Alors que les conditions climatiques ne peuvent pas être modifiées, il est en revanche possible d'intervenir au niveau des associations luzerne-*Sinorhizobium* pour limiter les effets négatifs des conditions climatiques sur la luzerne annuelle. La sélection des cultivars (Papastylianou, 1987), des souches (Nautiyal, 1997) ou des deux partenaires de la symbiose (Webber, 1993) capables de tolérer des conditions défavorables reste la meilleure approche pour surmonter les contraintes environnementales, assurer une bonne fixation d'azote sous ces conditions (Herridge *et al.*, 1994) et ainsi favoriser la croissance de la plante.

5.1. Sélection des cultivars de luzernes annuelles adaptés aux basses températures

Les difficultés rencontrées lors de l'introduction des variétés de luzernes annuelles australiennes ont encouragé les auteurs à trouver des espèces locales présentant une meilleure adaptation aux conditions climatiques prédominantes dans les arrière-pays de la zone méditerranéenne. Les travaux de Cocks et Ehrman (1987) ont permis alors d'identifier des médics (*M. rigidula* et *M. rotata*) spécifiquement originaires des zones froides du Moyen Orient et d'en confirmer l'utilisation fourragère potentielle dans la rotation céréale-médics en

Syrie (Abd El-Moneim et Cocks, 1986). Pour l'Afrique du Nord, des collectes de *M. rigidula* jusqu'à 1800 m d'altitude confirment la résistance potentielle au froid de cette espèce (Abdelguerfi *et al.*, 1988) au Maroc et en Algérie. De même, des collectes de légumineuses annuelles au Maroc ont montré la présence de *M. aculeata* Gaerth. jusqu'à 2200 m d'altitude (Cremer-Bach, 1991).

D'autre part, le choix de cultivars affecte les contributions potentielles de la fixation à la nutrition azotée des systèmes de cultures (Wani *et al.*, 1995). Les différentes lignées d'une espèce montrent des capacités de fixation d'azote très différentes même si elles ont les mêmes conditions de culture (Herridge *et al.*, 1990 ; Hardarson *et al.*, 1993). En effet, la quantité d'azote fixé par le cultivar Azufrado de fève est de l'ordre de 70 kg N ha⁻¹ contre 25 kg N ha⁻¹ pour le cultivar Flor de Mayo (Hardarson *et al.*, 1993). La proportion d'azote provenant de la fixation est de 50 et 20% pour les deux cultivars respectivement. Dans une revue bibliographique, Peoples *et al.* (1995) ont traité les paramètres capables de jouer sur la fixation d'azote. Ces auteurs proposent des stratégies pour augmenter la proportion d'azote provenant de la fixation biologique d'azote en jouant sur les souches bactériennes, les cultivars et les paramètres du sol.

5.2. Sélection des souches de *Sinorhizobium* spécifiques et adaptées au climat local

Les résultats obtenus sur les luzernes annuelles montrent que la compétition entre souches de *Sinorhizobium* est influencée par le génotype des espèces végétales. En effet, celui-ci conduit à la production d'exsudats racinaires qui ne seront hydrolysables que par les souches bactériennes spécifiques (Rome, 1996), ce qui favorise l'infection des racines par ces souches. Le développement des nodosités fixatrices d'azote chez les légumineuses implique une série d'interactions complexes entre la bactérie et la racine hôte (Stacey *et al.*, 1995). Les légumineuses synthétisent des composés phénoliques identifiés par les rhizobactéries (Peters et Verma, 1990). L'échange précis de signaux moléculaires entre le *Sinorhizobium* et la plante hôte est essentiel pour le développement des nodosités efficaces (Verma, 1992).

Materon et Cocks (1988) ont identifié des souches natives de *Sinorhizobium* aptes à former des nodosités efficaces pour différentes variétés de luzerne. Un exemple qui montre l'importance de la spécificité des souches bactériennes est donné par Papastilianou (1993). Cet auteur a observé que la matière sèche produite par une culture de luzerne au stade de

formation de gousses varie entre 5000 et 6000 kg ha⁻¹ pour deux souches différentes de *Sinorhizobium*.

Il existe d'autres facteurs du milieu qui affectent l'adaptation et l'efficacité des souches de *Sinorhizobium*. Ledgard et Steele (1992) ont constaté que le déficit hydrique réduit la fixation symbiotique de l'azote en altérant directement la structure fine des nodosités.

L'origine de la souche isolée et utilisée comme inoculant joue un rôle important dans l'adaptation aux conditions climatiques. Ek-Jandér et Fåhraeus (1971) ont constaté que les souches de *R. trifolii* isolées des régions froides (Nord de la Scandinavie) présentent une meilleure adaptation aux basses températures par rapport à celles isolées des régions plus au sud. Par rapport à celles du Sud, les souches provenant du Nord croissent plus vite, nodulent les plantes hôtes plus tôt et présentent une réduction de l'acétylène plus importante à une température de fonctionnement de 10°C.

6. Conclusions et objectifs de recherche

Les arrière-pays du bassin méditerranéen sont caractérisés par des étés chauds et secs et des hivers froids et pluvieux. Dans ces zones à climat continental, les basses températures deviennent le facteur limitant pour la croissance des plantes fourragères induisant ainsi un déficit dans les ressources fourragères pendant la période froide, de novembre jusqu'en mars. En se basant sur le Ley Farming System développé en Australie, des projets ont été élaborés pour introduire des cultivars de médics en assolement avec les céréales. Ces projets ont échoué dans les zones à conditions climatiques favorables à cause des difficultés socioéconomiques rencontrées. De plus, dans les zones marginales (essentiellement l'arrière-pays), la faible nodulation et la mauvaise adaptation des variétés australiennes introduites constituent les contraintes principales.

L'analyse bibliographique précédente montre la nécessité de trouver des associations luzerne-*Sinorhizobium* tolérantes aux basses températures afin de prolonger la durée de pâturage pendant la saison froide. La sélection des cultivars, des souches ou des deux partenaires de la symbiose capables de pousser au froid reste la meilleure approche pour réduire l'effet dépressif des basses températures hivernales. Dès le début des années 1970, plusieurs programmes de recherche ont été lancés dans les zones méditerranéennes pour

améliorer les méthodes utilisées en agriculture dans le but d'augmenter la productivité des plantes et surtout des espèces fourragères. Cependant, ces programmes ont été confrontés au problème des basses températures hivernales. Ainsi, Obaton *et al.* (1996) ont suggéré que la production de pâtures pendant l'hiver pourrait être augmentée en étudiant les deux partenaires de la symbiose luzerne-*Sinorhizobium*. Ces études préliminaires ont montré que les espèces *M. aculeata* et *M. rigidula* présentent une certaine tolérance au froid par rapport aux autres espèces. Notre travail s'inscrit dans le cadre de ce projet avec pour but d'étudier l'effet des basses températures sur la croissance et l'efficacité de la fixation d'azote chez plusieurs associations luzerne annuelles-*Sinorhizobium*. Nous avons étudié la fixation symbiotique en vue de déterminer si la fixation d'azote peut avoir lieu en hiver et de vérifier si cette fixation limite la croissance hivernale de luzernes annuelles, déterminant ainsi la performance des associations concernées sous le climat local. Nous avons testé plusieurs associations *Medicago-Sinorhizobium* en vue de trouver les associations les plus performantes en périodes hivernales.

Nous avons effectué des essais au champ pendant 2 ans sur le site de l'ICARDA à Alep (Syrie) représentatifs des conditions climatiques dans les arrière-pays méditerranéens. Les données obtenues au champ ont ensuite été complétées et vérifiées par l'étude, en conditions contrôlées, du comportement des associations à basses températures (9 et 7°C).

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

II. MATERIELS ET METHODES

Ce travail est constitué de deux parties : la première concerne les expériences menées au champ au “Centre international de recherches agronomiques des zones arides” (ICARDA, Alep-Syrie) pendant deux saisons, 1997-1998 et 1998-1999. La deuxième partie traite des essais en conditions contrôlées effectués au laboratoire “Agronomie et Environnement” de l’ENSAIA (Nancy-France).

1. Etude au champ

1.1. Mise en place et suivi des expérimentations

Les expérimentations ont été mises en place respectivement le 6 janvier 1998 et le 20 janvier 1999, au site de recherches de l’ICARDA à Tel-Hadya (Longitude : 36°56’ E, latitude : 35°55’ N, altitude : 284 m). Cette région est considérée comme sèche avec des précipitations annuelles moyennes de l’ordre de 325 mm (Fig. 2.1). Le climat est chaud et sec en été, humide et assez froid en hiver (Abd El-Moneim et Cocks, 1986). Des périodes de gel modéré (entre 15 et 30 jours par an) peuvent intervenir sur le site en plein hiver. Le sol du champ expérimental est un vertisol (sol argileux à base de montmorillonite) faible en matière organique mais bien structuré ayant un pH de 8-8,5 (Ryan *et al.*, 1997). Ses propriétés physico-chimiques sont données en Annexe 1.

1.1.1. Matériel végétal et microbien

Nous avons choisi deux espèces de *Medicago* spp., avec deux écotypes de chaque espèce. Quatre souches de *Sinorhizobium* isolées de la région méditerranéenne sont utilisées au cours de ce travail afin d’obtenir des associations bien adaptées aux conditions prédominantes dans cette région.

♣ Matériel végétal

Les deux espèces de *Medicago* sp. utilisées au champ sont *Medicago aculeata* Gaerth. et *Medicago rigidula* L. Deux écotypes de chaque espèce sont cultivés pendant la première année (1998). Il s’agit des écotypes 80 et 5099 de *Medicago aculeata* et des écotypes 716 et 1919 de *Medicago rigidula*. Cependant, nous avons exclu le cultivar *M. rigidula* écotype 1919

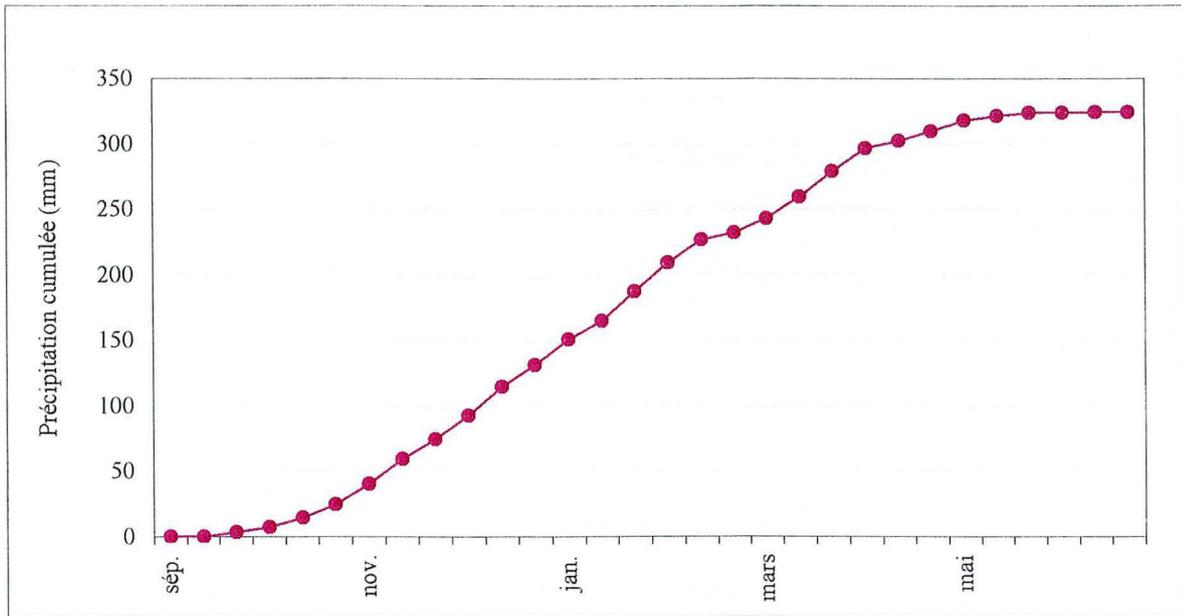


Fig. 2.1. Moyenne de 15 ans de la précipitation annuelle cumulée sur le site de l'ICARDA à Tel Hadya (Syrie).

de l'expérience en 1999, du fait de sa sensibilité aux basses températures ; la production de biomasse est faible par rapport aux autres écotypes étudiés.

Dans la suite du travail nous allons définir les écotypes utilisés par des symboles de la manière suivante :

Variété	Ecotype	Symbole
<i>M. aculeata</i>	80	A
<i>M. aculeata</i>	5099	B
<i>M. rigidula</i>	716	R
<i>M. rigidula</i>	1919	D

♣ Matériel microbien

Pour obtenir les meilleures aptitudes fixatrices, les écotypes utilisés sont inoculés par des souches différentes de *Sinorhizobium meliloti* (Tableau 2.1). En 1998, chaque écotype a été inoculé par deux souches différentes, alors qu'en 1999 nous avons inoculé chacun des trois écotypes par une seule souche de *Sinorhizobium*, à l'exception de *M. aculeata* écotype 5099 qui a été inoculé par deux souches différentes.

La provenance des souches de *Sinorhizobium meliloti* de la collection de l'ICARDA est la suivante :

M620 : Maroc,

M508 : Turquie,

M53 : Syrie,

BZI : Sud de la France (isolée par l'INRA de Montpellier).

Des essais préliminaires effectués à l'ICARDA ont montré que les trois premières souches sont plus efficaces avec les écotypes étudiés. De plus, l'utilisation de la souche BZI a été recommandée par l'ICARDA et l'INRA (Communication personnelle de J-C. Cleyet-Marel).

Tableau 2.2. Ecotypes et traitements utilisés au champ durant la saison 1998. Les écotypes utilisés sont : A: *M. aculeata* écotype 80, B: *M. aculeata* 5099, R: *M. rigidula* écotype 716 et D: *M. rigidula* écotype 1919. Les traitements appliqués sont : inoculation (I), fertilisation azotée (F) et témoin non fertilisé non inoculé (T).

Espèce	Ecotype	Traitement	Inoculation (souches)	Fertilisation (kg N ha ⁻¹)
<i>M. aculeata</i>	80	AI 620	<i>R. meliloti</i> 620	90
		AI 53	<i>R. meliloti</i> 53	
		AF		
		AT		
	5099	BI 508	<i>R. meliloti</i> 508	90
		BI 620	<i>R. meliloti</i> 620	
		BF		
		BT		
<i>M. rigidula</i>	716	RI 53	<i>R. meliloti</i> 53	90
		RI BZI	<i>R. meliloti</i> BZI	
		RF		
		RT		
	1919	DI 53	<i>R. meliloti</i> 53	90
		DI BZI	<i>R. meliloti</i> BZI	
		DF		
		DT		

Tableau 2.1. Souches utilisées pour inoculer les différents écotypes pour les deux saisons (1998 et 1999).

Ecotype	Souches			
	1998		1999	
<i>M. aculeata</i> 80	M53	M620	M620	----
<i>M. aculeata</i> 5099	M508	M620	M508	M620
<i>M. rigidula</i> 716	M53	BZI	BZI	----
<i>M. rigidula</i> 1919	M53	BZI	----	----

1.1.2. Dispositifs expérimentaux au champ

- **Expérimentation N°1 (1998) :**

Dans cette expérience nous avons étudié deux facteurs : l'écotype de luzerne et la source d'azote (inoculation, fertilisation azotée). Tous les écotypes et traitements sont présentés dans le Tableau 2.2.

- Au niveau des plantes, nous avons utilisé quatre écotypes : *Medicago aculeata* 80, *M. aculeata* 5099, *M. rigidula* 716 et *M. rigidula* 1919 représentés respectivement par les lettres A, B, R et D.

- Au niveau de la source d'azote pour chaque écotype, les modalités sont les suivantes : Inoculation (I) par 2 souches différentes de *Sinorhizobium*, Fertilisation (F) avec un apport de 90 kg d'azote en plus du traitement Témoin (T).

Eléments statistiques : 4 écotypes x 4 sources de nutrition azotée x 4 répétitions par traitement, soit 64 parcelles, et en plus 4 parcelles d'orge (plante de référence pour ^{15}N), soit 68 parcelles au total. La présence des parcelles d'orge sera explicitée plus loin (Utilisation de ^{15}N).

- **Expérimentation N°2 (1999) :**

Le nombre de facteurs étudiés est de 2 : l'écotype de luzerne et la source d'azote.

- Au niveau des plantes : 3 écotypes sont mis en œuvre : A, B et R (Tableau 2.3).

Tableau 2.3. Ecotypes et traitements utilisés au champ durant la saison 1999. Les écotypes utilisés sont : A: *M. aculeata* écotype 80, B: *M. aculeata* 5099 et R: *M. rigidula* écotype 716. Les traitements appliqués sont : inoculation (I), fertilisation azotée (F) et témoin non fertilisé non inoculé (T).

Espèce	Ecotype	Traitement	Inoculation (souches)	Fertilisation (kg N ha ⁻¹)
<i>M. aculeata</i>	80	AI 620	<i>R. meliloti</i> 620	90
		AF		
		AT		
	5099	BI 508	<i>R. meliloti</i> 508	90
		BI 620	<i>R. meliloti</i> 620	
		BF		
	BT			
<i>M. rigidula</i>	716	RI BZI	<i>R. meliloti</i> BZI	90
		RF		
		RT		

- Au niveau de la source d'azote pour chaque écotype : inoculation avec une souche de *Sinorhizobium* (I) + 1 modalité fertilisée (F) + 1 modalité témoin (T).
- Éléments statistiques : 3 écotypes x 3 modalités de nutrition azotée x 5 répétitions par traitement, soit 45 parcelles, et en plus 5 parcelles correspondant à l'inoculation de *M. aculeata* 5099 avec une deuxième souche + 5 parcelles d'orge = 55 parcelles au total.

Pour les deux essais, les parcelles sont réparties selon un plan expérimental en split-plot (Annexes 2 et 3).

Toutes les parcelles expérimentales ont été récoltées et les résultats exploités. Cependant, nous ne présenterons pas tous les résultats pour faciliter la comparaison entre les 2 années étudiées. En effet, nous avons simplifié le protocole en 2^e année. L'écotype *M. rigidula* 1919 (D) à comportement intermédiaire a été éliminé lors de la deuxième année. Nous avons conservé des associations médics-souches à comportements contrastés. De même, les résultats concernant la souche bactérienne M53, et l'association *M. aculeata* 5099 x M620 (pendant les deux saisons) ne seront pas présentés car leurs performances ont été faibles.

1.1.3. Conduite des parcelles expérimentales

Nous avons choisi des parcelles n'ayant pas été cultivées avec des légumineuses depuis 10 ans au moins. Après avoir arraché les mauvaises herbes manuellement, deux labours ont été effectués, le premier est profond alors que le second est superficiel pour bien aérer le sol. Un apport de P_2O_5 de 50 kg ha^{-1} a été réalisé. Puis, le sol a été traité au Carbofuran® avant l'ensemencement afin de contrôler les sitones. Une fois le champ préparé, il a été divisé en blocs (Fig. 2.2). Les rangs de semis sont espacés de 17,5 cm.

1.1.4. Mise en culture et application des traitements

La luzerne est semée manuellement et nous avons fait en sorte que la densité des plantes de chaque écotype soit de l'ordre de $250 \text{ plantes m}^{-2}$. La quantité de semence utilisée par hectare varie entre 15 et 20 kg selon le poids des graines de chaque écotype. Des parcelles de 2 x 8 m sont disposées en 4 et 5 blocs en split-plot en 1998 et 1999, respectivement (Annexes 2 et 3). Il existe deux sous-blocs au sein de chaque bloc. Le premier contient les écotypes inoculés, les témoins et l'orge alors que le deuxième est dédié aux plantes fertilisées

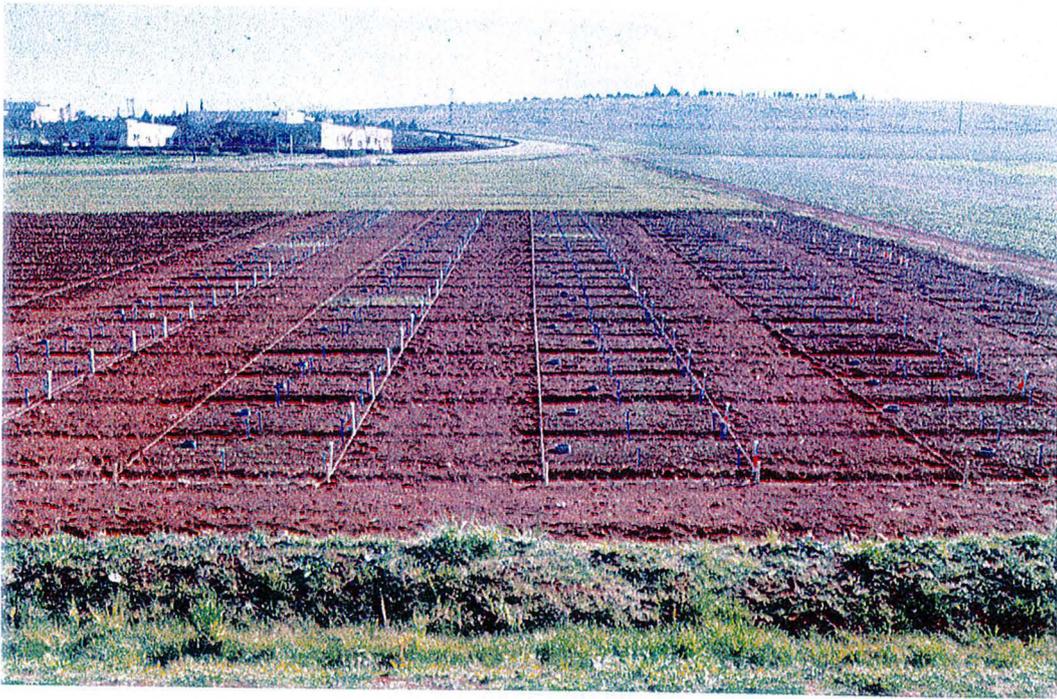


Fig. 2.2. Champ expérimental de l'ICARDA sur le site de Tel Hadya (Syrie).

des 4 écotypes afin d'éviter la migration de l'azote vers les parcelles non fertilisées. Une distance de 1,75 mètres sépare les parcelles dans chaque sous-bloc afin d'éviter la contamination entre les parcelles des plantes inoculées et celles des témoins. La répartition des écotypes au sein de chaque bloc est déterminée aléatoirement.

Les inoculum de souches sélectionnées sont mélangés avec du terreau (Bezdicek *et al.*, 1978 ; Smith, 1987) dans un petit sachet, à une concentration de 10^8 cellules g^{-1} terreau. Après avoir semé les graines, l'inoculum est mélangé avec de l'eau et l'inoculation des semences de chaque écotype est effectuée par arrosage avec la solution de la souche concernée.

Afin d'éviter leur contamination, les plantes non inoculées sont mises en culture après avoir introduit les souches de *Sinorhizobium* pour les traitements inoculés. Concernant le bloc fertilisé, une quantité égale à 90 kg N ha^{-1} (Sulfate d'Ammonium, 21,2%) a été rajoutée sur les parcelles expérimentales en trois apports de 30 kg N ha^{-1} . Le premier apport a été effectué directement après le semis, alors que le deuxième a été appliqué au stade 5-7 feuilles. Le troisième apport est réalisé lorsque les plantes présentent 15 à 17 feuilles. Quant au bloc témoin, les plantes n'ont pas été inoculées ni fertilisées.

L'orge a été utilisée comme plante de référence non-fixatrice d'azote étant donnée la concordance entre cette espèce et les luzernes annuelles au niveau de leur cycle de végétation (Annexe 4). De plus, la profondeur d'enracinement de l'orge est équivalente à celle des luzernes annuelles, ce qui permet l'absorption des minéraux dans les mêmes proportions. Ainsi, dans chaque bloc, une parcelle est cultivée avec de l'orge (cultivar Arabi Aswad) qui est fertilisée à raison de 40 kg N ha^{-1} afin de permettre une croissance moins limitée par l'azote. Cela permet à l'orge d'avoir un rythme de croissance comparable à celui des plantes fixatrices d'azote (Chalk, 1985).

Le sol a été légèrement tassé à la fin du semis des luzernes et de l'orge pour améliorer le contact entre les racines et le sol.

L'étude de la fixation de l'azote atmosphérique et des techniques utilisées pour déterminer la part d'azote provenant de la fixation seront discutées ultérieurement (cf. partie 3 de ce chapitre).

1.2. Croissance et développement des luzernes annuelles

Pour déterminer le développement de la luzerne en hiver et au printemps, nous avons suivi des paramètres biologiques et morphologiques tels que le nombre de jours jusqu'à la germination, le nombre de feuilles émises ainsi que le nombre de jours nécessaires pour arriver à la floraison et à la fructification. Nous avons également déterminé l'accumulation de la matière sèche dans la plante. La surface foliaire a été déterminée à l'aide d'un appareil de numérisation (Model LI- 3100, Licor Instruments Corporation, Lincoln, Nebraska, USA).

Nous avons échantillonné périodiquement (à cinq occasions au cours du cycle de croissance) des plantes de luzerne présentes sur une surface de 0,25 m² afin d'estimer l'accumulation de la matière sèche dans les parties aériennes et dans les racines. Cette matière sèche est déterminée après un passage à l'étuve à 72°C pendant 48 heures. Les racines ont été soigneusement prélevées et nettoyées à l'eau pour étudier les nodosités.

Pour estimer le système fixateur (nodulation, vitesse d'établissement des nodosités), nous avons étudié le nombre de jours jusqu'à la formation de la première nodosité chez les plantes inoculées et utilisé une échelle de notation des nodosités (Corbin *et al.*, 1977 ; Beck *et al.*, 1993). Cette échelle (de 0 à 5) prend en compte le nombre de nodosités efficaces (roses), leur distribution sur les racines principales et secondaires (Annexe 5).

1.3. Relevés météorologiques

Des données météorologiques sont enregistrées quotidiennement par une station automatique située sur le domaine de la station de l'ICARDA (Tel-Hadya) à 300 m des parcelles. Les données retenues pour notre étude sont les suivantes :

- La température minimale et maximale (°C) de l'air sous abri à 2 m de hauteur.
- La température minimale et maximale (°C) du sol à 10 cm de profondeur.
- La pluviométrie (mm).

L'ensemble de ces données est relevé par la station. Selon nos besoins d'interprétation, nous avons utilisé les températures moyennes de l'air et du sol à 10 cm de profondeur (niveau du sol où sont situées la plupart des nodosités).

2. Etude en conditions contrôlées

Outre les expériences effectuées au champ, nous avons étudié l'effet des basses températures sur les luzernes annuelles en conditions contrôlées pour expliciter les résultats obtenus en conditions naturelles. Ainsi, nous avons suivi l'effet de basses températures, 7 et 9°C respectivement, sur trois écotypes de luzerne cultivés en pots, chacun inoculé par deux souches différentes de *Sinorhizobium*. Nous avons étudié le développement, la production de biomasse totale et la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par ces associations.

Nous décrivons le matériel et les conditions de culture communs à l'ensemble des deux expérimentations effectuées en conditions contrôlées, puis nous détaillerons les aspects spécifiques des protocoles suivis en 1998 et 1999.

2.1. Mise en place de l'expérimentation

Les étapes effectuées pour les deux expérimentations sont identiques. Cependant, quelques différences existent soit au niveau des écotypes utilisés soit concernant les mesures réalisées.

2.1.1. Matériel biologique

♣ Matériel végétal

Les deux expérimentations ont été conduites en utilisant trois écotypes de luzerne. Lors de la première expérience, nous avons comparé les deux écotypes de *M. aculeata*, 80 et 5099. Pour la deuxième expérimentation, nous avons cultivé l'écotype 5099 de *M. aculeata* et l'écotype 716 de *M. rigidula*. Ces trois écotypes de *Medicago* ont été choisis pour leur tolérance au froid.

♣ Souches bactériennes

Quatre souches de *Sinorhizobium meliloti* ont été retenues : M53, M620, M508 et BZI pour inoculer les trois écotypes de luzerne selon les modalités suivantes :

Premier essai :

- *M. aculeata* écotype 80 inoculé respectivement par les souches M53 et M620
- *M. aculeata* écotype 5099 inoculé par les souches M508 et M620

Deuxième essai :

- *M. aculeata* écotype 5099 inoculé par les souches M508 et M620

- *M. rigidula* écotype 716 inoculé par les souches M53 et BZI.

2.1.2. Prégermination des semences

Un grand nombre de graines a été choisi pour chaque écotype afin d'obtenir un nombre suffisant de plantules aptes à la transplantation (en fonction du pourcentage de germination). Les graines utilisées pour le semis sont au préalable scarifiées légèrement à l'aide de papier de verre puis stérilisées. La stérilisation commence par un rinçage des semences à l'alcool, puis par l'immersion dans une solution de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ pendant deux minutes. Elles subissent ensuite 6 rinçages à l'eau distillée stérile pendant une minute.

Trente à 40 semences sont déposées sur une boîte gélosée (8 g d'agar-agar L^{-1} eau). Les graines sont vernalisées à 4°C et incubées à l'obscurité, pendant 12 heures. Pour avoir des racines droites et vigoureuses, les boîtes gélosées sont ensuite retournées et incubées à 25°C pendant 24 à 30 heures selon le taux de croissance.

2.1.3. Préparation des inoculum

Les inoculum sont obtenus par croissance de la souche lyophilisée sur un milieu de mannitol (10 g L^{-1}) et d'extrait de levure ($0,5\text{ g L}^{-1}$) à l'obscurité pendant 48 heures sur une table d'agitation.

2.1.4. Dispositif de culture

Expérimentation N°1 : Comparaison de deux écotypes de *M. aculeata*

L'objectif de cette expérience est d'étudier le comportement des deux écotypes de luzerne annuelle (*M. aculeata* 80 et *M. aculeata* 5099) ayant des sources d'azote différentes et soumises à deux basses températures, 9 et 7°C . Cette dernière température a été choisie parce que l'infection des racines par les *Sinorhizobium* ne se passe pas en dessous de 7°C (Gibson, 1971). Le plan expérimental est le suivant :

- Nombre de facteurs : 2 ; écotype (*M. aculeata* écotypes 80 et 5099) et source d'azote (trois modalités),
- Ces plantes sont cultivées à deux températures : 9 et 7°C ,
- Eléments statistiques : 5 répétitions par traitement et par prélèvement, donc :
2 (écotypes) x 3 (modalités de nutrition azotée) x 2 $T^\circ\text{C}$

= 12 traitements x 5 répétitions x 2 prélèvements
 = 120 pots (plantes) au total + 24 pots (pour suivre la nodulation).

Expérimentation N°2 : Comparaison de deux espèces de *Medicago* : *M. aculeata* et *M. rigidula*

Cette expérience a pour objectif de suivre le comportement de l'écotype *M. aculeata* 5099 utilisé pendant la première expérimentation et d'un autre écotype (*M. rigidula* 716) qui n'as pas été étudié lors du premier essai. Le plan expérimental comporte :

- Nombre de facteurs : 2 ; écotype (*M. aculeata* écotype 80 et *M. rigidula* écotype 716) et source d'azote (quatre modalités),
- Ces plantes sont cultivées à deux températures : 9 et 7°C,
- Eléments statistiques : 5 répétitions par traitement et par prélèvement :
 2 (écotypes) x 4 (modalités de nutrition azotée) x 2 T°C
 = 16 traitements x 5 répétitions x 2 prélèvements
 = 160 pots (plantes) au total + 24 pots (pour suivre la nodulation) + 8 pots (contenant des plantes d'orge).

2.1.5. Mise en route des expérimentations

- Le sol de type argileux (Plateau de Haye, Meurthe et Moselle) a été séché et tamisé. Le pH à l'eau est de 8,0. Les propriétés physico-chimiques du sol sont données en Annexe 6. Des pots en plastique (11 x 11 x 11 cm) sont remplis par une quantité égale à 1000 g de sol.
- Afin d'assurer l'homogénéité des plantules au départ, nous avons choisi à partir des graines germées des plantules ayant une longueur de racine comparable. A la mise en place, les plantules choisies sont placées sur le sol dans le pot à une profondeur de 2 cm. Avant de recouvrir les racines par le sol, on réalise l'inoculation par arrosage des racines avec l'inoculum.
- Dans chacun des pots, nous avons ainsi installé 2 plantules.
- 24 pots supplémentaires (2 écotypes x 2 souches x 2 T°C x 3 répétitions) sont préparés en vue de suivre la formation des nodosités. Chaque pot contient plusieurs plantules.
- Durant la deuxième expérimentation, douze pots dont chacun contient une plante d'orge, sont placés dans les mêmes conditions environnementales (six pots à 7°C et six pots à 9°C). Une quantité égale à 40 kg N ha⁻¹ [30 kg de N-(NH₃)₂SO₄ + 10 kg de ¹⁵N-

(NH₃)₂SO₄] est additionnée à ces pots en vue d'un marquage au ¹⁵N (cf. partie 3 de ce chapitre).

2.1.6. Apports hydriques et minéraux

Pour éviter tout déficit hydrique, les pots sont arrosés trois fois par semaine. L'arrosage est déterminé par pesée afin d'ajuster la teneur en eau à une valeur correspondant à 65% de la capacité au champ du sol utilisé (Annexe 7).

La nutrition des plantes en macro- et micro-éléments est assurée par la solution nutritive de McKnight (1949) qui est déficiente en azote. La composition de cette solution est détaillée en Annexe 8. Au début de la période de croissance la solution est apportée 2 fois par mois, puis une fois par semaine au stade formation des ramifications secondaires. La solution nutritive déficiente en azote a été appliquée aux traitements inoculés, alors que les traitements sans inoculation ont été arrosés par une solution nutritive complète. En ce qui concerne le traitement fertilisé en azote, une quantité égale à 90 kg N ha⁻¹ est apportée aux pots à raison de trois apports de 30 kg N ha⁻¹ (Annexe 9). Le premier apport est appliqué immédiatement après la transplantation, le deuxième est réalisé au stade de première ramification de la tige des plantes, alors que le troisième apport intervient au stade de troisième ramification.

2.1.7. Conditions de culture

Les pots sont placés en phytotron, pour des raisons techniques nous n'avons pas pu utiliser plus d'un phytotron pour chaque traitement thermique. Les phytotrons présentent les conditions environnementales suivantes :

- Température : respectivement 9 et 7°C (en continu). La variation de la température au sein des phytotrons a été de l'ordre de ±0,5°C.
- Luminosité : la photopériode est fixée à 12 heures et l'intensité lumineuse est de 270 μmol photons m⁻² s⁻¹ fournie par des lampes aux halogénures de mercure (HQ1-T 400W, Osram, Allemagne).
- Humidité relative : 80%.

2.2. Croissance et développement des luzernes

Pour suivre le développement des plantes, nous avons enregistré les dates de germination, d'apparition des feuilles et d'apparition de la première nodosité.

L'évolution de la surface foliaire et l'accumulation de la matière sèche carbonée et azotée ont été suivies en effectuant deux échantillonnages. Si l'on considère le jour de transfert des plantules dans les pots comme jour 0, le premier échantillonnage a été effectué à l'âge de 63 jours (stade 16-18 feuilles) correspondant au deuxième stade au champ. Le deuxième échantillonnage a été réalisé avant la floraison lorsque les plantes sont âgées de 98 jours (correspondant au stade pré-floraison au champ). Les plantes sont coupées à la surface du sol et les compartiments végétaux (parties aériennes et racines) stockés à -25°C. Ensuite, les organes végétaux sont lyophilisés et la biomasse sèche de chaque organe est déterminée. L'étape suivante consiste à broyer ces organes à l'aide d'un broyeur à billes et à bien homogénéiser la poudre qui en résulte. Les échantillons végétaux sont ensuite analysés à l'aide d'un autoanalyseur C/N/S Na 1500 Carlo Erba (Carlo Erba Instrumentazione, Milan, Italie) pour déterminer leur teneur en carbone et en azote total et calculer ainsi les quantités totales d'azote et de carbone des organes.

3. Etude de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique et méthodes d'estimation de l'azote fixé

Nous avons déterminé la fixation d'azote chez les plantes cultivées au champ et en conditions contrôlées.

Plusieurs méthodes ont été développées pour estimer la fixation d'azote par les bactéries symbiotiques. Cependant, il n'existe pas de méthode fiable pour donner des mesures précises de la quantité d'azote fixée. Chaque technique a ses avantages et ses inconvénients bien qu'il existe des méthodes qui soient plus précises que d'autres. Parmi les méthodes utilisées pour estimer la quantité d'azote fixée nous citerons les suivantes que nous avons utilisées :

3.1. Activité réductrice de l'acétylène (ARA)

Mise au point par Dilworth (1966), cité par Laperrière (1984), cette méthode repose sur le suivi de l'activité enzymatique de la nitrogénase et non pas sur la quantité d'azote fixée.

La réduction de l'acétylène en éthylène est liée à la présence de la nitrogénase dans les nodosités. Cette technique permet de comparer l'activité potentielle de la nitrogénase des écotypes pendant le cycle de croissance. L'ARA est effectuée par incubation pendant 30 à 120 minutes de la plante entière ou des parties portant les nodosités dans un système fermé qui comprend 10% d'acétylène.

Cette technique présente les avantages importants d'être rapide, peu coûteuse et non destructrice. Elle permet également d'effectuer des mesures instantanées en cours de végétation alors que toutes les autres techniques sont cumulatives et portent essentiellement sur des plantes en fin de végétation (Obaton, 1993). D'autre part, cette méthode présente plusieurs inconvénients :

- Cette méthode ne tient pas compte de la production d'hydrogène par la nitrogénase en présence d'azote gazeux (Schubert et Evans, 1976).
- L'acétylène formée inhibe l'activité de la nitrogénase (Minchin *et al.*, 1983).
- Les mesures sont ponctuelles et effectuées aux alentours du midi solaire lorsque l'activité atteint son maximum. Ces mesures sont souvent extrapolées à l'activité de toute une semaine.
- La quantité d'azote supposée fixée, calculée par cette technique, est toujours très inférieure à la quantité réellement fixée (Ledgard et Steele, 1992). Toutefois, on trouve toujours une bonne corrélation entre les mesures d'ARA et de ^{15}N .

Malgré ces critiques importantes, la méthode de l'ARA reste bien utile pour comparer, pendant le cycle végétatif, l'activité de la nitrogénase chez plusieurs espèces ou sous l'effet de différents traitements. La validité des résultats obtenus a été vérifiée par l'utilisation de la méthode de la dilution isotopique ^{15}N (Rennie et Kemp, 1982).

3.2. Utilisation des isotopes de l'azote

Entre six isotopes connus de l'azote, seuls les isotopes stables ^{14}N et ^{15}N ont été couramment utilisés en biologie. Cette utilisation est possible grâce au fait qu'ils sont stables, d'une durée de vie indéterminée et qu'ils existent dans la nature dans un rapport relativement constant. Ce rapport peut être justement modifié par l'apport de matériel enrichi ou appauvri en ^{15}N .

L'emploi du ^{15}N repose sur des hypothèses valables dans la très grande majorité des expériences entraînant l'emploi d'azote marqué, ces hypothèses sont les suivantes :

- Les éléments complexes (ceux contenant 2 ou 3 isotopes) à l'état naturel, ont une composition isotopique constante.
- Les systèmes vivants ne peuvent discriminer entre un isotope et l'autre (du même élément) qu'avec difficulté.
- L'identité chimique des isotopes est maintenue dans les systèmes biochimiques.

L'emploi du traceur ^{15}N présente certains avantages et inconvénients majeurs.

♣ **Avantages :**

- Isotope non radioactif, stable donc à durée de vie non limitée.
- Possibilité d'emploi au champ avec la commercialisation de composés enrichis ou appauvris en ^{15}N .
- Possibilité de suivre le devenir de l'élément.

♣ **Inconvénients :**

- Le traceur ^{15}N (enrichi) est cher, bien que, du fait de son emploi beaucoup plus fréquent ces dernières années, les tarifs tendent à diminuer.
- L'analyse des échantillons est coûteuse et longue.

Plusieurs méthodes reposant sur l'utilisation de l'isotope ^{15}N ont été développées, nous en évoquerons deux :

- **La dilution isotopique :** le principe de cette technique repose sur la détermination de la part d'azote provenant du sol et assimilée directement par les racines. L'azote total de la légumineuse a comme origine trois sources : l'azote du sol, l'azote apporté par la fertilisation et l'azote provenant de la fixation symbiotique. La proportion de l'azote provenant de la fixation est déterminée selon la méthode de Rennie et Dubetz (1986) qui utilise l'excès atomique déterminé pour la légumineuse et pour la plante de référence. Cet excès atomique est représenté par la différence entre la teneur en ^{15}N de la plante et l'abondance naturelle de ^{15}N

dans l'atmosphère (0,3663%). L'excès atomique sert à déterminer l'efficacité d'utilisation des engrais ainsi que la proportion d'azote provenant de la fertilisation. La proportion d'azote dérivée de la fixation est mesurée après avoir déterminé les proportions d'azote provenant de la fertilisation pour la légumineuse et pour la plante de référence selon les formules présentées en Annexe 10. La dilution de l'isotope ^{15}N est considérée comme la meilleure technique pour quantifier la fixation de l'azote atmosphérique (Bole et Rennie, 1983 ; Rennie, 1979 ; Rennie et Kemp, 1982). L'expérimentation au champ nécessite l'utilisation d'une plante de référence appropriée pour déterminer la part d'azote provenant de l'assimilation (Chalk, 1985). Parmi plusieurs plantes de références non légumineuses testées, l'orge (*Hordeum vulgare*) présente la qualité d'une plante témoin non-fixatrice d'azote (Rennie, 1982). Bien que d'autres graminées puissent être utilisées (dactyle, sorgho) l'orge reste la plante de référence la plus utilisée dans les pays tempérés. McNeill et Wood (1990) ont constaté que l'utilisation de cette méthode permet d'obtenir des valeurs plus élevées et plus précises que celles obtenues par la méthode de la différence de récolte d'azote entre plantes fixatrices et non fixatrices.

- **Abondance naturelle de l'azote ^{15}N** : le principe de cette technique repose sur le fait que la plupart de transformations dans le cycle d'azote montrent une discrimination isotopique induisant un enrichissement de l'azote du sol par rapport à l'azote atmosphérique qui est inerte, inépuisable et stable. La différence entre l'azote du sol et l'azote atmosphérique est de 3 à 10 pour mille. Ainsi, l'azote qui existe dans la plante légumineuse provient de l'azote atmosphérique et de l'azote combiné du sol.

Cette méthode est convenable pour mesurer la fixation biologique d'azote atmosphérique dans les systèmes prairiaux et estimer le transfert de l'azote fixé du trèfle aux graminées (Høgh-Jensen et Schjoerring, 1994). Toutefois, comme dans le cas de la méthode de dilution isotopique, l'utilisation d'une plante de référence convenable est indispensable pour déterminer la part d'azote provenant de l'assimilation (Kerley et Jarvis, 1999).



Fig. 2.3. Prise de mesure de l'ARA au champ.

3.3. Procédure de détermination de l'azote fixé

Parmi les différentes méthodes citées ci-dessus, nous avons utilisé les techniques de l'ARA et de la dilution isotopique de ^{15}N pour déterminer la quantité d'azote fixé.

3.3.1. Activité réductrice de l'acétylène (ARA)

Nous décrivons ici le protocole expérimental utilisé au champ et celui employé en conditions contrôlées.

- **Expériences au champ**

Cette technique a été employée au champ pendant la saison de 1998. Après le semis, un cylindre en PVC (diamètre 15 cm, hauteur 35 cm) entourant quelques plantes en place (6 à 8 plantes) est enfoncé dans le sol (Fig. 2.3). Ce cylindre a été fermé hermétiquement par le dessus à l'aide d'une soucoupe en plastique souple. Un bouchon de caoutchouc est placé dans un orifice de la soucoupe. La prise d'échantillons débute aux alentours du midi solaire. Au travers du bouchon on injecte une quantité d'acétylène assurant un enrichissement de 10 à 20% du volume. Après 30 minutes d'attente destinées à assurer une bonne pénétration de l'acétylène dans le sol jusqu'aux nodosités, des prélèvements sont effectués au travers du bouchon à l'aide d'une seringue hypodermique toutes les 15 minutes pendant une heure. En attendant d'être analysés, les échantillons sont stockés dans des tubes à prélèvement sanguin (Venoject) où un vide partiel préalable a été réalisé. Pour déterminer la quantité d'éthylène formé après réduction de l'acétylène par la nitrogénase, un sous-échantillon de 1 mL est prélevé de ce tube et analysé à l'aide d'un appareil de chromatographie (Model 437, Packard, Meriden, CT, USA) en phase gazeuse à ionisation de flamme. Les caractéristiques de cet appareil sont :

gaz vecteur : azote avec un débit de $40 \text{ mL minute}^{-1}$

colonne : en métal présentant des dimensions de 1,8" x 1,5 m, remplie de Porapak-N, 80-100 mesh.

- **Expériences en conditions contrôlées**

La mesure de l'activité réductrice de l'acétylène est réalisée avant la floraison, dans un système fermé permettant de mesurer l'ARA sur des plantes entières (Fig. 2.4).



Fig. 2.4. Prise de mesures de l'ARA en chambre de culture.

Après injection d'une quantité d'acétylène correspondant à 10% du volume de l'enceinte et de 1 mL d'un marqueur propane (5 mL de propane + 100 mL d'air en surpression dans 569 mL d'air). Un échantillon de 10 mL du mélange gazeux est prélevé à raison d'une mesure toutes les vingt minutes et pendant une heure.

Les échantillons gazeux prélevés pendant la mesure de l'ARA sont analysés à l'aide d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Chrompack, Merck, USA) muni d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne capillaire permet une bonne séparation des trois gaz présents dans l'échantillon. Les gaz sont quantifiés et l'activité réductrice de l'acétylène est exprimée en nanomoles d'éthylène produit par plante par heure.

3.3.2. Dilution isotopique de ^{15}N

- **Expériences au champ**

La technique de dilution isotopique de ^{15}N a été employée afin de déterminer la fixation d'azote par la luzerne. L'azote marqué sous forme de $(^{15}\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$, avec un excès atomique de 9,63%, a été rajouté directement après le semis à raison de 10 kg ha⁻¹ distribués d'une façon homogène. L'engrais marqué a été appliqué sur une micro-parcelle ayant une surface de 1,25 m² dans le premier tiers des parcelles. Dans le cas de la première expérience (1998), ce marquage a concerné toutes les parcelles (traitements inoculé, fertilisé et témoin ainsi que l'orge). Cependant, en 1999, l'azote marqué n'a été appliqué que sur les parcelles des plantes inoculées et des plantes de référence.

Pendant le premier essai au champ (1998), les plantes traitées à ^{15}N ont été échantillonnées uniquement au stade de maturité physiologique. Au cours de l'expérimentation de 1999, en vue d'étudier l'effet des basses températures sur la luzerne annuelle au cours du cycle cultural, nous avons échantillonné les plantes marquées à cinq stades différents. En plus du stade de maturité physiologique, il s'agit des stades : 3 à 5 feuilles, 15 à 17 feuilles, fin de croissance végétative et pleine floraison. Les plantes présentes dans une surface de 0,8 x 0,8 m de la microparcelle ^{15}N (dont la surface totale est de 1,25 m²) ont ainsi été échantillonnées. Les parties aériennes ont été lavées et séchées à 40°C pendant 120 heures. Ces organes ont été ensuite broyés à l'aide d'un broyeur à billes et stockés hermétiquement en attendant les analyses. La teneur en ^{15}N des parties aériennes a été

déterminée à l'aide d'un spectromètre de masse (Finnigan Delta S, ThermoFinnigan, Brême, Allemagne).

La teneur en carbone total et en azote total des organes aériens a été mesurée en utilisant l'autoanalyseur C/N/S Na 1500 Carlo Erba (Carlo Erba Instrumentazione, Milan, Italie).

- **Expériences en conditions contrôlées**

- a - Application de ^{15}N sur les plantes de luzerne :**

Une quantité égale à 14,40 mg de $^{15}\text{N}-(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ (correspondant à 10 kg N ha⁻¹) a été rajouté dans chaque pot. Cette quantité a été apportée en deux applications ; au transfert des plantules dans les pots et au stade 10 feuilles. Le calcul de la quantité d'azote apportée à chaque plante est détaillé dans l'Annexe 9.

- b - Application de ^{15}N sur les plantes de référence :**

Les plantes d'orge, utilisées comme plantes de référence non fixatrices, sont également marquées. Une quantité égale à 10 kg ha⁻¹ de $^{15}\text{N}-(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ (excès atomique de 9,63%) est calculée de la même façon que pour les plantes inoculées. Pour avoir une croissance comparable à celles des plantes de luzerne, une quantité complémentaire de l'ordre de 30 kg de $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ est apportée aux plantes en deux applications.

Afin de déterminer la quantité d'azote fixée par les plantes, la teneur en ^{15}N est déterminée à partir des poudres lyophilisées de chaque plante (les parties aériennes). Les aliquotes sont pesées et la teneur en azote isotopique est mesurée à l'aide d'un spectromètre de masse (Finnigan DeltaS, ThermoFinnigan, Brême, Allemagne).

4. Traitement statistique

Les données obtenues au cours des expériences menées au champs et au cours des deux années ont été traitées par une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) à l'aide du logiciel Genstat (Genstat 5, Lawes Agricultural Trust, Rothampsted Experimental Station, 1998). Une comparaison de moyennes en utilisant le test de la plus petite différence

significative (PPDS) a été ensuite effectuée à l'aide du logiciel Statistica (Version 5, 1995). La différence est considérée significative au seuil de $P < 0,05$.

Le plan expérimental adopté pour les expériences en conditions contrôlées est un plan en randomisation totale. Cependant, pour éliminer toute source d'hétérogénéité dans le phytotron, nous avons déplacé aléatoirement les plantes dans le phytotron après chaque arrosage. Les résultats obtenus sont traités par une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs à l'aide du logiciel Statistica (Version 5, 1995). Une comparaison de moyennes en utilisant le test de la plus petite différence significative (PPDS) est ensuite effectuée pour étudier la différence entre les traitements dans chaque expérimentation. La différence est considérée significative au seuil de $P < 0,05$.

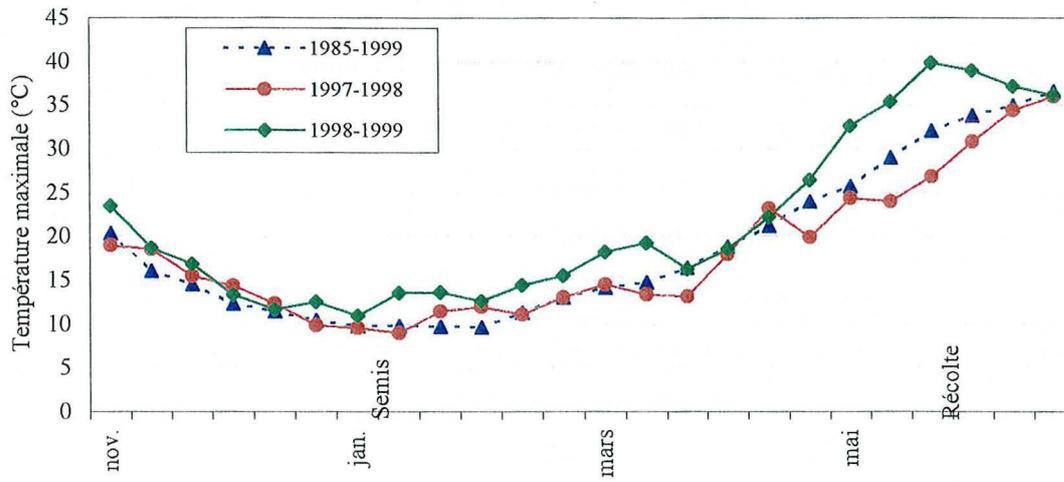
CHAPITRE III

***ETUDE AU CHAMP DE LA CROISSANCE ET DU DEVELOPPEMENT
DE LUZERNES ANNUELLES***

III. ETUDE AU CHAMP DE LA CROISSANCE ET DU DEVELOPPEMENT DE LUZERNES ANNUELLES

Les basses températures d'hiver dans les régions méditerranéennes affectent la croissance et le développement des luzernes annuelles. Notre objectif consiste à étudier l'effet des basses températures sur le cycle de croissance et les stades de développement de deux espèces de luzernes annuelles ainsi que la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique afin de mieux comprendre les incidences du froid sur l'association luzerne-*Sinorhizobium*. Ces investigations sont menées au champ et en conditions contrôlées. Dans ce chapitre nous présenterons les résultats des essais effectués au champ et nous discuterons ensuite ces résultats.

Dans un premier temps, nous commencerons par examiner les conditions climatiques enregistrées au champ sur le site expérimental de l'ICARDA. Ensuite, nous présenterons les résultats concernant la morphologie des plantes et leur cycle de développement. L'objectif de ces essais consiste à étudier la croissance des plantes, les caractéristiques des nodosités et la quantité d'azote provenant de la fixation symbiotique chez des luzernes annuelles en vue de trouver des associations luzernes annuelles-*Sinorhizobium* capables de croître et de fixer l'azote pendant la saison froide.



1. Conditions climatiques

Afin de suivre l'effet des conditions climatiques sur la croissance et la fixation d'azote chez les luzernes annuelles, nous avons relevé la température du sol et la pluviométrie pendant les hivers 1997/1998 et 1998/1999 correspondant à la première et la deuxième saison de suivis.

1.1. Température du sol à 10 cm de profondeur

Le suivi des températures minimales du sol à 10 cm de profondeur nous fournit des renseignements sur l'impact des températures sur le fonctionnement racinaire et sur la fixation d'azote. Elle constitue un facteur limitant important étant donné que dans cette zone du sol se trouvent localisées la majeure partie des nodosités. Ainsi, cette température peut affecter la fixation d'azote en affectant la formation des nodosités et l'activité du *Sinorhizobium* (Roughley et Date, 1986).

En 1998, la température minimale du sol a oscillé entre 6 et 12°C pendant la période froide (décembre jusqu'au mars) alors qu'elle a varié entre 6 et 23°C pour la saison de croissance (Fig. 3.1). En 1999, la température minimale du sol a été relativement supérieure à celle enregistrée en 1998. Elle a varié entre 9 et 15°C pendant la période froide et entre 9 et 27°C pour la saison de croissance.

1.2. Pluviométrie

Les précipitations enregistrées pendant l'hiver de 1997/1998 ont été considérablement supérieures à celles rapportées en 1998/1999 et à la moyenne de 15 ans (Fig. 3.2). La somme des précipitations depuis octobre 1997 jusqu'au juin 1998 a été de 414 mm contre 308 mm pour la même période de la saison 1998/1999. La moyenne de 15 ans est de 324 mm. Depuis octobre 1997 jusqu'au semis (au 6 janvier), les pluies ont représenté 175 mm contre 153 mm pour la période précédant le semis (20 janvier) de la saison suivante. Pour les deux années, les précipitations ont commencé le 27 septembre 1997 et le 11 novembre 1998, respectivement.

Pendant la période de croissance (entre le semis et la récolte), les plantes ont reçu plus de pluies pendant la saison 1997/1998 par rapport à la saison 1998/1999 (240 mm et 155 mm, respectivement). Les pluies ont été réparties sur toute la période de croissance pendant la saison de pluies de 1997/1998 où les dernières pluies ont été enregistrées au 20 mai 1998.

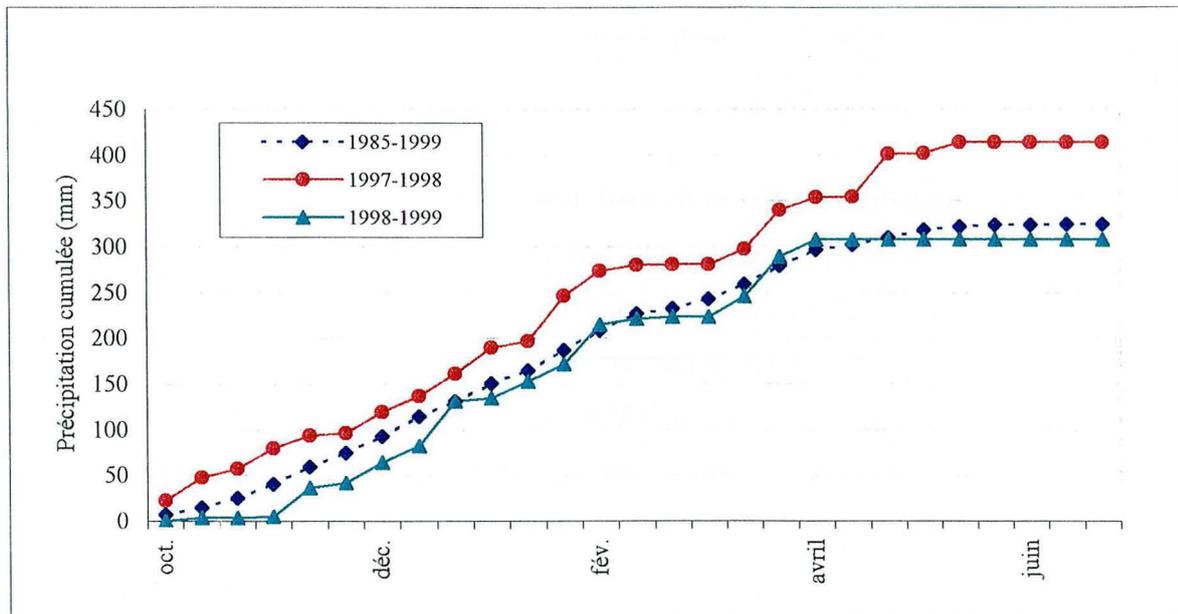


Fig. 3.2. Précipitation annuelle cumulée enregistrée pendant les saisons de culture 1997/1998 et 1998/1999 et la moyenne de 15 ans.

Cependant, la saison de pluies de 1998/1999 a été plus courte et les dernières précipitations ont été signalées au 7 avril 1999. Les périodes de sécheresse ont été fréquentes pendant cette saison. Le mois de novembre 1998 a été particulièrement sec alors que le mois de janvier a connu une période de sécheresse entre le 18 et le 27. La période de sécheresse la plus longue et la plus critique pour la croissance a été enregistrée entre le 4 février et le 19 mars.

2. Morphologie et cycle du développement des luzernes annuelles

2.1. Stades de développement

Il convient de faire un rappel des écotypes et des traitements étudiés au cours de ce travail. Les lettres A, B et R désignent respectivement les écotypes *M. aculeata* 80, *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716. Le traitement (I) représente les plantes inoculées avec une souche bactérienne (différentes souches selon les écotypes) fixatrice d'azote alors que le traitement fertilisé (F) désigne les plantes recevant un apport de 90 kg N ha⁻¹. Le traitement témoin (T) définit les plantes non inoculées et non fertilisées. Ce traitement sert à comparer les résultats des plantes soumises à l'effet de l'inoculation ou à celui de la fertilisation avec des plantes dépourvues d'azote. Les traitements des trois espèces étudiées ont montré des durées variables pour atteindre les différents stades de croissance. De plus, une différence du rythme de croissance a été observée entre les deux années. Les résultats sont détaillés pour chaque stade de développement.

2.1.1. Germination

Les différents traitements n'ont pas eu d'effet sur la germination des plantes. C'est pourquoi nous avons représenté les résultats concernant la germination en confondant les trois traitements de chaque écototype. La Figure 3.3 montre le nombre de jours nécessaires pour que 50% des semences de chaque écototype germent. Nos résultats indiquent que, pendant les deux saisons, l'écotype *M. rigidula* (R) a été le plus rapide à germer alors que l'écotype *M. aculeata* 80 (A) a nécessité le plus de temps pour atteindre la germination. L'écotype *M. aculeata* 5099 (B) présente un temps intermédiaire. Les différences entre ces trois écotypes ont été significatives ($P < 0,05$) pendant les deux saisons. Cependant, il convient de remarquer que tous les écotypes ont germé plus tôt en 1999 par rapport à l'année précédente. En effet, l'écotype R a nécessité 13 jours pour germer en 1998 contre 11 jours en 1999. De même, les écotypes B et A ont nécessité respectivement 17 et 21 jours en 1998 contre 13 et 16 jours en 1999.

Tableau 3.1. Nombre de jours (après l'ensemencement) nécessaires pour atteindre les différents stades de croissance pour les associations luzerne-*Sinorhizobium* en 1998 et 1999 à Tel Hadya (Syrie).

	5-7 Feuilles		Floraison		Formation de gousses	
	1998	1999	1998	1999	1998	1999
AI	51 ab*	36 b	111 abc	104 b	145 a	118 b
AF	49 ab	33 c	118 a	107 a	149 a	121 a
AT	53 a	39 a	113 ab	99 c	138 a	114 c
BI	44 bc	22 f	98 de	88 ef	129 a	106 e
BF	40 c	21 g	101 de	90 e	132 a	111 d
BT	45 bc	23 f	94 e	88 f	126 a	98 f
RI	47 abc	26 e	105 bcd	95 d	131 a	113 cd
RF	41 c	24 f	111 ab	98 c	141 a	117 b
RT	48 ab	28 d	102 cde	90 e	129 a	108 e
Effet Ecotype	***	***	***	***	NS	***
Effet Source d'azote	*	***	*	***	NS	***

A : *M. aculeata* écotype 80, B : *M. aculeata* écotype 5099 et R : *M. rigidula* écotype 716. I : traitement inoculé, F : traitement fertilisé et T : témoin. L'effet des facteurs étudiés est déterminé après analyse de variance (NS : non significatif, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$).

* Dans une colonne, les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de la PPDS ($P < 0,05$).

2.1.2. Réalisation du stade 5-7 feuilles

Les feuilles 5 à 7 sont émises du même nœud et au même moment. Que ce soit en 1998 ou en 1999, l'écotype B a été le premier à atteindre le stade 5-7 feuilles suivi par les écotypes R et A, respectivement (Tableau 3.1). Toutefois, les différences entre B et R et entre R et A ne sont pas significatives ($P < 0,05$). Alors que le rythme d'apparition foliaire est identique pour les différents traitements au niveau des quatre premières feuilles, des différences au niveau de la date d'apparition des feuilles ont été observées au stade 5-7 feuilles. Ce stade est important parce que nous avons observé que la croissance des plantes s'accélère à partir de ce stade. En effet, nous avons trouvé que ce stade de 5-7 feuilles a été atteint en premier par le traitement F puis par I et T, respectivement. En 1998 et pour les écotypes B, R et A, respectivement, le traitement F a nécessité 40, 41 et 49 jours contre 44, 47 et 51 jours pour I et 45, 48 et 53 jours pour T. La même tendance a été observée durant l'année suivante mais, par rapport à 1998, les temps nécessaires pour atteindre ce stade ont été systématiquement plus courts.

2.1.3. Floraison

Le temps nécessaire pour arriver au stade de la floraison a été systématiquement plus court en 1999 par rapport à 1998. D'autre part, les trois écotypes étudiés ont différencié dans le nombre de jours nécessaires pour atteindre ce stade. Les différences entre les écotypes que nous avons observées lors du stade 5-7 feuilles sont devenues significatives au moment de la floraison. A titre d'exemple, en 1998 les traitements de l'écotype B ont pris en moyenne 98 jours pour atteindre ce stade contre 106 et 114 jours pour les traitements des écotypes R et A, respectivement (Tableau 3.1). La même tendance a été observée au cours de l'année suivante.

L'effet du traitement sur le temps nécessaire pour atteindre la floraison est différent d'une année à l'autre. Cet effet s'est montré faible en 1998 et nous pouvons constater que les différences entre les trois traitements au sein de chaque écotype ne sont pas significatives. Par exemple, le traitement inoculé (I) de l'écotype B a nécessité 98 jours contre 94 et 101 jours pour les traitements témoin (T) et fertilisé (F) du même écotype. Le même type de résultats est observé pour les autres écotypes avec un nombre de jours décroissant dans l'ordre $F > I > T$. Cependant, en 1999 les différences entre les traitements au sein des écotypes A et R ont été significatives tout en présentant le même ordre de vitesse de développement que celui observé

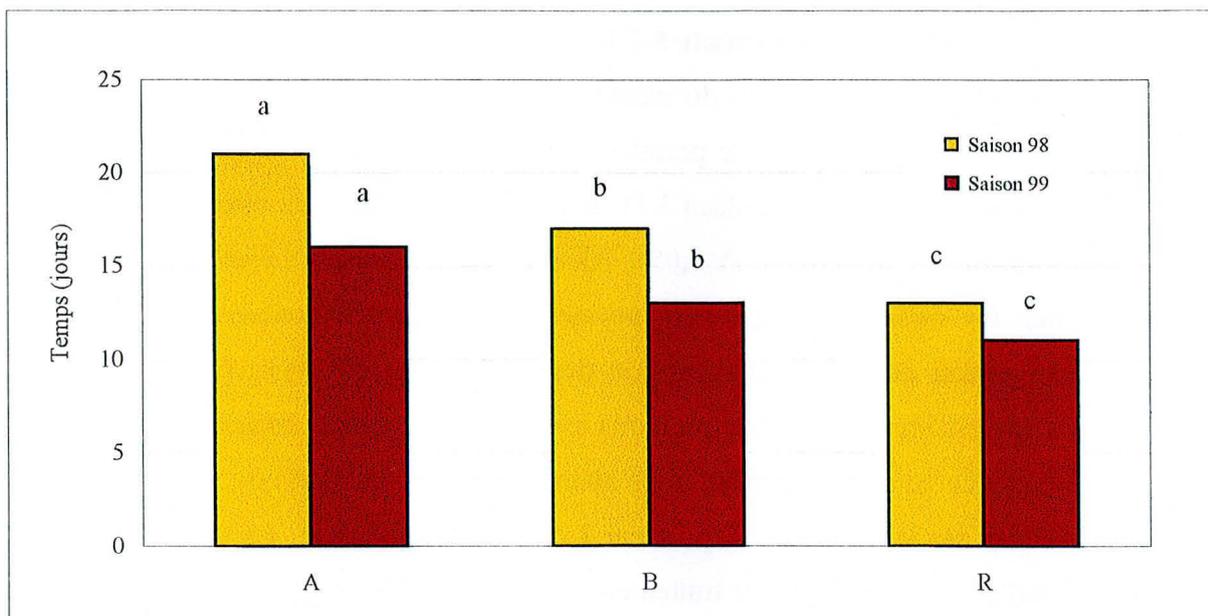


Fig. 3.3. Temps (jours) nécessaire pour que 50% des graines germent pour les trois écotypes cultivés en 1998 et 1999 à Tel Hadya (Syrie). Pour ce graphique et les graphiques suivants, la comparaison statistique est effectuée entre toutes les histogrammes ou courbes.

en 1998. Pour l'écotype B, l'effet de l'inoculation n'a pas été significatif alors que le traitement T a été significativement inférieur au traitement F.

2.1.4. Formation de gousses

Comme dans le cas du stade de floraison, le temps nécessaire pour atteindre le stade de formation des gousses a été plus court durant l'année 1999 par rapport à l'année précédente. Durant la saison de 1998, les divers traitements ont atteint ce stade dans le même ordre que celui observé au cours des stades précédents. L'écotype B a été le premier à atteindre le stade de formation de gousses. Les traitements de cet écototype ont nécessité entre 126 et 132 jours contre 129 à 141 pour l'écotype R et 138 à 149 pour l'écotype A (Tableau 3.1). Néanmoins, les différences entre les écotypes ne sont pas significatives. En revanche, ces différences sont statistiquement significatives au cours de l'année 1999. Nous observons ainsi que l'écotype B précède significativement les autres écotypes au niveau de la formation de gousses. Selon les traitements, cet écototype met entre 98 et 111 jours pour arriver à ce stade alors que pour l'écotype R il faut 108 à 117 jours et pour l'écotype A de 114 à 121 jours.

Pendant la première année de l'essai, les différents traitements n'ont pas eu d'effet significatif sur le temps nécessaire pour arriver au stade de la formation de gousses. Cependant, la formation des gousses semble retardé par la présence de l'azote (par fertilisation ou inoculation) en 1999. Pour l'écotype B, l'arrivée au stade formation de gousses pour le traitement (I) a pris 106 jours contre 98 et 111 jours respectivement pour les traitements T et F du même écototype

2.2. Surface foliaire

Nous avons effectué un premier échantillonnage à la fin de la période froide (fin de phase de croissance végétative) pour déterminer l'effet des basses températures hivernales sur la surface foliaire et la production de matière sèche. Un deuxième échantillonnage a été réalisé à la maturité physiologique.

2.2.1. Période froide

Cet échantillonnage réalisé à la fin de la phase de croissance végétative, reflète la croissance hivernale des écotypes étudiés. La comparaison de ces trois écotypes montre que l'écotype A présente une surface foliaire inférieure à celle des deux autres écotypes. En 1998,

Tableau 3.2. Surface foliaire (m² m⁻²) produite à la fin de la période froide et à la fin du printemps pour les associations luzerne-*Sinorhizobium* en 1998 et 1999 à Tel Hadya (Syrie).

	Fin de la période froide (Période végétative)		Fin du printemps (Maturité physiologique)	
	1998	1999	1998	1999
AI	0,71 cd*	0,94 de	1,50 e	1,89 de
AF	1,02 bc	1,38 bc	2,38 d	2,34 cd
AT	0,61 d	0,84 e	1,29 e	1,72 e
BI	1,39 a	1,41 b	3,36 bc	2,62 bc
BF	1,46 a	1,70 a	4,3 a	3,56 a
BT	0,88 bcd	0,84 e	2,48 d	2,57 c
RI	1,12 b	1,16 cd	3,61 b	3,16 b
RF	1,56 a	1,70 a	4,73 a	3,99 a
RT	0,94 bc	0,95 de	2,93 cd	2,34 cd
Effet Ecotype	***	***	***	***
Effet Source d'azote	***	**	***	***

A : *M. aculeata* écotype 80, B : *M. aculeata* écotype 5099 et R : *M. rigidula* écotype 716.

I : traitement inoculé, F : traitement fertilisé et T : témoin. L'effet des facteurs étudiés est déterminé après analyse de variance (NS : non significatif, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$).

* Dans une colonne, les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de la PPDS ($P < 0,05$).

le traitement fertilisé (F) de l'écotype A a produit une surface foliaire significativement inférieure aux deux autres écotypes fertilisés (de l'ordre de $1,02 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$ par rapport à $1,46$ et $1,56 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$ pour les écotypes B et R, respectivement) (Tableau 3.2). Le même résultat est observé en 1999 bien que les valeurs de la surface foliaire au premier échantillonnage ont été généralement plus élevées pendant l'année 1999 par rapport à la première saison.

L'inoculation (traitement I) a eu un effet stimulateur sur la surface foliaire surtout en 1998 (Tableau 3.2). L'inoculation de l'écotype B s'est traduite par une augmentation significative de la surface foliaire par rapport au témoin. Cet effet stimulateur a été d'autant plus fort en 1998 que le traitement inoculé (I) a présenté une surface foliaire identique à celle du traitement fertilisé (F). Cependant, pour les écotypes A et R les valeurs de surface foliaire des traitements I et T n'étaient pas significativement différentes, aussi bien en 1998 qu'en 1999.

2.2.2. Fin du printemps

Cet échantillonnage a été réalisé au stade de maturité physiologique qui est atteint en fin de printemps, 20 jours avant la récolte. L'écotype R présente la surface foliaire la plus élevée, suivi de près par l'écotype B. L'écotype A a développé le moins de surface foliaire. A titre d'exemple, le traitement F de l'écotype R a présenté en 1998 une surface foliaire $4,7 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$ contre $4,3$ et $2,4 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$ pour les écotypes B et A, respectivement. La même tendance a été observée en 1999 mais les valeurs des écotypes R et B enregistrées cette année ont été inférieures à celles observées l'année précédente (Tableau 3.2).

On note que le traitement F a exercé l'effet le plus marqué sur la surface foliaire. L'augmentation de la surface foliaire provoquée par la fertilisation est nette chez tous les écotypes. Par rapport au traitement témoin, cette augmentation est de l'ordre de 84 , 74 et 62% respectivement chez les écotypes A, B et R cultivés en 1998. De même, en 1999, la fertilisation induit une augmentation de la surface foliaire de 36 , 39 et 70% par rapport au traitement T pour A, B et R, respectivement.

2.3. Production de la matière sèche

La production de matière sèche (MS) a été plus importante en deuxième année. Ce phénomène concorde avec la température plus élevée enregistrée en 1999. Nous avons mesuré

Tableau 3.3. Matière sèche (kg ha⁻¹) dans les parties aériennes produite à la fin de la période froide et à la fin du printemps pour les associations luzerne-*Sinorhizobium* en 1998 et 1999 à Tel Hadya (Syrie).

	Accumulation de matière sèche (kg ha ⁻¹)			
	Fin de la période froide (Période végétative)		Fin du printemps (Maturité physiologique)	
	1998	1999	1998	1999
AI	401 fg*	476 de	2021 f	2531 e
AF	611 cde	663 bc	2652 ef	3504 bc
AT	343 g	377 e	1799 f	2096 f
BI	743 abc	757 b	3420 cd	3110 cd
BF	841 a	985 a	4485 a	4224 a
BT	499 ef	566 cd	2870 de	2730 de
RI	663 bcd	715 b	4290 ab	3706 b
RF	808 ab	779 b	4930 a	4239 a
RT	547 def	504 d	3730 bc	2810 de
Effet Ecotype	***	***	***	***
Effet Source d'azote	***	***	***	***

A : *M. aculeata* écotype 80, B : *M. aculeata* écotype 5099 et R : *M. rigidula* écotype 716.

I : traitement inoculé, F : traitement fertilisé et T : témoin. L'effet des facteurs étudiés est déterminé après analyse de variance (NS : non significatif, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$).

* Dans une colonne, les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de la PPDS ($P < 0,05$).

la production de matière sèche sur des surfaces de $0,25 \text{ m}^2$ de chaque parcelle (surface totale de 16 m^2). La matière sèche produite a été initialement exprimée en g m^{-2} et ramenée ensuite en kg ha^{-1} afin de donner une indication de production à l'échelle agronomique.

2.3.1. Période froide

A la fin du mois de mars, l'écotype B a montré le plus fort potentiel d'accumulation de matière sèche. Ceci a été particulièrement remarquable en 1999 où le traitement F de cet écotype a produit une biomasse sèche de 985 kg ha^{-1} contre 779 kg ha^{-1} pour le même traitement de l'écotype R (Tableau 3.3). L'écotype A présente la plus faible production (663 kg ha^{-1}). Si l'on compare les traitements témoins, nous constatons qu'en 1998 l'écotype R dépasse légèrement l'écotype B et la différence entre les deux écotypes n'est pas significative. Cependant, le traitement témoin de l'écotype A est significativement inférieur aux traitements T des deux autres écotypes.

L'inoculation a amélioré la production de la matière sèche surtout dans le cas de l'écotype B. Le traitement I de l'écotype B a produit pendant la première année (1998) 50% de biomasse de plus que le traitement témoin et 38% en 1999. Pour l'écotype R, l'augmentation de production induite par l'inoculation en 1998 et 1999 a représenté 21 et 42% par rapport au traitement témoin de l'écotype R. L'augmentation de la biomasse chez le traitement I de l'écotype A a été la moins forte parmi les écotypes. Le traitement I de cet écotype a enregistré une augmentation de la biomasse de 17 et 21% par rapport au traitement T en 1998 et 1999, respectivement. Cependant, les différences entre ces deux traitements ne sont pas significatives.

2.3.2. Fin du printemps

Concernant les écotypes, la tendance observée à la fin du printemps est similaire à celle que nous avons remarquée au premier échantillonnage (fin de la période froide). En 1998, l'écotype R a montré une production de matière sèche légèrement supérieure à celle de B et largement supérieure à celle observée pour l'écotype A. Le traitement F de l'écotype R a produit $4930 \text{ kg MS ha}^{-1}$ par rapport à 4480 et 2650 kg ha^{-1} pour le même traitement des écotypes B et A (Tableau 3.3). La différence entre le traitement F des écotypes R et B n'est pas significative alors que la biomasse produite par le traitement F de l'écotype A est significativement inférieure à celle produite par les autres écotypes. En 1999, la production de

Tableau 3.4. Nombre de jours nécessaires pour la formation de la première nodosité chez les trois écotypes étudiés pour les saisons 1998 et 1999 à Tel Hadya (Syrie).

<u>Nombre de jours nécessaires pour la formation de la première nodosité</u>		
	1998	1999
AI	32 c*	23 c
AF	39 a	32 a
AT	37 ab	30 a
BI	24 d	17 d
BF	34 bc	21 c
BT	32 c	20 c
RI	26 d	17 d
RF	38 ab	26 b
RT	34 bc	21 c
Effet Ecotype	***	***
Effet Source d'azote	***	***

A : *M. aculeata* écotype 80, B : *M. aculeata* écotype 5099 et R : *M. rigidula* écotype 716. I : traitement inoculé, F : traitement fertilisé et T : témoin. L'effet des facteurs étudiés est déterminé après analyse de variance (NS : non significatif, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$). * Dans une colonne, les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de la PPDS ($P < 0,05$).

matière sèche a augmenté par rapport au même stade de l'année précédente. Le traitement F de l'écotype A a produit 3500 kg MS ha⁻¹ contre 4220 et 4240 kg ha⁻¹ pour le même traitement des écotypes B et R.

L'inoculation a exercé l'effet le plus fort en terme de production de matière sèche sur l'écotype R. Que ce soit en 1998 ou en 1999, la biomasse sèche du traitement I a été très proche de celle produite par le traitement F. En 1998, cette biomasse des traitements I et F de l'écotype R est de l'ordre de 4290 et 4930 kg ha⁻¹ par rapport à 3700 et 4240 kg ha⁻¹ pour les mêmes traitements en 1999. Pour les autres traitements, l'effet de l'inoculation a été intermédiaire entre le traitement F et le traitement T.

En conclusion, nous avons observé un effet stimulateur de la fertilisation et de l'inoculation qui accélère la croissance et retarde la floraison et la formation des gousses allongeant ainsi le cycle de croissance végétatif (Fig. 3.4 et 3.5). Cet effet a été accompagné d'une augmentation de la production de matière sèche notamment pendant la période froide. L'écotype *M. aculeata* 5099 a présenté les meilleures performances en terme de production de matière sèche pendant la période froide alors que *M. rigidula* 716 a été le plus performant à partir du printemps.

3. Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique

Nous avons suivi la formation des nodosités pour connaître leur aptitude à fixer l'azote pendant les premiers stades de croissance. La fixation d'azote atmosphérique nécessite une formation rapide des nodosités en nombre suffisant avec une bonne distribution de ces nodosités sur la racine principale. L'efficacité de ces nodosités se traduit par la quantité d'azote fixée par hectare.

3.1. Temps nécessaire pour la formation des nodosités

Nous avons suivi la nodulation au champ chez les trois traitements de chaque écotype. Nous avons pu observer des nodosités chez les traitements témoins et fertilisés, ce qui révèle l'existence de souches de *Sinorhizobium* endogènes ayant colonisé les racines ou de contamination entre parcelles après le semis (dus à ruissellement d'eau, animaux, etc...). Cependant, le traitement I a formé des nodosités plus rapidement que les autres traitements.

Tableau 3.5. Echelle de notation des nodosités (d'après Corbin *et al.*, 1977) pour les différents traitements cultivés pendant 1998 et 1999 à Tel Hadya (Syrie).

	Echelle de notation des nodosités	
	1998	1999
AI	2 bc [*]	2 b
AF	1 d	1 c
AT	1 d	1 c
BI	4 a	4 a
BF	1 d	2 bc
BT	2 d	1 c
RI	3 b	4 a
RF	2 cd	2 bc
RT	1 d	1 c
Effet Ecotype	NS	**
Effet Source d'azote	***	***

A : *M. aculeata* écotype 80, B : *M. aculeata* écotype 5099 et R : *M. rigidula* écotype 716. I : traitement inoculé, F : traitement fertilisé et T : témoin. L'effet des facteurs étudiés est déterminé après analyse de variance (NS : non significatif, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$). * Dans une colonne, les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de la PPDS ($P < 0,05$).

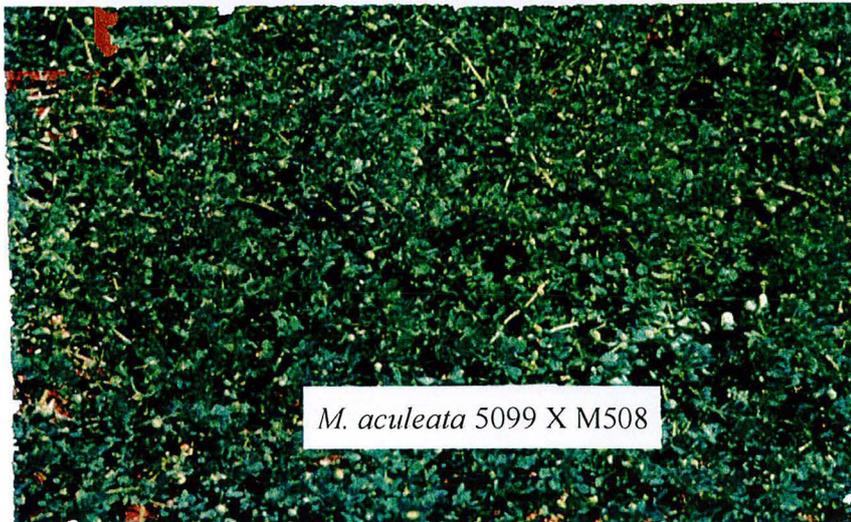
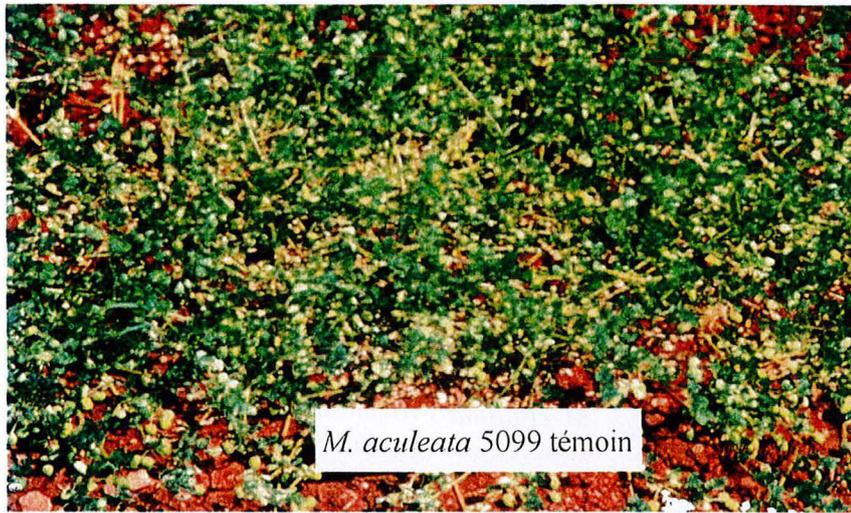


Fig. 3.4. Effet de l'inoculation par la souche de *Sinorhizobium meliloti* M508 sur la croissance de *M. aculeata* 5099 par rapport au témoin non inoculé.

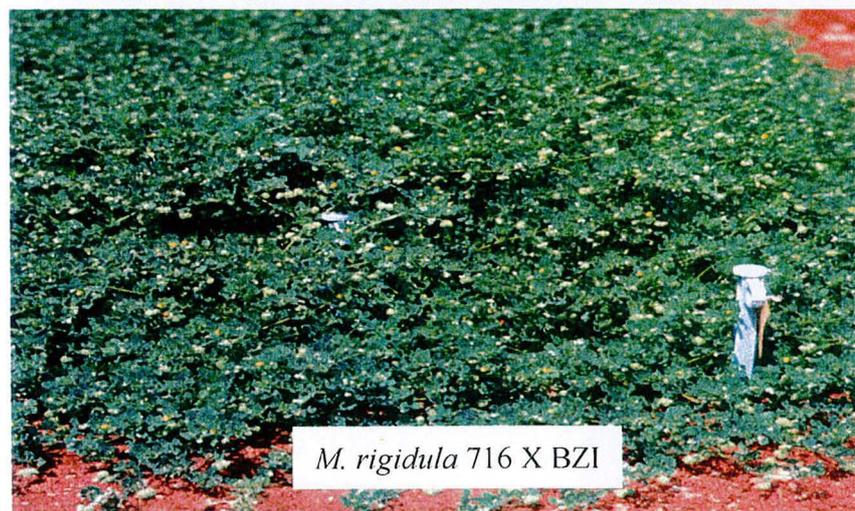
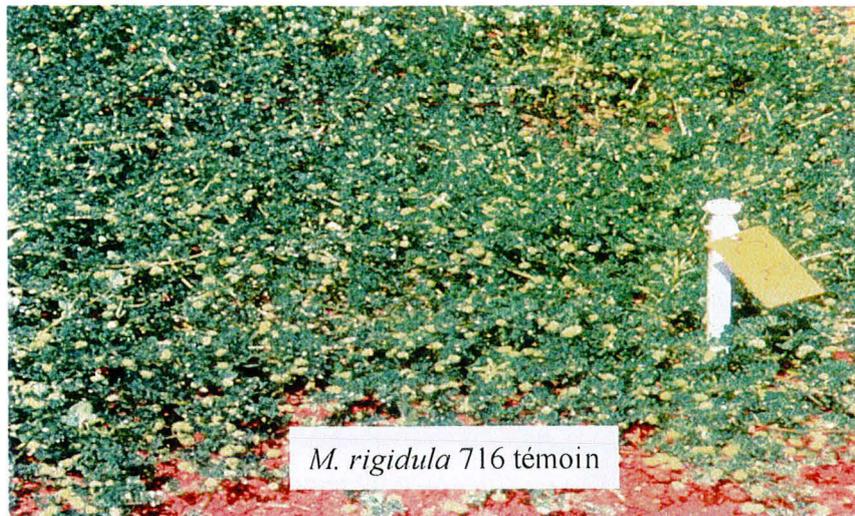


Fig. 3.5. Effet de l'inoculation par la souche de *Sinorhizobium meliloti* BZI sur la croissance de *M. rigidula* 716 par rapport au témoin non inoculé.

Ces nodosités présentent des valeurs élevées sur l'échelle de notation des nodosités que nous avons adoptée (Tableau 3.4).

L'association B est le plus rapide à former des nodosités suivi de R et de A (la différence entre ces deux associations a généralement été non significative). En 1998, le traitement T de l'écotype B a pris 32 jours pour former des nodosités contre 34 et 37 jours pour le même traitement des associations R et A. En 1999, la formation de nodosités a été plus rapide pour toutes les associations. Le traitement T a formé des nodosités au bout de 20, 21 et 30 jours pour les associations B, R et A, respectivement.

L'inoculation a significativement accéléré la formation de nodosités chez les trois associations et pendant les deux saisons. Pour la saison 1998, par rapport aux traitements F et T, cet effet de l'inoculation a réduit le temps nécessaire pour former les nodosités de 5-7 jours pour l'écotype A, 8-10 jours pour l'écotype B et 8-12 jours pour l'écotype R. En 1999, la nodulation a nécessité une à deux semaines de moins que pour l'année 1998. Cette formation rapide des nodosités en 1999 a été remarquée surtout dans le cas de l'association B où la différence entre le traitement inoculé et les autres traitements n'a pas dépassé 4 jours. Pour les associations R et A, la différence entre le traitement I et les autres traitements est de l'ordre de 4-9 jours pour le premier écotype et 7-9 jours pour le deuxième.

3.2. Nombre et distribution des nodosités

L'échelle de notation des nodosités (de 0 à 5) sert à classer les nodosités selon leur nombre et distribution (Corbin *et al.*, 1977). Cette échelle ne prend en compte que les nodosités efficaces qui sont de couleur rose et sous forme lobée.

Les associations ont généralement les mêmes valeurs sur l'échelle de notation des nodosités avec une légère supériorité dans le cas des associations B et R (Tableau 3.5). Les traitements témoins et fertilisés des 3 écotypes étudiés présentent des valeurs de 1 à 2 sur cette échelle. L'effet de l'inoculation apparaît au niveau de ce paramètre où nous observons une large différence significative entre le traitement inoculé et les traitements non inoculés. Les nodosités formées par le traitement inoculé de l'écotype B présentent des nodosités de très bonnes caractéristiques (valeur de 4 sur l'échelle de notation). Le traitement I de l'écotype R possède des nodosités présentant des valeurs élevées (valeurs de 3 en 1998 et 4 en 1999) sur

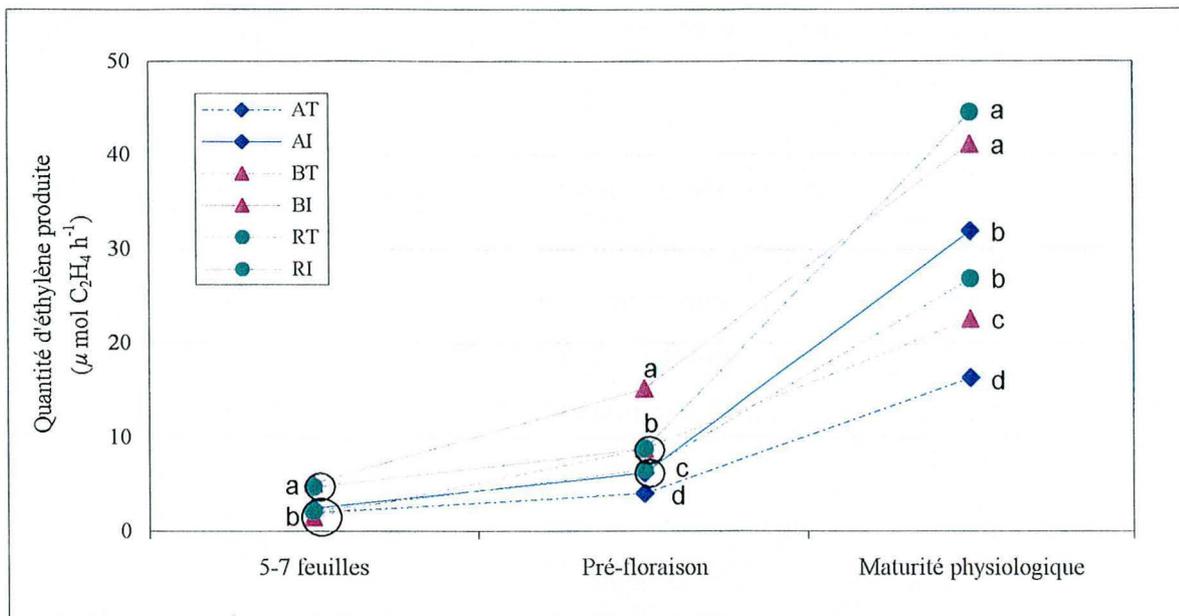


Fig. 3.6. Quantité d'éthylène produite par les traitements inoculés (I) et témoins (T) des écotypes *M. aculeata* 80 (A), *M. aculeata* 5099 (B) et *M. rigidula* 716 (R) à trois stades de développement lors d'un essai au champ en 1998 à Tel-Hadya (syrie).

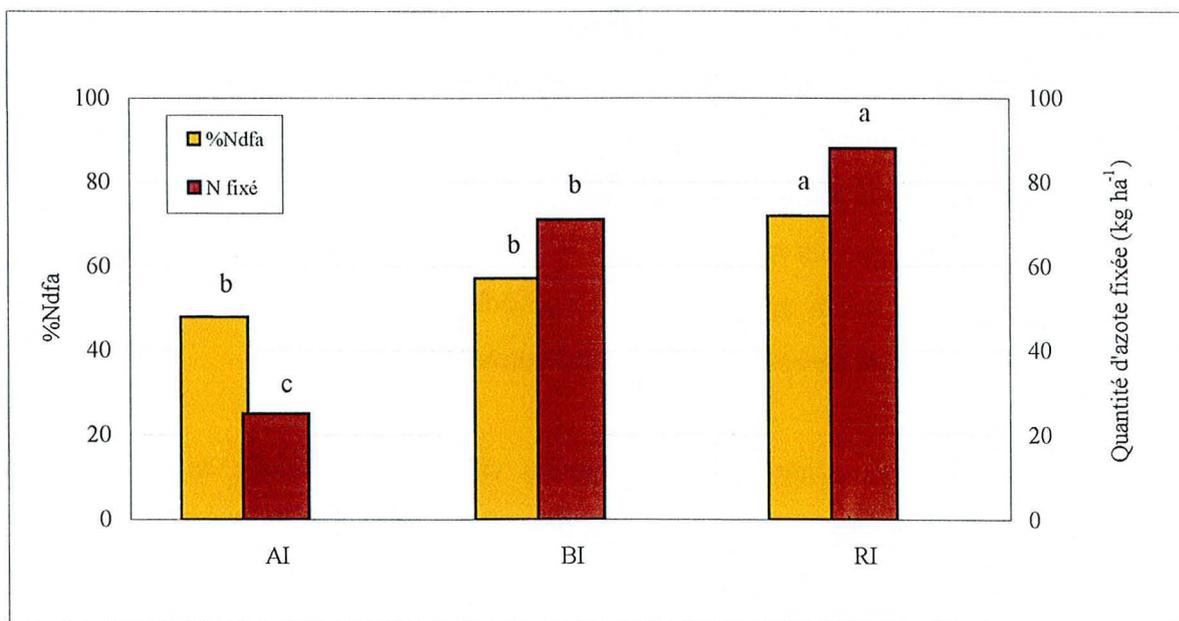


Fig. 3.7. Quantité d'azote fixée et proportion d'azote provenant de la fixation (%Ndfa) à la maturité physiologique pour les trois associations cultivées en 1998 à Tel Hadya (Syrie).

l'échelle de notation alors que l'inoculation de l'écotype A se traduit par des nodosités de faibles valeurs sur cette échelle (valeur de 2).

3.3. Mesures de la fixation de l'azote atmosphérique

La fixation d'azote est mesurée en utilisant la méthode de la dilution isotopique alors que la technique de l'ARA a été employée pour étudier l'activité des nodosités. Pendant la première année (1998), nous avons utilisé les deux méthodes simultanément. Cependant, nous avons décidé de ne pas utiliser la méthode de l'ARA en 1999 du fait de sa lourdeur (difficile à appliquer au champ) et de sa faible précision. Par conséquent, en 1999 nous avons étudié la fixation symbiotique uniquement à l'aide de la méthode de la dilution isotopique.

3.3.1. Activité nitrogénase

Nous présentons les résultats des prélèvements de l'activité réductrice d'acétylène effectués aux stades 5-7 feuilles, pré-floraison (fin de la période froide) et maturité physiologique, qui représentent des stades clés dans le cycle de croissance.

Les deux associations B et R ont généralement présenté des valeurs comparables de production d'éthylène, plus élevées que celles de l'écotype A (Fig. 3.6). Au stade 5-7 feuilles, le traitement inoculé de l'écotype B a produit $5,1 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ plante}^{-1} \text{ h}^{-1}$ par rapport à $4,7$ et $2,4 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ plante}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour les plantes inoculées des écotypes R et A. Pour les plantes témoins nous n'avons pas remarqué de différence entre les écotypes. La différence entre le traitement I de l'écotype B et les autres associations est devenue significative à la fin de la période froide (stade pré-floraison). Cette association a produit $15 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ plante}^{-1} \text{ h}^{-1}$ par rapport à $8,8$ et $6,2 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ plante}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour les associations R et A, respectivement. La production d'éthylène a augmenté notablement entre les stades pré-floraison et maturité physiologique. Les traitements inoculés (écotypes B et R) présentent des valeurs significatives par rapport aux autres traitements. On peut également noter que l'accroissement de l'ARA pour RI est plus fort que dans le cas de BI entre les deux stades concernés.

L'effet de l'inoculation a été net à tous les stades étudiés et pour tous les écotypes. Pour les écotypes R, B et A, les traitements témoins ont produit $26,8$, $22,5$ et $16,3 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ plante}^{-1} \text{ h}^{-1}$ par rapport à $44,5$, $41,1$ et $31,9 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ plante}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour les traitements inoculés.

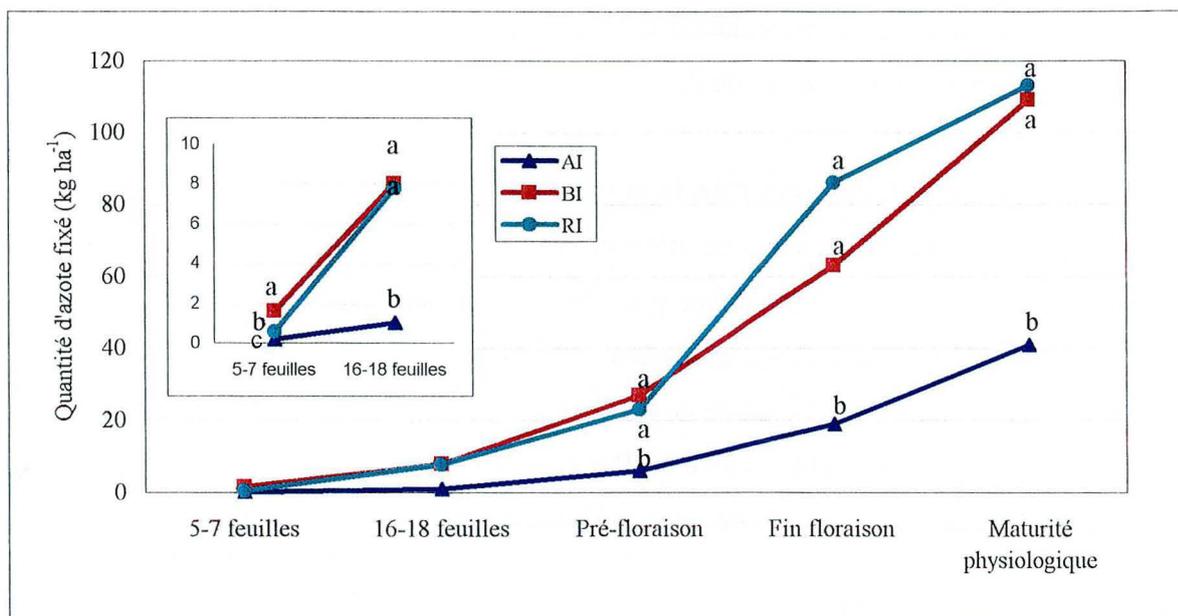


Fig. 3.8. Quantité d'azote fixé à différents stades de culture pour les associations étudiées en 1999 à Tel Hadya (Syrie).

3.3.2. Utilisation de la méthode de dilution isotopique (^{15}N)

Nous avons mesuré en 1998 la fixation de l'azote chez tous les traitements dans le but de déterminer la fixation d'azote chez les traitements inoculés et de vérifier les capacités fixatrices des traitements non inoculés (traitements F et T) issues des souches autochtones. Ces mesures ont montré que la fixation d'azote chez les deux traitements non inoculés a été très faible, c'est pourquoi nous avons décidé de ne pas reproduire les mesures sur ces deux traitements en 1999.

Les résultats obtenus au cours de la première expérimentation (1998) présentés dans cette partie concernent les traitements inoculés. La proportion d'azote atmosphérique fixée par le traitement I de l'écotype R (association RI), par rapport à l'azote total, a été significativement supérieure à celle fixée par le même traitement des associations BI et AI (Fig. 3.7). Alors que cette proportion représente 72% de l'azote total chez l'association RI, elle est de l'ordre de 57 et 48% de l'azote total chez les associations BI et AI, respectivement. De même, la quantité totale de l'azote fixé chez l'association RI dépasse significativement celle fixée par les associations BI et AI (Fig.3.7). Cette quantité est de l'ordre de 88 kg ha^{-1} chez l'association RI contre 71 et 25 kg ha^{-1} pour les associations BI et AI, respectivement.

En 1999, nous avons déterminé la fixation d'azote atmosphérique uniquement chez les traitements inoculés à 5 stades de développement afin de suivre finement l'évolution de la capacité fixatrice des associations (Fig. 3.8). Au premier stade (correspondant à 5 feuilles), l'association BI a fixé une quantité égale à $1,6 \text{ kg N ha}^{-1}$, par rapport à $0,6$ et $0,2 \text{ kg N ha}^{-1}$ pour les associations RI et AI, respectivement (Tableau 3.6). Par rapport à la quantité totale d'azote retrouvée dans la plante, la proportion d'azote provenant de la fixation atteint chez l'association BI 56% de l'azote total contre 10% et 35% pour les associations AI et RI, respectivement (Tableau 3.6). Toutefois, la différence entre les proportions enregistrées pour les associations BI et AI n'a pas été significative. Egalement, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les associations AI et RI.

Au deuxième stade de développement (15 à 17 feuilles), l'association RI a fixé autant d'azote que l'association BI. La quantité d'azote produite par la première association augmente pour atteindre $7,8 \text{ kg N ha}^{-1}$ alors que l'association BI a fixé 8 kg N ha^{-1} .

Tableau 3.6. Quantité totale d'azote retrouvé dans la plante, quantité d'azote fixé et proportion d'azote provenant de la fixation (%Ndfa) à différents stades de développement pour la saison 1999 à Tel Hadya (Syrie).

Stade de développement	5-7 Feuilles	16-18 Feuilles	Pré-floraison	Fin floraison	Maturité physiologique
<u>N total retrouvé dans la plante (kg ha⁻¹)</u>					
AI	2 bc*	7 b	17 b	30 b	66 b
BI	3 a	14 a	38 a	87 a	129 a
RI	2 c	13 ab	35 a	104 a	129 a
<u>N fixé (kg ha⁻¹)</u>					
AI	0,2 a	1,0 b	6,1 b	19 b	41 b
BI	1,6 b	8,0 a	27 a	63 a	109 a
RI	0,6 c	7,8 a	23 a	86 a	113 a
<u>Proportion d'azote provenant de la fixation (%Ndfa)</u>					
AI	10 c	14 b	33 b	62 c	62 b
BI	56 a	58 a	72 a	71 b	85 a
RI	35 b	63 a	67 a	83 a	87 a

AI : *M. aculeata* 80 x souche M620, BI : *M. aculeata* 5099 x souche M508 et RI : *M. rigidula* 716 x souche BZI. * Dans une colonne, les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de la PPDS ($P < 0,05$).

L'association AI n'a fixé à ce stade qu' 1 kg N ha^{-1} . En même temps, la proportion d'azote provenant de la fixation a augmenté chez l'association RI pour dépasser légèrement celle observée dans le cas de l'association BI, alors que la proportion remarquable chez l'association AI a diminué fortement, ce qui s'est traduit par la faible quantité d'azote fixée. Respectivement, les associations RI, BI et AI ont des proportions de 63%, 58% et 14% de l'azote total.

Les résultats obtenus au stade pré-floraison (troisième stade de développement) montrent une allure semblable à celle que nous venons de décrire pour le stade précédent. La proportion enregistrée pour l'association BI a augmenté plus fortement que celle de l'association RI mais les valeurs de ces deux associations sont restées proches et significativement non différentes (72% et 67%, respectivement). La proportion signalée dans le cas de l'association AI a augmenté à nouveau pour représenter 33% de l'azote total fixé. Conformément aux proportions observées, la quantité d'azote fixée par l'association BI demeure supérieure à celle des deux autres associations bien qu'elle ne soit pas statistiquement différente de celle de l'association RI. Les associations BI, RI et AI ont respectivement produit 27, 23 et 6 kg N ha^{-1} via la fixation symbiotique.

Nous avons observé une amélioration de la proportion d'azote provenant de la fixation chez les associations RI et AI à la fin floraison (quatrième stade de développement). Cette proportion chez l'association RI devient supérieure à BI et représente 83%, 71% et 62% de l'azote total fixé chez les associations RI, BI et AI, respectivement. Les différences entre les trois associations se révèlent significatives. Au niveau des quantités fixées, nous observons que la quantité d'azote fixé a été multipliée par trois à quatre dans le cas des associations AI et RI pour atteindre 19 et 86 kg N ha^{-1} , respectivement. Cependant, la quantité d'azote fixé par l'association BI a augmenté à un rythme moins fort pour représenter 63 kg N ha^{-1} au stade fin floraison. Néanmoins, la différence entre les associations RI et BI n'a pas été significative alors que la quantité fixée par AI a été significativement inférieure à celle produite par les autres associations.

A maturité physiologique (cinquième stade de développement), la proportion d'azote provenant de la fixation augmente chez l'association BI par rapport au stade précédent. Les associations RI et BI possèdent des proportions équivalentes de l'ordre de 87% et 85%,

respectivement. Tout comme l'association RI, la proportion d'azote provenant de la fixation chez l'association AI n'évolue pas entre le quatrième et le cinquième stade. Cette proportion demeure à 62% de l'azote total et reste significativement inférieure aux autres associations. Toutefois, la quantité d'azote fixée par cette même association a plus que doublée entre les deux derniers stades. A maturité physiologique, elle représente 41 kg N ha⁻¹ contre 109 et 113 kg N ha⁻¹ pour les associations BI et RI. Toutefois, les valeurs des deux dernières associations ne sont pas statistiquement différentes.

La quantité d'azote fixé pendant la période froide a été supérieure chez l'écotype *M. aculeata* 5099 par rapport aux autres écotypes. A la maturité physiologique l'écotype *M. rigidula* 716 a légèrement précédé *M. aculeata* 5099 grâce à son bon comportement au printemps. Ces deux écotypes ont présenté une fixation symbiotique comparable en 1999.

4. Discussion

Les conditions climatiques ont été très contrastées entre les deux années d'expérimentation. Alors que l'hiver de l'année 1998 était classique et représentatif de la saison froide de cette région, les températures enregistrées en 1999 étaient plus élevées que la moyenne et les précipitations plus faibles.

Les écotypes étudiés ont montré une vitesse de développement donnant le classement suivant : B (le plus précoce) > R > A (le moins précoce). L'écotype B (*M. aculeata* 5099) a formé des feuilles plus rapidement que les autres écotypes étudiés. Par conséquent, cet écotype est arrivé au stade de formation de gousses (en 1998) 2 à 9 jours plus tôt que l'écotype R (*M. rigidula* 716) et 12 à 17 jours plus tôt que l'écotype A (*M. aculeata* 80). Le développement des plantes a été plus rapide en 1999 qu'en 1998. A titre d'exemple, le traitement témoin de l'écotype *M. aculeata* 5099 a formé des gousses 28 jours plus tôt en 1999 qu'en 1998. La même tendance a été observée chez tous les traitements et écotypes.

Cette accélération du rythme de développement pendant l'hiver en 1999 a été obtenue grâce aux températures plus élevées par rapport à la saison précédente. Une autre raison responsable de ce raccourcissement du cycle de végétation est le semis tardif et la quantité

d'eau disponible dans le sol en 1999, du fait des faibles précipitations hivernales pendant cette année. Le manque d'eau a ainsi provoqué une maturation plus rapide.

Pendant la période froide, la production de matière sèche a été supérieure en 1999. Les écotypes ont un comportement différent pour leur capacité de production et l'écotype *M. aculeata* 5099 a été le plus performant à la fin de l'hiver avec une production de biomasse sèche de 743 kg ha⁻¹ en 1998. Cependant, l'écotype *M. rigidula* 716 possède une très bonne croissance au printemps, ce qui amène à une production de 4930 kg MS ha⁻¹ à la maturité physiologique en 1998. L'écotype *M. aculeata* 80 a été le seul à profiter jusqu'à la maturité physiologique des températures élevées observées en 1999. L'augmentation de la production de la matière sèche chez tous les traitements de cet écotype à la fin de la période froide en 1999 par rapport à l'année précédente montre que cet écotype est sensible aux basses températures (prédominantes en 1998).

Le développement rapide et l'élaboration de matière sèche aux premiers stades de croissance pendant l'hiver constituent un atout important en vue de réduire le déficit des ressources fourragères pendant cette période. Ainsi, l'association de *M. aculeata* 5099 avec la souche M508 permet un meilleur pâturage plus précoce que les deux autres associations. En plus de cet avantage de précocité, l'écotype *M. aculeata* 5099 se caractérise par une croissance érigée, ce qui peut faciliter le pâturage par les ovins.

Nos résultats concernant le développement et la production de biomasse confirment ceux obtenus par Obaton *et al.* (1996) qui ont comparé lors d'un essai au champ, sur le site de l'ICARDA, la germination et la production de biomasse sèche chez plusieurs écotypes de luzernes annuelles. Ces auteurs ont montré que la germination de *M. aculeata* 5099 était plus rapide que celle de *M. rigidula* 716 et *M. aculeata* 80. De plus, ils ont trouvé qu'après 63 jours de culture (soit au 23 février), l'écotype *M. aculeata* 5099 a produit 48 mg MS plante⁻¹ alors que *M. rigidula* 716 n'a produit que 42 mg MS plante⁻¹.

Un effet net de la fertilisation a été observé chez les trois écotypes et pendant les deux années. L'engrais azoté a accéléré l'initiation des feuilles mais retardé la floraison et la formation des gousses suite à la modification du programme morphogénétique par la fertilisation azotée. Néanmoins, le traitement inoculé a nécessité un temps identique au

traitement fertilisé pour atteindre les stades floraison et formation des gousses. Ainsi, l'azote minéral et l'azote atmosphérique fixé ont rallongé la phase de croissance végétative et retardé la maturité. Ces résultats concordent avec ceux d'Eckard et Franks (1998) qui ont montré que l'apport d'azote rallonge la période de repousse et la production de matière sèche chez le ray-grass pérenne et le trèfle blanc. D'autre part, l'engrais azoté exerce un effet plus marqué que l'inoculation sur la biomasse au stade 5-7 feuilles et la surface foliaire. Ceci peut être dû à plusieurs raisons :

- Une moins grande sensibilité au froid de la nitratre réductase des feuilles que de la nitrogénase des nodosités. En effet, la fixation d'azote n'est pas limitée par la photosynthèse (Drevon *et al.*, 1988) mais plutôt par l'utilisation du carbone dans les nodosités (Vance et Heichel, 1991), ou par la demande en azote des plantes (Hartwig *et al.*, 1994).
- Une présence brève du soleil pendant la période froide peut augmenter la température des feuilles (siège de la réduction du nitrate) alors que les nodosités restent soumises à une température basse. Dans les pays méditerranéens, le ciel en hiver se caractérise par des éclaircies fréquentes et de bonnes périodes d'ensoleillement.
- Une mauvaise adaptation des souches de *Sinorhizobium* à des températures basses. Il pourrait être intéressant d'effectuer un criblage de nombreuses souches de *Sinorhizobium* pour tester leur aptitude à la fixation d'azote sous basses températures.

L'inoculation apparaît nécessaire et intéressante puisque tous les paramètres s'en trouvent améliorés. Une augmentation du rendement en matière sèche d'environ 20% a été enregistrée chez les plantes inoculées des trois écotypes par rapport aux plantes témoins. La proportion d'azote provenant de la fixation a été de l'ordre de 85 à 87% pour *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716 en 1999. Ces valeurs sont relativement élevées par rapport aux données de la littérature. Pour *M. truncatula*, Papastilianou (1987) a rapporté des proportions d'azote provenant de la fixation symbiotique comprises entre 50 et 70% selon les précipitations. Nos valeurs élevées reflètent soit une association particulièrement efficace soit une surévaluation de la fixation liée à la méthode de mesure (du fait notamment de la plante de référence utilisée (orge) pour la méthodologie ^{15}N) ou par une minéralisation ou une teneur en azote très faible dans ces sols.

Les données bibliographiques relatives à la quantité d'azote fixé chez les écotypes de médics sont rares. Il existe cependant des résultats concernant d'autres luzernes annuelles telle que *M. truncatula*. Lors d'un essai au champ sur deux ans à Chypre, Papastilianou (1987) a rapporté que la quantité d'azote fixé chez cette espèce a oscillé entre 85 et 101 kg N ha⁻¹ selon l'année et la méthode de détermination utilisée. De même, Butler (1988) a montré qu'une culture de *M. littoralis* en Australie Méridionale à climat méditerranéen a fixé 102 kg N ha⁻¹ an⁻¹. Les valeurs concernant les quantités d'azote fixé que nous avons observées chez *M. rigidula* 716 et *M. aculeata* 5099 se situent dans cette fourchette.

Les quantités d'azote fixé sont ainsi évaluées à 109-113 kg N ha⁻¹ pour les deux écotypes *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716. Ces valeurs élevées confèrent une importance majeure à la fixation symbiotique, notamment en vue de l'implantation des écotypes de médics concernés dans des zones de parcours de l'arrière pays. En effet, dans ces régions, les éleveurs (essentiellement des bédouins) pour des raisons économiques et techniques n'apportent jamais d'engrais.

L'importance des souches de *Sinorhizobium* spécifiques aux divers écotypes a été mise en évidence également par Materon et Ryan (1995). Ces auteurs ont montré que grâce à la présence de *Sinorhizobium* indigène spécifique, les plantes de *M. rigidula* 716 non inoculées ont produit plus de biomasse sèche que des plantes fertilisées (taux équivalent à 137 kg N ha⁻¹) ou inoculées avec des souches inefficaces de *Sinorhizobium*.

Outre les plantes inoculées, les traitements témoins ont également porté des nodosités. Nos essais ne permettent pas de dire si ces nodosités sont formées par des souches autochtones du sol (peu nombreuses et peu fixatrices) ou formées par des contaminations à partir des parcelles inoculées. Ceci pourrait être vérifié en utilisant des souches de *Sinorhizobium* repérables (résistantes à des doses élevées d'antibiotique ou utilisation de techniques d'immunofluorescence, par exemple). Lors d'un essai en conditions contrôlées à l'ICARDA, Materon et Ryan (1995) ont signalé qu'il existe dans le sol des souches de *Sinorhizobium* efficaces et spécifiques des espèces de médics qu'ils ont étudiés (*M. rigidula*, entre autres). Il convient toutefois de rappeler que pour diminuer les chances de trouver ces souches autochtones nous avons conduit notre essai sur un champ expérimental à pente faible

qui n'avait pas été cultivé avec des légumineuses depuis 15 ans. Par ailleurs, nous avons respecté un espacement entre les parcelles afin d'éviter les contaminations.

Les basses températures ont négativement affecté la formation des nodosités, en effet leur formation a été plus rapide en 1999 qu'en 1998. Ce résultat concorde avec les observations de Zhang et Smith (1994) qui ont trouvé un effet dépressif du froid sur la formation des nodosités. Ils ont signalé que les basses températures au niveau des racines inhibent considérablement les processus d'infection et de formation des nodosités.

Ce retard de la nodulation observé pendant la saison 1998 s'est répercuté sur la fixation d'azote. Ainsi, la proportion d'azote provenant de la fixation a augmenté notablement en 1999 par rapport à 1998 suite à l'accroissement de la température. L'amélioration de la proportion d'azote provenant de la fixation et surtout de la quantité d'azote fixé a augmenté la production de matière sèche notamment pendant la période froide, ce qui assure une production fourragère satisfaisante sans avoir recours aux engrais.

Par rapport au témoin, l'inoculation a davantage augmenté la quantité de matière sèche à la fin de l'hiver chez *M. aculeata* 5099 (42%) que chez les autres associations hôte-souche. Ceci montre que l'écotype *M. aculeata* 5099 et la souche M508 représentent une association prometteuse à développer en zone froide. Ce résultat très positif est confirmé par l'analyse des courbes de l'ARA et par la méthode ^{15}N . Les résultats de l'ARA montrent en effet une activité appréciable lors de l'hiver 1998 chez l'écotype *M. aculeata* 5099. Alors que pour *M. aculeata* 80, l'ARA reste significativement inférieure aux autres écotypes jusqu'au troisième prélèvement. Il en est de même pour les résultats de l'analyse ^{15}N en 1999. Il existe donc une variabilité au niveau de la fixation en hiver, et les différences observées peuvent être importantes.

On note ainsi que *M. aculeata* 5099 est toujours supérieur à *M. aculeata* 80 sur le plan de la fixation symbiotique et la production de la matière sèche. Ceci indique qu'il existe une variation génétique marquée au sein de cette espèce. Ces deux écotypes de *M. aculeata* sont probablement génétiquement éloignés puisque les gousses de l'écotype 80 portent des épines et celles de l'écotype 5099 sont inermes. Un large criblage d'écotypes de luzernes, pour la résistance au froid et pour la fixation de l'azote, devrait donc être effectué.

M. aculeata 5099 suivi par *M. rigidula* 716 ont présenté le rythme d'apparition foliaire le plus élevé pendant les deux années. Pour de nombreux paramètres étudiés, *M. aculeata* 5099 a montré la meilleure performance pendant la période froide, mais finalement l'écotype *M. rigidula* 716 a présenté le meilleur rendement grâce à sa bonne croissance au printemps. Toutefois, ces écotypes ont présenté des différences au niveau de la proportion d'azote provenant de la fixation, ce qui suggère que seules les souches utilisées pour l'inoculation (et pas la surface foliaire ni la photosynthèse) ont induit la différence au niveau de la fixation d'azote. La souche BZI utilisée pour l'écotype *M. rigidula* 716 a amélioré sa performance lorsque les températures ont augmenté et a présenté les valeurs les plus élevées au niveau de la fixation d'azote aux deux saisons et particulièrement à la première. Concernant la souche BZI, Gintzburger (1994) a rapporté que la performance de cette souche est satisfaisante sous conditions froides dans le sud de la France. De même, la variabilité au niveau des capacités fixatrices entre les souches d'origine différente a été mise en évidence par Ek-Jander et Fåhraeus (1971). Ces auteurs ont montré que sous basses températures, les souches isolées du nord de la Scandinavie sont capables de former plus de nodosités que les souches originaires du sud de la Scandinavie.

En conclusion, nous observons sur le plan de la précocité de développement un meilleur comportement de *M. aculeata* 5099. Cette association est capable d'effectuer une fixation d'azote pendant l'hiver et d'assurer une production de fourrage pendant la période froide. Cet aspect mérite cependant des travaux complémentaires en vue notamment de trouver des souches de *Sinorhizobium* plus tolérantes au froid. Une autre solution en vue d'améliorer le système consiste à réaliser un ensemencement plus tôt dans la saison en fonction des précipitations (octobre-novembre) afin d'assurer l'infection des racines par le *Sinorhizobium* ce qui permet une bonne croissance et une bonne installation avant l'hiver. Les plantes ainsi implantées sont susceptibles de profiter au mieux des phases d'ensoleillement et des remontées de température à la sortie de l'hiver. Zhang et Smith (1994) montrent que la fixation de l'azote atmosphérique peut avoir lieu 6 jours plus vite lorsque les plantes sont soumises à 25°C pendant 12 heures avant d'être cultivées à 15°C.

En ce qui concerne *M. rigidula* 716, on observe un très bon comportement hivernal et printanier. L'inoculation de cet écotype avec la souche BZI présente une bonne performance

notamment lorsque les températures remontent. Ce constat reproduit également les observations réalisées dans le sud de la France montrant de bonnes performances de *M. rigidula* 716 associé à la souche BZI en conditions froides (Gintzburger, 1994).

CHAPITRE IV

*ETUDE EN CONDITIONS CONTRÔLÉES DE LA CROISSANCE
ET DU DEVELOPPEMENT DE LUZERNES ANNUELLES*

IV. ETUDE EN CONDITIONS CONTRÔLÉES DE LA CROISSANCE ET DU DÉVELOPPEMENT DE LUZERNES ANNUELLES

Les essais en conditions contrôlées ont été effectués au Laboratoire Agronomie et Environnement de l'ENSAIA. Un premier objectif de ces essais consiste à étudier et à comparer le comportement de trois écotypes de luzernes annuelles (*Medicago aculeata* 80, *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716) cultivés en pots sous basses températures en vue de trouver les associations présentant la meilleure performance dans ces conditions. Il s'agit d'étudier le développement et la croissance ainsi que la fixation d'azote chez des plantes, cultivées à 9 et 7°C, et inoculées par deux souches différentes de *Sinorhizobium*. La plus basse température a été choisie parce que l'infection des racines par les *Sinorhizobium* n'a pas lieu en dessous de 7°C (Gibson, 1971). Le deuxième objectif est de tester la température comme seul facteur afin de valider les résultats obtenus au champ en observant la phase de germination et de développement des plantes jusqu'au stade 5-7 feuilles.

Nous avons effectué deux essais, lors du premier nous avons étudié les écotypes *Medicago aculeata* 80 et *M. aculeata* 5099 alors que dans le deuxième essai nous avons comparé les écotypes *M. aculeata* 80 et *M. rigidula* 716. Lors des essais au champ, nous avons remarqué que l'écotype *M. aculeata* 5099 présente la meilleure performance en termes de production de biomasse sèche et fixation d'azote pendant la période froide. Nous voulions donc confirmer la performance de cet écotype et identifier la meilleure association avec les souches de *Sinorhizobium*.

1. Premier essai

Nous avons étudié l'apparition foliaire et la production de la matière sèche. Nous avons également mesuré la fixation de l'azote atmosphérique et déterminé l'azote total des végétaux. Nous allons comparer ces paramètres chez les plantes cultivées à 9 et à 7°C. Dans cette étude, nous avons comparé des associations médics-*Sinorhizobium* contrastées. Les souches utilisées pour inoculer l'écotype *M. aculeata* 5099 sont M508 et M620. Pour *M. aculeata* 80, les souches utilisées sont M53 et M620. Pour les deux essais, les souches du traitement I1 sont isolées des régions assez froides, testées et recommandées par l'ICARDA comme les souches les plus performantes en association.

Tableau 4.1. Temps (jours) après le repiquage nécessaire pour atteindre les stades foliaires à 9 et à 7°C pour les différents traitements des écotypes *M. aculeata* 5099 (B) et *M. aculeata* 80 (A) lors du premier essai.

Stade foliaire		Temps (jours)				
		1	2	3	4	5-7
9°C	BF	13 b*	21 d	25 c	29 f	33 e
	BI1	13 b	20 e	26 c	31 e	35 d
	BI2	13 b	22 c	31 b	38 b	41 b
7°C	BF	16 a	26 b	30 b	33 d	36 d
	BI1	16 a	26 b	32 ab	36 c	37 c
	BI2	16 a	28 a	34 a	40 a	43 a
Effet Température		***	***	***	***	***
Effet Source d'azote		NS	***	***	***	*
Température X Source d'azote		NS	NS	NS	NS	NS
9°C	AF	19 b	24 d	32 e	41 d	46 d
	AI1	19 b	26 c	34 d	43 c	49 c
	AI2	18 b	28 b	37 c	45 b	51 b
7°C	AF	22 a	34 a	40 b	43 c	49 c
	AI1	22 a	34 a	39 b	46 b	51 b
	AI2	22 a	34 a	44 a	49 a	53 a
Effet Température		***	***	***	***	***
Effet Source d'azote		NS	***	***	***	***
Température X Source d'azote		NS	*	*	NS	NS

Pour l'écotype B, les traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche M508), I2 (inoculé par la souche M620). Pour l'écotype A, les traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche M53) et I2 (inoculé par la souche M620). L'effet des facteurs étudiés est déterminé après analyse de variance (NS : non significatif, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$). * Pour un écotype, les moyennes suivies par la même lettre dans une colonne ne sont pas significativement différentes selon le test de la PPDS ($P < 0,05$).

1.1. Apparition foliaire

L'apparition foliaire a été suivie pour déterminer la vitesse de développement des deux écotypes de luzernes annuelles étudiés. Le cultivar *M. aculeata* 5099 (B) a été plus précoce que le cultivar *M. aculeata* 80 (A). En ce qui concerne l'apparition de la première feuille chez le traitement fertilisé (F), de l'écotype B a nécessité 13 et 16 jours pour les plantes cultivées à 9 et à 7°C, respectivement ; alors que le traitement F de l'écotype A a pris 19 et 22 jours (Tableau 4.1). Cette précocité a été notée chez l'écotype B jusqu'à la fin de la culture au stade 5-7 feuilles. Le traitement F de l'écotype B a atteint ce stade 33 et 36 jours après le repiquage pour les plantes cultivées à 9 et à 7°C par rapport à 46 et 49 jours pour l'écotype A.

Des rythmes de développement différents entre les traitements ont été observés dès le stade 2 feuilles chez les deux écotypes A et B. Pour l'écotype A cultivé à 9°C, le traitement F a formé 2 feuilles à l'âge de 24 jours contre 26 et 28 jours pour les traitements I1 et I2. Nous n'avons pas observé de différence de développement entre les plantes de cet écotpe disposées à 7°C. Pour l'écotype B, le traitement I1 a été le premier à atteindre le stade 2 feuilles (à l'âge de 20 jours) parmi les traitements cultivés à 9°C. Pour les plantes placées à 7°C, les traitements F et I1 ont présenté un rythme de développement identique et plus rapide que celui du traitement I2.

Au stade 3 feuilles, des différences de développement sont apparues entre les traitements de l'écotype A cultivés à 7°C. Le traitement I2 atteint ce stade avec 4 à 5 jours de retard par rapport aux autres traitements. Toujours pour l'écotype A, le traitement F présente un rythme de développement significativement plus rapide que les autres traitements à partir du stade 2 feuilles pour les plantes cultivées à 9°C et du stade 4 feuilles pour celles subissant 7°C. Les plantes de ce traitement atteignent le stade 5-7 feuilles 3 à 5 jours plus tôt que les autres traitements dans le cas des plantes croissant à 9°C et 2 à 4 jours pour celles cultivées à 7°C. Cette précocité du traitement F est également notée dans le cas de l'écotype B à partir du stade 3 feuilles. Les plantes fertilisées cultivées à 9°C atteignent le stade 5-7 feuilles à l'âge de 33 jours par rapport à 35 et 41 jours respectivement pour les traitements I1 et I2. Concernant les plantes de l'écotype B cultivées à 7°C, le traitement F a nécessité pour atteindre le stade 5-7 feuilles 36 jours contre 37 et 43 jours pour les traitements I1 et I2, respectivement.

Il convient de remarquer que les deux souches utilisées pour l'inoculation n'ont pas eu le même effet sur le rythme de développement. L'écotype B inoculé par la souche M508 (II) a présenté un rythme de développement plus rapide que celui inoculé avec la souche M620 (traitement I2), quelle que soit la température ambiante. Une différence significative s'est établie entre ces deux traitements dès le stade 2 feuilles. Le traitement I1 a atteint le stade 5-7 feuilles avec 6 jours d'avance par rapport au traitement I2. Pour l'écotype A, le traitement inoculé par la souche M53 (I1) a atteint le stade 5-7 feuilles 2 jours avant le traitement inoculé par la souche M620 (I2).

L'effet de la température a été très net chez les deux écotypes. Pour l'écotype B, les plantes cultivées à 7°C ont formé la première feuille avec 3 jours de retard par rapport à celles croissant à 9°C. Ce retard observé chez les plantes disposées à 7°C a persisté jusqu'au stade 5-7 feuilles. La basse température (7°C) a exercé le même effet sur les plantes de l'écotype A. Les plantes cultivées sous cette température ont présenté un retard de 2 à 3 jours par rapport à celles cultivées à 9°C.

L'écotype *M. aculeata* 5099 (B) a présenté un rythme de développement plus rapide que celui de l'écotype *M. aculeata* 80 (A). Jusqu'au stade 5-7 feuilles, le traitement fertilisé a généralement précédé les autres traitements suivi par I1 et I2. Les différentes souches n'induisent pas le même effet sur le développement des plantes. Les plantes placées à 7°C ont atteint les différents stades 2 à 3 jours plus tard que celles cultivées à 9°C.

1.2. Production de la matière sèche

La production de la matière sèche a été déterminée à deux âges : à 63 jours et à 98 jours après le semis. Ces deux âges correspondent aux stades "16-18 feuilles" et "pré-floraison" chez les plantes cultivées au champ.

1.2.1. Premier échantillonnage

Il est important de noter que l'écotype B a systématiquement produit une biomasse supérieure à celle de l'écotype A. Pour les plantes cultivées à 9°C, les traitements de l'écotype B ont généralement présenté une biomasse supérieure de l'ordre de 50% à celle des

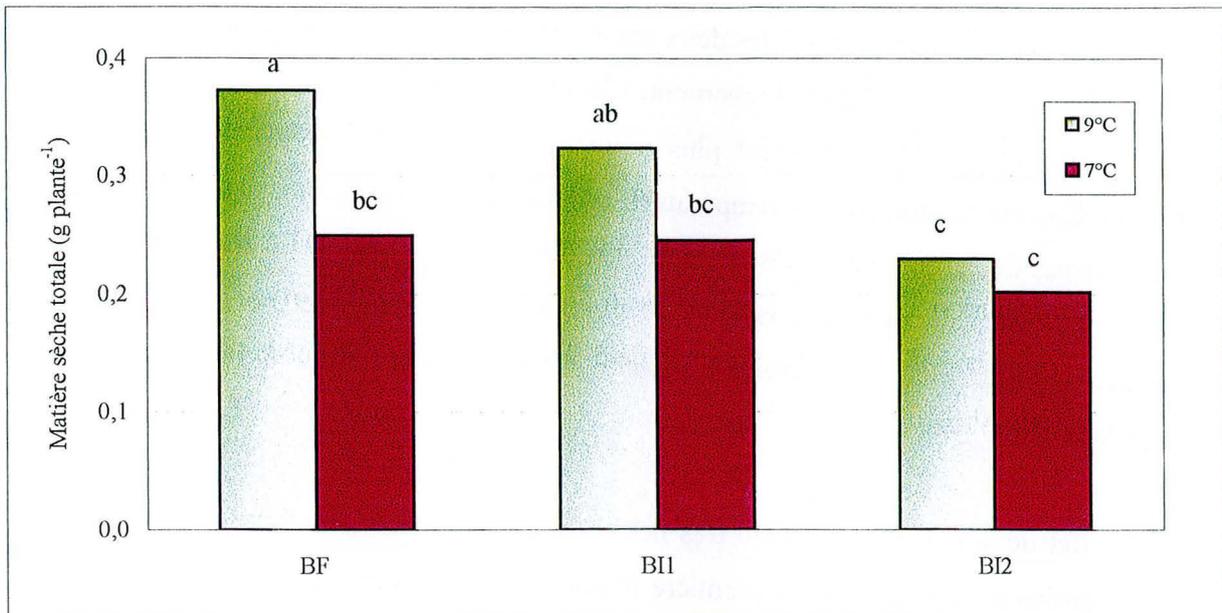


Figure 4.1. Matière sèche produite au premier échantillonnage du premier essai par les différents traitements de l'écotype *M. aculeata* 5099 (B). Ces traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche M508) et I2 (inoculé par la souche M620). Pour ce graphique et les graphiques suivants, la comparaison statistique est effectuée entre tous les histogrammes.

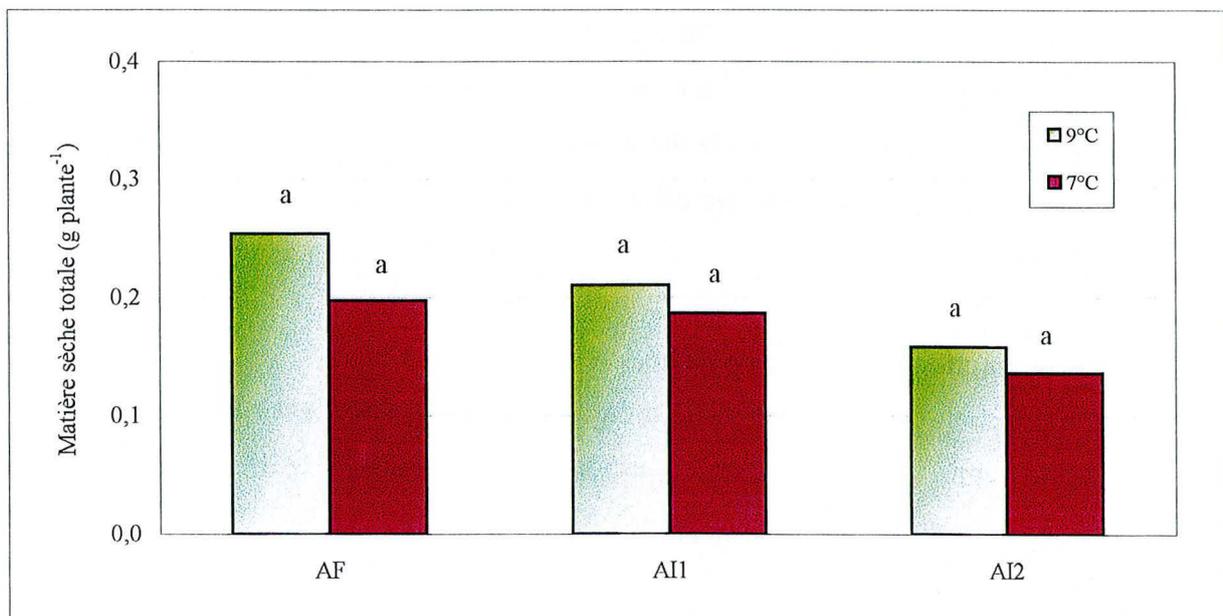


Figure 4.2. Matière sèche produite au premier échantillonnage du premier essai par les différents traitements de l'écotype *M. aculeata* 80 (A). Ces traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche M53) et I2 (inoculé par la souche M620).

traitements de l'écotype A. Cette supériorité de l'écotype B a été également observée chez les plantes cultivées à 7°C.

L'inoculation a présenté un effet stimulateur, par rapport au témoin, similaire à celui induit par la fertilisation azotée (Fig. 4.1). Ceci est notamment remarquable dans le cas de l'écotype B inoculé par la souche M508 (traitement I1). Ce traitement a produit une biomasse statistiquement comparable à celle produite par le traitement F que ce soit à 9°C ou à 7°C. Cependant, l'importance de la spécificité de la souche utilisée pour l'inoculation est nette si l'on compare les traitements I1 et I2. L'écotype B inoculé par la souche M508 (traitement I1) et cultivé à 9°C a présenté une biomasse de 0,32 g plante⁻¹ alors que ce même écotpe a produit 0,23 g plante⁻¹ lorsqu'il a été inoculé par la souche M620.

Pour l'écotype A, nous observons que la source d'azote n'a pas présenté d'effet statistiquement significatif sur la biomasse sèche au premier échantillonnage (Fig. 4.2).

La température basse (7°C) a ralenti la production de matière sèche chez l'écotype B. Cet effet dépressif a été significatif notamment dans le cas du traitement F. Ce traitement cultivé à 9°C a produit 0,37 g plante⁻¹ par rapport à 0,25 g plante⁻¹ pour les plantes à 7°C. Cet effet défavorable des basses températures (7°C) a été moins marqué chez les traitements I1 et I2. Ces traitements cultivés à 7°C ont respectivement montré une biomasse inférieure de 24% et 12% à celle des plantes disposées à 9°C.

Pour l'écotype A, l'effet de la température sur la production de biomasse n'a pas été significatif au premier échantillonnage.

1.2.2. Deuxième échantillonnage

Les résultats obtenus lors du premier échantillonnage ont été confirmés par le deuxième échantillonnage. L'écotype B continue à montrer une biomasse systématiquement supérieure à celle produite par l'écotype A. La biomasse produite par l'écotype B cultivé à 9°C a été de l'ordre de 2,56 à 3,29 g plante⁻¹ par rapport à 0,75 à 1,80 g plante⁻¹ pour l'écotype A.

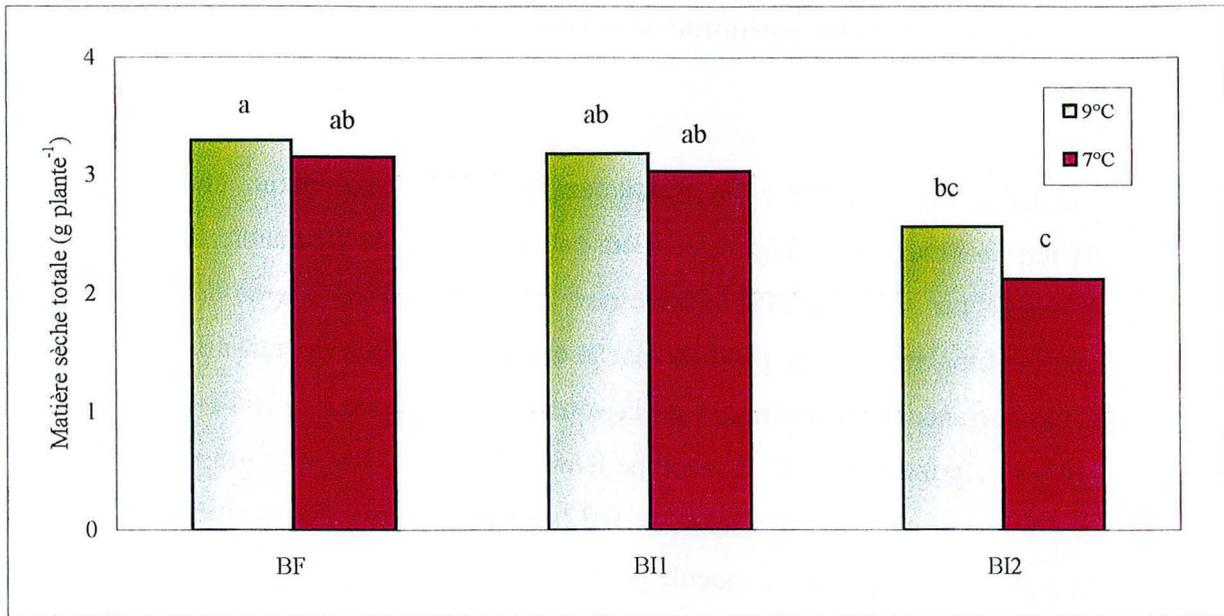


Figure 4.3. Matière sèche produite au deuxième échantillonnage du premier essai par les différents traitements de l'écotype *M. aculeata* 5099 (B). Ces traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche M508) et I2 (inoculé par la souche M620).

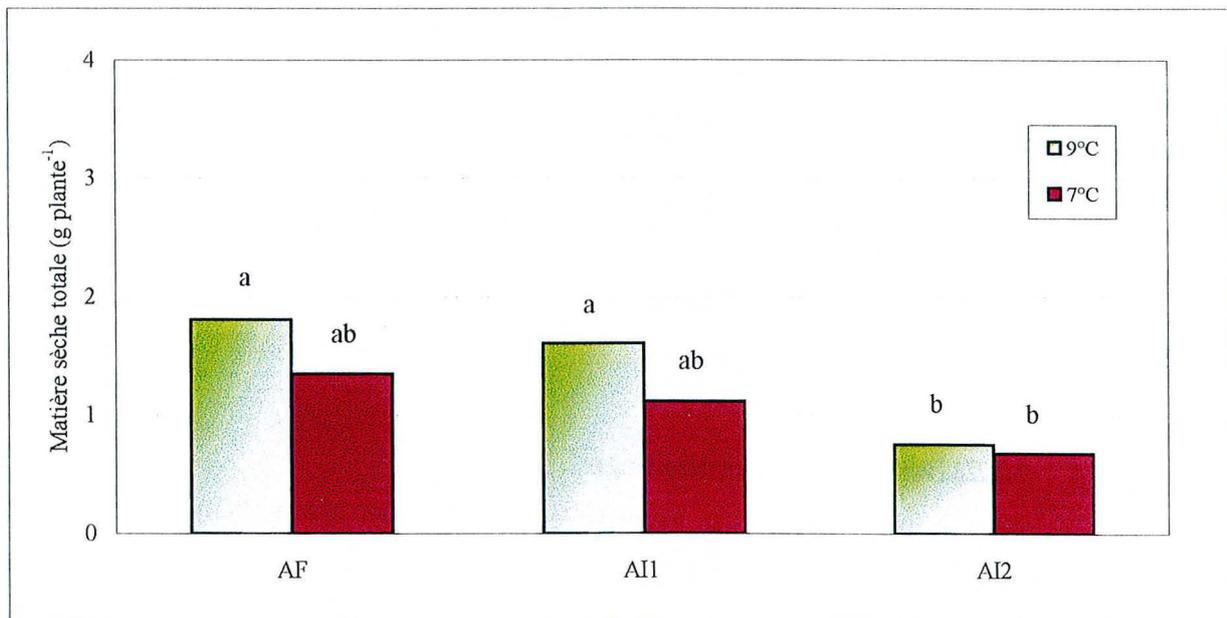


Figure 4.4. Matière sèche produite au deuxième échantillonnage du premier essai par les différents traitements de l'écotype *M. aculeata* 80 (A). Ces traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche M53) et I2 (inoculé par la souche M620).

Pour l'écotype B, les traitements F et I1 ont montré la meilleure performance en ce qui concerne la production de la matière sèche à 9 et à 7°C (Fig. 4.3). Le traitement I2 a cependant présenté à 9°C une matière sèche non significativement différente de celle du traitement I1 cultivé à la même température (2,56 et 3,18 g MS plante⁻¹ respectivement). Toutefois, à 7°C la biomasse sèche produite par le traitement I2 a été significativement inférieure à celle du traitement I1 (2,12 et 3,03 g MS plante⁻¹ respectivement).

Pour l'écotype A, la biomasse sèche produite par le traitement F a dépassé celle du traitement I1 mais sans montrer un effet significatif (Fig. 4.4). A 9°C, le premier traitement a présenté 1,8 g MS plante⁻¹ contre 1,6 g MS plante⁻¹ pour le traitement I1 et 0,75 g MS plante⁻¹ pour le traitement I2. L'effet de la souche est également net sur ce paramètre puisque ce dernier traitement (I2) a présenté une biomasse sèche significativement inférieure aux deux autres traitements.

Nous observons que les plantes cultivées à 9°C présentent une biomasse supérieure à celle produite à 7°C. Cet effet de la température est plus remarquable dans le cas des traitements F et I1 de l'écotype A. Toutefois, cet effet n'est pas statistiquement significatif, à cause de la variabilité élevée entre les répétitions.

1.3. Fixation d'azote

Nous avons déterminé le temps nécessaire pour la formation des nodosités ainsi que les valeurs que ces nodosités présentent sur l'échelle de notation. Nous avons également mesuré l'activité des nodosités à l'aide de la méthode de l'ARA et la quantité d'azote total retenue dans les plantes.

1.3.1. Temps nécessaire pour la formation des nodosités

La spécificité de la souche de *Sinorhizobium* pour un écotype donné et son comportement sous basses températures représentent les deux facteurs primordiaux pour la fixation d'azote. Nous avons étudié la nodulation chez les traitements inoculés des deux écotypes cultivés à 9 et à 7°C (Tableau 4.2). Les traitements fertilisés n'ont pas formé des nodosités jusqu'à l'âge de 30 jours. Chez l'écotype B, le traitement I1 a montré les meilleurs résultats car les nodosités apparaissent après 18 et 21 jours pour les plantes cultivées à 9 et à 7°C, respectivement. La différence entre les deux valeurs est significative. Concernant le

Tableau 4.2. Nombre de jours après le repiquage nécessaires pour former la première nodosité et échelle de notation des nodosités à 9 et à 7°C pour les deux traitements inoculés des écotypes *M. aculeata* 5099 (B) et *M. aculeata* 80 (A) lors du premier essai.

	Nombre de jours		Echelle de notation des nodosités	
	9°C	7°C	9°C	7°C
BI1	18 c*	21 b	4 a	4 a
BI2	24 a	---	1 b	---
Effet Température		***		***
Effet Inoculation		***		***
Température X Inoculation		***		***
AI1	22 a	27 b	2 a	2 a
AI2	---	---	---	---
Effet Température		***		***
Effet Inoculation		***		***
Température X Inoculation		***		***

Pour l'écotype B, les traitements sont : I1 (inoculé par la souche M508) et I2 (inoculé par la souche M620). Pour l'écotype A, les traitements sont : I1 (inoculé par la souche M53) et I2 (inoculé par la souche M620). L'effet des facteurs étudiés est déterminé après analyse de variance (NS : non significatif, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$). * La comparaison statistique est effectuée au sein du même écotype et entre les deux températures. Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de la PPDS ($P < 0,05$).

traitement I2, les plantes cultivées à 9°C ont formé des nodosités après 24 jours de repiquage alors que celles subissant 7°C n'ont pas réussi à former de nodosités.

Pour l'écotype A, le traitement I1 a formé des nodosités après 22 jours de culture lorsque les plantes sont cultivées à 9°C alors qu'il a requis 27 jours pour en former à 7°C. Pour les plantes du traitement I2, on n'observe pas de nodosités qu'elles soient cultivées à 9°C ou à 7°C.

1.3.2. Echelle de notation des nodosités

Le traitement I1 de l'écotype B a présenté les meilleurs résultats sur l'échelle de notation avec une valeur de 4 pour les plantes cultivées à 9 et à 7°C. En ce qui concerne le traitement I2, les nodosités formées chez les plantes cultivées à 9°C ont présenté une valeur de 1 sur l'échelle de notation alors que les plantes cultivées à 7°C n'ont pas formé de nodosités.

Pour l'écotype A, le traitement I1 a montré une valeur de 2 sur l'échelle de notation des nodosités dans le cas des plantes cultivées à 9 et à 7°C (Tableau 4.2). En revanche, le traitement I2 n'a pas réussi à former de nodosités que ce soit à 9 ou à 7°C.

Les souches utilisées ont différencié vis à vis de leur aptitude à former des nodosités. La souche M508 associée à l'écotype *M. aculeata* 5099 (B) a réussi à former tôt des nodosités présentant des valeurs élevées sur l'échelle de notation et ceci à 9 et à 7°C. Dans le cas de *M. aculeata* 80 la souche M53 a initié des nodosités présentant des valeurs de 2 alors que la souche M620 n'a pas réussi à former des nodosités qu'elle soit disposée à 9 ou à 7°C.

1.3.3. Activité nitrogénase

Nous avons mesuré l'activité réductrice d'acétylène qui permet de déterminer l'activité potentielle des nodosités ou celle de la nitrogénase. Ces mesures ont été effectuées sur des plantes âgées de 98 jours (après le repiquage). Cependant, il convient de noter que les valeurs obtenues sont relativement faibles par rapport aux résultats obtenus au champ. Outre l'effet dépressif des basses températures, une fuite au niveau des cylindres a probablement réduit ces valeurs. Toutefois, cette méthode reste bonne pour comparer l'effet des basses températures sur les capacités fixatrices.

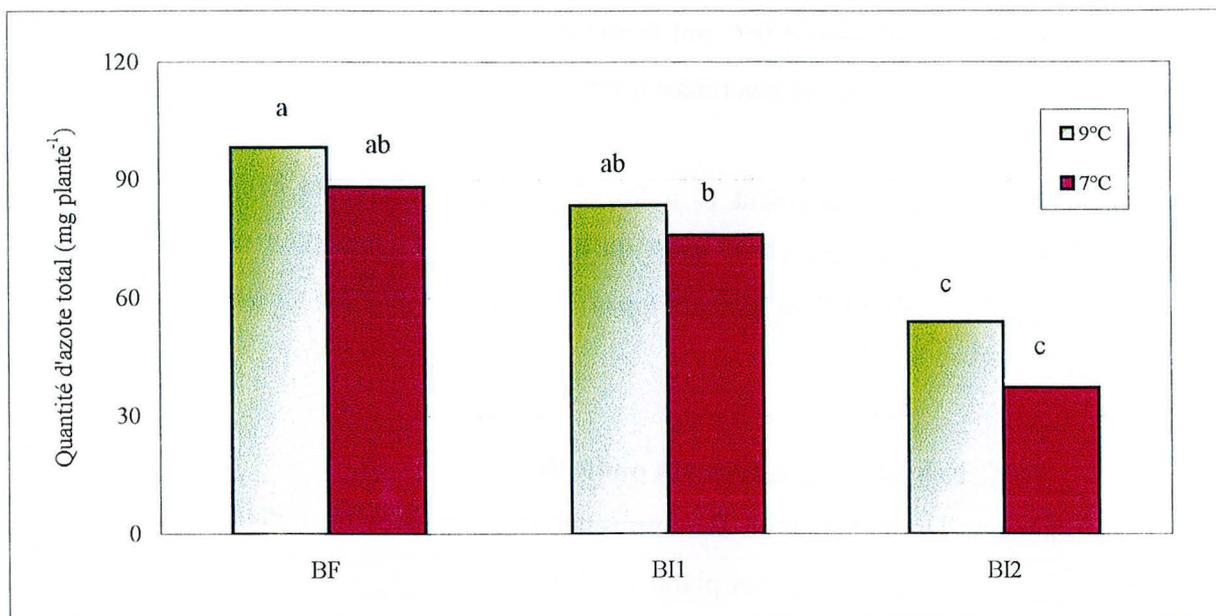


Fig. 4.5. Quantité d'azote total par plante au deuxième échantillonnage du premier essai pour les différents traitements de l'écotype *M. aculeata* 5099 (B). Ces traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche M508) et I2 (inoculé par la souche M620).

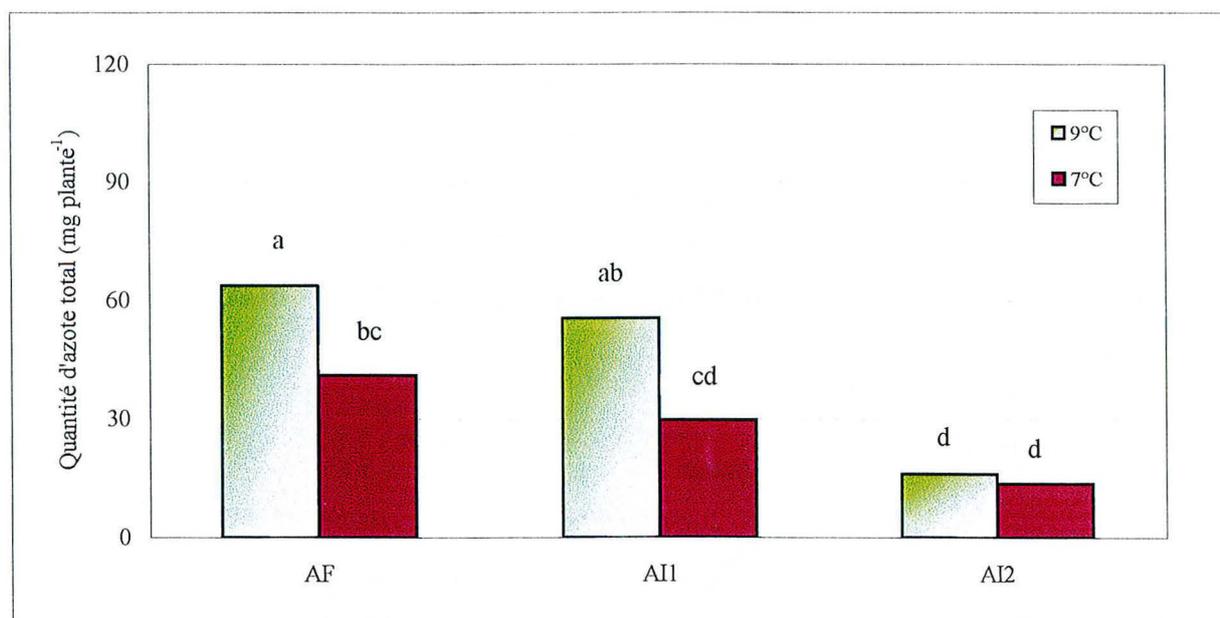


Fig. 4.6. Quantité d'azote total par plante au deuxième échantillonnage du premier essai pour les différents traitements de l'écotype *M. aculeata* 80 (A). Ces traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche M53) et I2 (inoculé par la souche M620).

Pour l'écotype A, le traitement I2 a présenté une valeur nulle d'activité selon la méthode de l'ARA (Tableau 4.3). L'effet des basses températures sur la réduction d'acétylène est net dans le cas du traitement I1. Pour ce traitement, la valeur enregistrée chez les plantes cultivées à 9°C est de 1,53 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ plante}^{-1} \text{ h}^{-1}$ contre 0,66 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ plante}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour les plantes placées à 7°C, cette différence étant significative.

Concernant l'écotype B, les deux traitements inoculés ont présenté une activité réductrice d'acétylène à 9°C (Tableau 4.3). Cependant, la quantité de C_2H_4 formée par le traitement I1 a été trois fois plus grande que celle produite par le traitement I2. Les basses températures ont significativement réduit cette activité. La quantité de C_2H_4 produite chez le traitement I1 cultivés à 7°C a été inférieure de l'ordre de 25% à celle obtenue à 9°C. De plus, la valeur de l'ARA enregistrée chez le traitement I2 cultivé à 7°C a été nulle puisque ces plantes n'ont pas formé de nodosités à cette basse température.

1.3.4. Quantité d'azote total des plantes

Nous observons chez l'écotype B que les traitements F et I1 ne présentent pas de différence significative au niveau de la quantité d'azote total des plantes (Fig. 4.5). Ces traitements ont respectivement produit 98 et 83 mg N plante^{-1} lorsqu'ils sont cultivés à 9°C et 88 et 76 mg plante^{-1} lors d'une culture à 7°C. Le traitement I2 a présenté des valeurs inférieures aux autres traitements qu'il soit cultivé à 9 ou à 7°C.

Les résultats obtenus chez l'écotype A montrent que les plantes du traitement I1 ont présenté une quantité d'azote comparable à celle du traitement F (Fig. 4.6). A 9°C, ces deux traitements ont produit 64 et 55 mg N plante^{-1} , respectivement. Le traitement I2 montre une quantité d'azote significativement inférieure aux autres traitements notamment à 9°C.

La culture des plantes à 7°C au lieu de 9°C a légèrement réduit la quantité d'azote total retenue dans les plantes. Néanmoins, cet effet a été significatif uniquement chez les traitements F et I1 de l'écotype A.

Tableau 4.3. Quantité d'éthylène produite (en μ mol plante⁻¹ h⁻¹) au deuxième échantillonnage du premier essai pour les écotypes *M. aculeata* 5099 (B) et *M. aculeata* 80 (A) cultivés à 9 et à 7°C.

	<u>9°C</u>	<u>7°C</u>
BI1	3,93 a*	2,95 b
BI2	1,18 c	---
Effet Température		***
Effet Inoculation		***
Température X Inoculation		***
AI1	1,53 a	0,66 b
AI2	---	---
Effet Température		***
Effet Inoculation		***
Température X Inoculation		***

Pour l'écotype B, les traitements sont : I1 (inoculé par la souche M508) et I2 (inoculé par la souche M620). Pour l'écotype A, les traitements sont : I1 (inoculé par la souche M53) et I2 (inoculé par la souche M620). L'effet des facteurs étudiés est déterminé après analyse de variance (NS : non significatif, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$). * La comparaison statistique est effectuée au sein du même écotype et entre les deux températures. Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de la PPDS ($P < 0,05$).

2. Deuxième essai

En fonction des résultats du premier essai en conditions contrôlées, nous avons décidé de retenir l'écotype *M. aculeata* 5099 (B) et de le comparer à l'écotype *M. rigidula* 716 qui a présenté les meilleures performances lors des essais au champ. Ce deuxième essai sert à suivre, chez *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716, l'effet de la source d'azote sur le développement (apparition foliaire), la production de la matière sèche et la fixation d'azote chez des plantes cultivées sous deux températures basses (9 et 7°C). Les sources d'azote concernées sont la fertilisation, l'inoculation (2 traitements) en plus d'un traitement témoin non fertilisé et non inoculé.

2.1. Apparition foliaire

Nous avons étudié le nombre de jours nécessaires pour l'émission successive des cinq premières feuilles.

Nous observons que l'écotype B présente un rythme de développement plus rapide que celui de l'écotype R notamment pour les plantes cultivées à 7°C (Tableau 4.4). Sous cette basse température, la première feuille est apparue après 17 jours pour l'écotype B et 19 jours pour l'écotype R. Par rapport à l'écotype R, l'écotype B a atteint le stade 5-7 feuilles 2 à 4 jours plus tôt lorsque les plantes sont cultivées à 9°C et 3 à 7 jours pour les plantes à 7°C.

Par rapport aux plantes témoins, la fertilisation a exercé un effet accélérateur sur le rythme de développement pendant les stades que nous avons étudiés. Pour les écotypes B et R, cet effet a été observé à partir du stade 2 feuilles pour les plantes cultivées à 9°C et du stade 3 feuilles pour celles subissant 7°C. Cependant, l'inoculation a également accéléré le développement des plantes notamment dans le cas du traitement I1. Le traitement I2 des deux écotypes n'a pas présenté de différence par rapport au traitement témoin (T). L'importance de la spécificité de la souche bactérienne utilisée pour l'inoculation a été nette puisque les deux souches utilisées pour chaque écotype n'ont pas présenté le même effet sur le rythme de développement. A 9 et à 7°C, le traitement I1 a atteint le stade 5-7 feuilles 4 à 6 jours avant le traitement I2 pour l'écotype B et 4 à 5 jours pour R. De même, le traitement I1 de l'écotype R a atteint le stade 5-7 feuilles 2 jours avant le traitement F. A ce dernier stade, le classement des traitements chez l'écotype B et sous les deux températures a été le suivant : F (le plus

Tableau 4.4. Temps (jours) après le repiquage nécessaire pour atteindre les stades foliaires à 9 et à 7°C pour les différents traitements des écotypes *M. aculeata* 5099 (B) et *M. rigidula* 716 (R) lors du deuxième essai.

		Temps (jours)				
Stade foliaire		1	2	3	4	5-7
9°C	BF	13 b*	20 c	25 d	29 g	33 f
	BI1	13 b	21 bc	26 d	31 f	35 e
	BI2	13 b	22 bc	31 bc	38 c	41 b
	BT	13 b	23 b	31 bc	38 c	41 b
7°C	BF	17 a	26 a	30 c	34 e	37 d
	BI1	17 a	26 a	32 b	37 d	39 c
	BI2	17 a	27 a	35 a	40 b	43 a
	BT	17 a	26 a	35 a	42 a	43 a
Effet Température		***	***	***	***	***
Effet Source d'azote		NS	*	***	***	***
Température X Source d'azote		NS	NS	NS	***	***
9°C	RF	15 b	22 d	27 d	30 d	35 d
	RI1	15 b	25 bc	31 c	34 c	39 c
	RI2	16 b	26 b	36 ab	39 ab	44 ab
	RT	15 b	24 c	35 b	38 b	43 b
7°C	RF	19 a	31 a	36 ab	39 ab	44 ab
	RI1	19 a	32 a	34 b	37 b	42 b
	RI2	19 a	33 a	38 a	41 a	46 a
	RT	19 a	32 a	38 a	41 a	46 a
Effet Température		***	***	***	***	***
Effet Source d'azote		NS	***	***	***	***
Température X Source d'azote		NS	NS	NS	NS	NS

Pour l'écotype B, les traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche M508), I2 (inoculé par la souche M620) et T (témoin). Pour l'écotype R, les traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche BZI), I2 (inoculé par la souche M53) et T (témoin). L'effet des facteurs étudiés est déterminé après analyse de variance (NS: non significatif, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$). * Pour un écotype, les moyennes suivies par la même lettre dans une colonne ne sont pas significativement différentes selon le test de la PPDS ($P < 0,05$).

précoce) > I1 > T = I2 (le moins précoce). Pour l'écotype R le classement est : I1 > F > I2 = T.

La baisse de la température a ralenti le rythme de développement chez les deux écotypes B et R. La première feuille de plantes de l'écotype B est initiée à l'âge de 13 jours pour les plantes cultivées à 9°C et 17 jours pour celles croissant à 7°C. Des résultats similaires sont observés chez l'écotype R puisqu'on note la première feuille chez les plantes cultivées à 9°C à l'âge de 15 à 16 jours alors que cette feuille a été émise après 19 jours de culture pour les plantes subissant 7°C. Cet effet dépressif de la basse température a persisté jusqu'à la fin de la culture au stade 5-7 feuilles. Pour l'écotype B, les traitements F et I1 disposés à 7°C ont atteint le stade 5-7 feuilles 4 jours plus tard que ceux cultivés à 9°C. Le stade 5-7 feuilles chez les traitements I2 et T a été retardé de 2 jours lorsque les plantes sont cultivées à 7°C au lieu de 9°C. Pour l'écotype R, le stade 5-7 feuilles chez le traitement F a été ajourné de 9 jours par la température la plus basse (7°C) alors que ce stade a été retardé de 2 à 3 jours pour les autres traitements.

Pour la période de l'essai (jusqu'au stade 5-7 feuilles), l'écotype *M. aculeata* 5099 (B) présente un rythme de développement plus rapide que l'écotype *M. rigidula* 716 (R). Les souches de *Rhizobium meliloti* M508 pour *M. aculeata* 5099 et BZI pour *M. rigidula* 716 montrent un effet accélérateur sur le développement des plantes. La culture des plantes à 7°C a induit un retard de développement.

2.2. Production de la matière sèche

La production de la matière sèche a été étudiée à deux âges : à 63 jours et à 96 jours afin de déterminer l'effet de la source d'azote et de la température sur l'élaboration de la biomasse.

2.2.1. Premier échantillonnage (63 jours)

L'écotype B a systématiquement présenté une biomasse sèche supérieure à celle produite par l'écotype R aux deux températures étudiées. Le traitement F cultivé à 9°C a présenté une biomasse de 0,385 g plante⁻¹ par rapport à 0,235 g plante⁻¹ pour le traitement F de l'écotype R. la différence entre les deux écotypes est plus important dans le cas des plantes cultivées à 7°C.

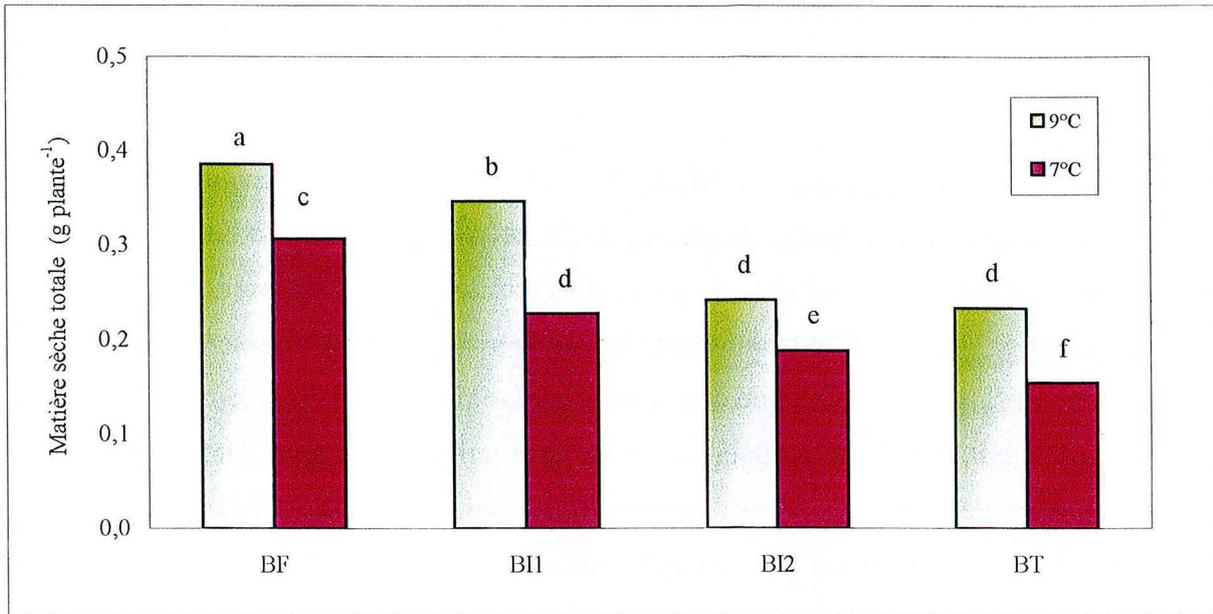


Figure 4.7. Matière sèche produite au premier échantillonnage du deuxième essai par les différents traitements de l'écotype *M. aculeata* 5099 (B). Ces traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche M508), I2 (inoculé par la souche M620) et T (témoin).

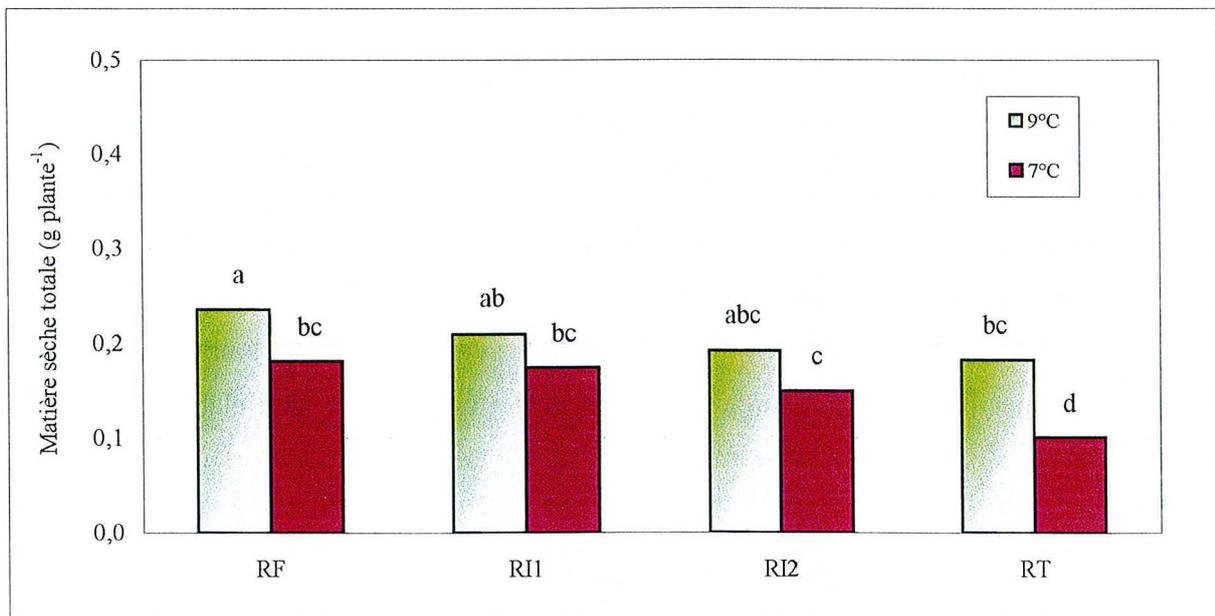


Figure 4.8. Matière sèche produite au premier échantillonnage du deuxième essai par les différents traitements de l'écotype *M. rigidula* 716 (R). Ces traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche BZI), I2 (inoculé par la souche M53) et T (témoin).

Dans le cas de l'écotype B, le traitement F a montré la meilleure performance en terme de production de matière sèche dépassant significativement les autres traitements (Fig. 4.7). La biomasse produite par le traitement I1 ($0,35 \text{ g plante}^{-1}$) a été significativement supérieure au traitement inoculé I2 et au témoin. Pour les plantes cultivées à 7°C , le traitement F a encore une fois été le plus performant suivi par les traitements I1, I2 et T, respectivement. La différence est significative entre tous les traitements. Concernant l'écotype R à 9°C le traitement F a dépassé légèrement les traitements inoculés I1 et I2 et significativement le traitement T (Fig. 4.8). La différence entre les traitements inoculés et le témoin T n'est pas significative.

Dans le cas de l'écotype B, les plantes cultivées à 7°C ont produit significativement moins de biomasse que celles cultivées à 9°C . La biomasse produite par le traitement F de cet écotype est inférieure de 20% lorsque les plantes sont cultivées à 7°C par rapport à 9°C . Cette baisse induite par la température basse (7°C) a été de l'ordre de 34, 22 et 34% pour les traitements I1, I2 et T. Pour l'écotype R, la basse température (7°C) a induit un ralentissement de la production de biomasse chez les traitements F et T, alors que les traitements inoculés ont présenté des valeurs de biomasse non significativement différentes qu'ils soient disposés à 9°C ou à 7°C .

2.2.2. Deuxième échantillonnage (96 jours)

Comme dans le cas du premier échantillonnage, l'écotype B a présenté des valeurs plus élevées que l'écotype R qu'ils soient cultivés à 9 ou à 7°C .

La fertilisation a induit un effet stimulateur sur la biomasse (Fig. 4.9). Toutefois, il est intéressant de noter que le traitement I1 des deux écotypes a présenté une biomasse comparable à celle du traitement F pour les deux températures étudiées. Le traitement I2 de l'écotype B cultivé à 9°C a présenté une biomasse inférieure à celle du traitement I1 mais supérieure à celle du témoin. Cependant, I2 cultivé à 7°C n'a pas montré de différence par rapport au témoin. Le même phénomène a été observé dans le cas de l'écotype R quelle que soit la température de la culture (Fig. 4.10).

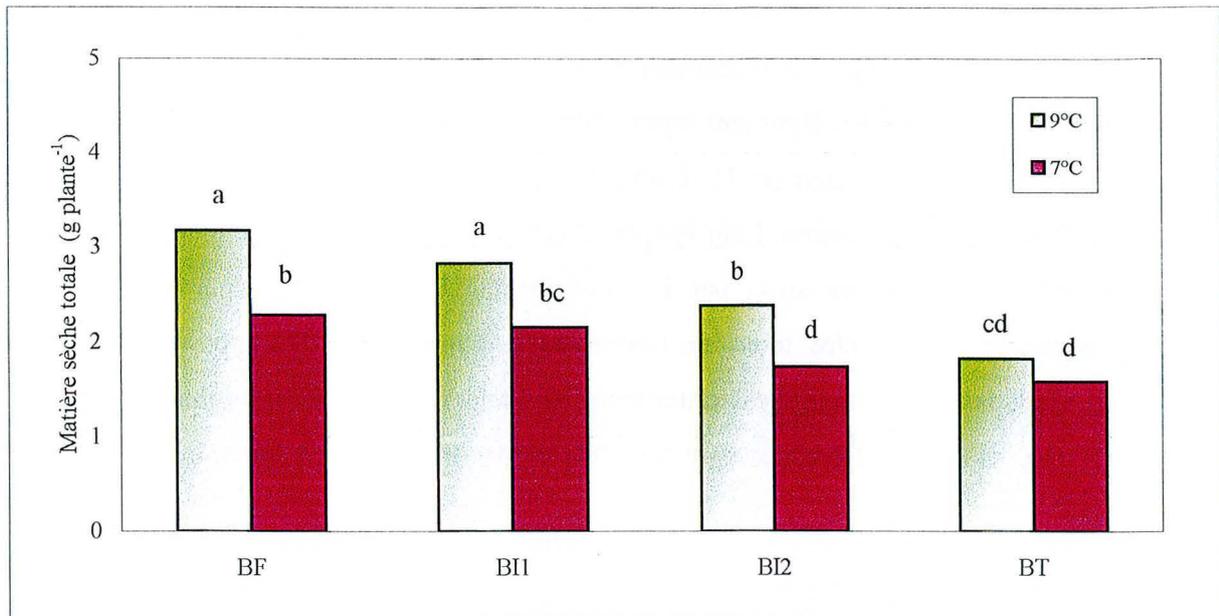


Figure 4.9. Matière sèche produite au deuxième échantillonnage du deuxième essai par les différents traitements de l'écotype *M. aculeata* 5099 (B). Ces traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche M508), I2 (inoculé par la souche M620) et T (témoin).

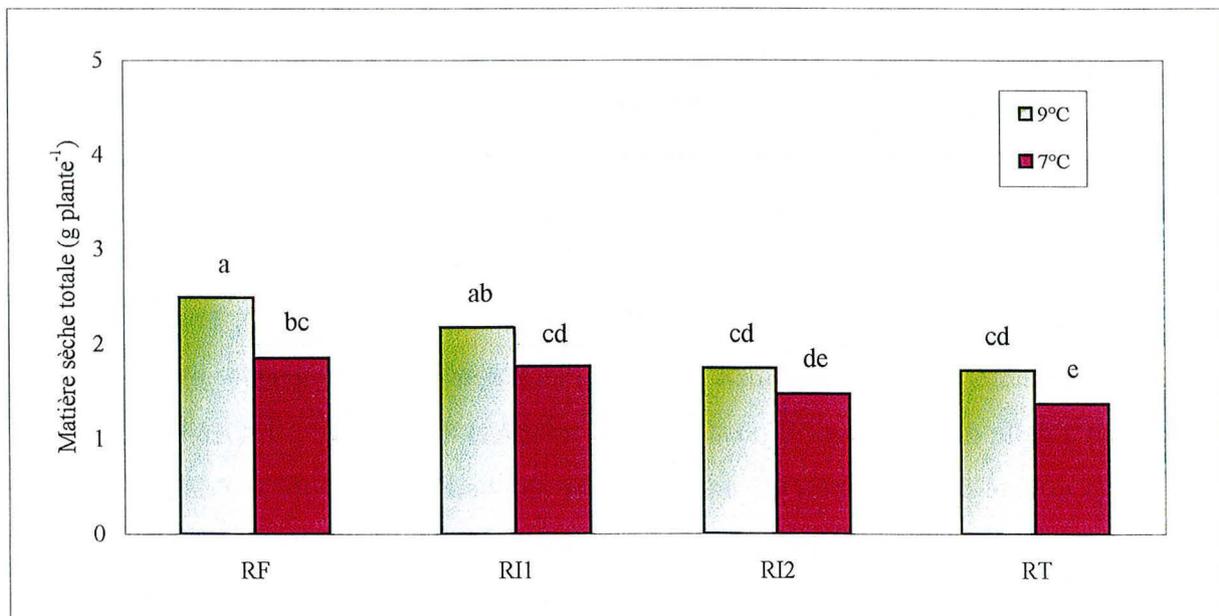


Figure 4.10. Matière sèche produite au deuxième échantillonnage du deuxième essai par les différents traitements de l'écotype *M. rigidula* 716 (R). Ces traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche BZI), I2 (inoculé par la souche M53) et T (témoin).

La culture des plantes à 7°C a induit un ralentissement de l'élaboration de la matière sèche chez les deux écotypes B et R. La matière sèche produite par les traitements F, I1 et I2 de l'écotype B cultivées à 7°C a été inférieure de 39, 27 et 29% par rapport aux mêmes traitements cultivés à 9°C. Le traitement témoin de cet écotype a été le moins affecté par la culture à 7°C puisque sa biomasse a été inférieure de 12,5% à celui cultivé à 9°C. Pour l'écotype R, les plantes du traitement F ont été les plus touchées par la culture à 7°C. L'effet dépressif induit par cette température dans le cas des traitements I1, I2 et T a été de l'ordre de 22, 13 et 21% de leur biomasse produite à 9°C.

L'écotype *M. aculeata* 5099 (B) a élaboré plus de matière sèche que l'écotype *M. rigidula* 716 (R) sous les deux températures basses étudiées. Les traitements F et I1 ont produit le plus de biomasse suivi par I2 et T. La biomasse produite à 7°C a été inférieure à celle élaborée à 9°C et le traitement F a été le plus déprimé par la culture à 7°C.

2.3. Fixation d'azote

Dans le but d'étudier la nutrition azotée des plantes, nous avons déterminé le nombre de jours nécessaires pour former la première nodosité, l'échelle de notation des nodosités et la fixation d'azote mesurée par la méthode de dilution isotopique ¹⁵N.

2.3.1. Formation des nodosités

Il convient tout d'abord de mentionner que les traitements F et T des écotypes B et R n'ont pas formé de nodosités qu'ils soient cultivés à 9 ou à 7°C (Fig. 4.11 et 4.12).

Les souches utilisées pour l'inoculation ont présenté un effet variable sur le temps nécessaire pour la formation de la première nodosité (Tableau 4.5). Dans le cas de l'écotype B, la souche B508 (traitement I1) a réussi à former des nodosités après 19 et 21 jours pour les plantes cultivées à 9°C et à 7°C, respectivement. La souche B620 (traitement I2) a nécessité 24 jours pour former la première nodosité chez les plantes cultivées à 9°C alors que cette souche n'a pas réussi à former de nodosités à 7°C. Pour l'écotype R, la souche BZI (traitement I1) a pris 20 et 22 jours pour former des nodosités chez les plantes cultivées à 9°C et à 7°C, respectivement. Le traitement I2 de cet écotype a requis 27 jours pour former des nodosités chez les plantes cultivées à 9°C alors qu'il était impossible d'en former à 7°C.

Tableau 4.5. Nombre de jours après le repiquage nécessaires pour former la première nodosité et échelle de notation des nodosités à 9 et à 7°C pour les deux traitements inoculés des écotypes *M. aculeata* 5099 (B) et *M. rigidula* 716 (R) lors du deuxième essai.

	Nombre de jours		Echelle de notation des nodosités	
	9°C	7°C	9°C	7°C
BI1	19 c*	21 b	4 a	4 a
BI2	24 a	---	1 b	---
Effet Température		***		**
Effet Inoculation		***		***
Température X Inoculation		***		***
RI1	20 c	22 b	3 a	3 a
RI2	27 a	---	1 b	---
Effet Température		***		**
Effet Inoculation		***		***
Température X Inoculation		***		***

Pour l'écotype B, les traitements sont : I1 (inoculé par la souche M508) et I2 (inoculé par la souche M620). Pour l'écotype R, les traitements sont : I1 (inoculé par la souche BZI) et I2 (inoculé par la souche M53). L'effet des facteurs étudiés est déterminé après analyse de variance (NS : non significatif, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$). * La comparaison statistique est effectuée au sein du même écotype et entre les deux températures. Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de la PPDS ($P < 0,05$).

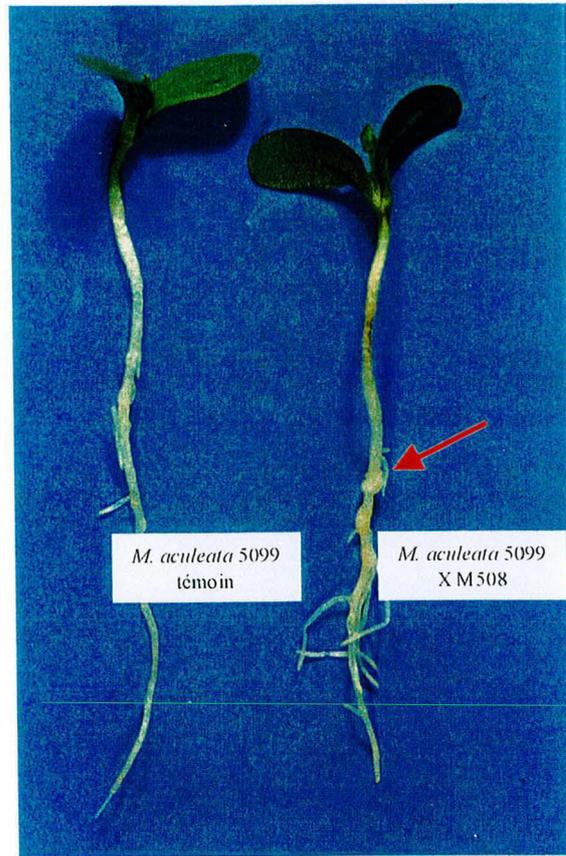


Fig. 4.11. Apparition des premières nodosités chez *M. aculeata* 5099 inoculé par la souche de *Sinorhizobium meliloti* M508 et cultivé à 9°C (à droite) par rapport au témoin non inoculé (à gauche).

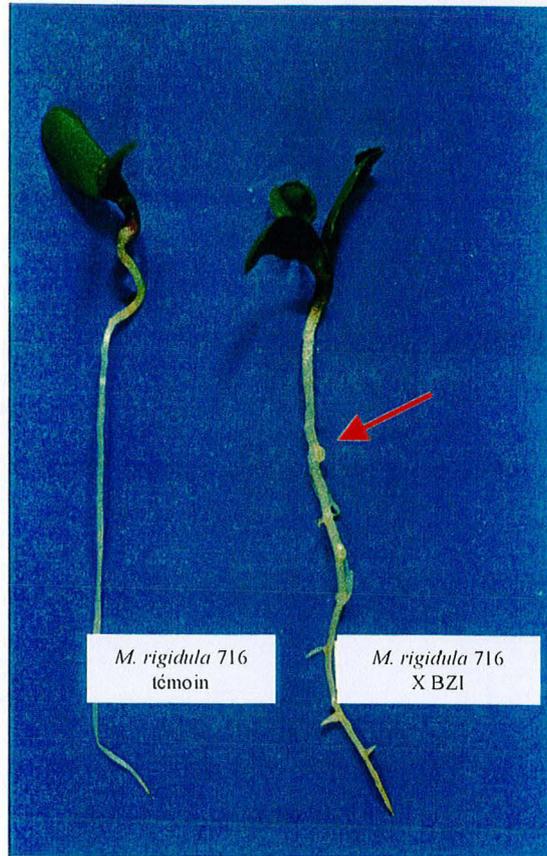


Fig. 4.12. Apparition des premières nodosités chez *M. rigidula* 716 inoculé par la souche de *Sinorhizobium meliloti* BZI et cultivé à 9°C (à droite) par rapport au témoin non inoculé (à gauche).

La culture des plantes à 7°C induit un retard ou inhibe totalement la formation des nodosités. Les plantes du traitement I1 des deux écotypes cultivés à cette température ont formé des nodosités deux jours après les plantes cultivées à 9°C. Les souches M620 et M53 ont formé des nodosités à 9°C mais pas à 7°C.

2.3.2. Echelle de notation des nodosités

Les souches utilisées pour le traitement I1 des deux écotypes ont présenté les valeurs les plus élevées sur l'échelle de notation (Tableau 4.5). Qu'elle soit cultivée à 9°C ou à 7°C, la souche M508 (I1) utilisée pour inoculer l'écotype B a présenté une valeur de 4 sur l'échelle de notation. Pour l'écotype R, la souche BZI (I1) a montré une valeur de 3 sur cette échelle. En revanche, les nodosités formées par les souches M620 et M53 n'ont obtenu que des valeurs de 1 sur l'échelle de notation.

La température la plus basse (7°C) n'a pas exercé d'effet sur l'aspect (notation) de ces nodosités formées par M508 sur B et BZI sur R (mais BI2 et RI2 ont une note de 1 à 9°C et 0 à 7°C).

Pour les deux écotypes, les souches du traitement I1 (M508 et BZI) ont formé des nodosités plus rapidement que les souches du traitement I2 (M620 et M53). De plus, les nodosités du traitement I1 ont présenté des meilleures valeurs sur l'échelle de notation et ont été moins affectées par la culture des plantes à 7°C que celles du traitement I2. La température de 7°C retarde ou inhibe la formation des nodosités mais sans modifier sensiblement leur notation.

2.3.3. Quantité d'azote fixé

La quantité d'azote fixé a été mesurée à l'aide de méthode de la dilution isotopique. La proportion d'azote provenant de la fixation et la quantité d'azote fixé enregistrées chez l'écotype B ont été systématiquement plus élevées que celles observées pour R. La quantité d'azote fixé a atteint 86 mg plante⁻¹ pour le traitement I1 de l'écotype B par rapport à 52 mg plante⁻¹ pour le traitement I1 de l'écotype R (Tableau 4.6).

Tableau 4.6. Quantité d'azote fixé (en g plante⁻¹) et proportion d'azote provenant de la fixation (%Ndfa) à 9 et à 7°C pour les deux traitements inoculés des écotypes *M. aculeata* 5099 (B) et *M. rigidula* 716 (R) lors du deuxième essai.

	Quantité d'azote fixé (g plante ⁻¹)		% Ndfa	
	9°C	7°C	9°C	7°C
BI1	0,086 a	0,055 b	88 a	78 b
BI2	0,048 bc	0,024 c	63 c	50 d
Effet Température		***		***
Effet Inoculation		***		***
Température X Inoculation		NS		NS
RI1	0,052 a	0,042 b	74 a	72 a
RI2	0,024 c	0,022 c	49 b	51 b
Effet Température		NS		NS
Effet Inoculation		***		***
Température X Inoculation		NS		NS

Pour l'écotype B, les traitements sont : I1 (inoculé par la souche M508) et I2 (inoculé par la souche M620). Pour l'écotype R, les traitements sont : I1 (inoculé par la souche BZI) et I2 (inoculé par la souche M53). L'effet des facteurs étudiés est déterminé après analyse de variance (NS : non significatif, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$). * La comparaison statistique est effectuée au sein du même écotype et entre les deux températures. Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de la PPDS ($P < 0,05$).

L'effet de la souche sur la quantité d'azote fixé a été marqué pour les deux écotypes. Pour l'écotype B cultivé à 9°C, la quantité d'azote fixé par le traitement I1 (souche M508) a été de l'ordre de 86 mg N plante⁻¹ alors que celle assurée par la souche M620 (traitement I2) a été de 48 mg N plante⁻¹, la différence entre ces deux valeurs est significative. Le même phénomène a été observé pour l'écotype R où le traitement I1 a présenté une quantité d'azote significativement plus élevée que celle fixée par le traitement I2.

Pour les plantes inoculées, la proportion d'azote provenant de la fixation a varié de 49 et 88% de l'azote total retrouvé dans la plante en fonction des souches de *Sinorhizobium* et des températures. Les souches utilisées pour le traitement I1 ont présenté la fixation la plus élevée aux deux températures étudiées.

La température de 7°C a significativement réduit la quantité d'azote fixé notamment pour le traitement I1. Cette quantité a été de l'ordre de 86 mg N plante⁻¹ pour le traitement I1 de l'écotype B cultivé à 9°C, par rapport à 55 mg N plante⁻¹ pour le même traitement à 7°C. Pour le traitement I1 de l'écotype R, les plantes cultivées à 9°C ont fixé 52 mg N plante⁻¹ par rapport à 42 mg N plante⁻¹ pour les plantes soumises à 7°C. Pour le traitement I2, l'effet des basses températures n'a pas été significatif.

Le froid affecte également la proportion d'azote provenant de la fixation. Une réduction significative est observée chez les plantes des deux écotypes cultivées à 7°C par rapport à celles croissant à 9°C. Dans le cas de l'écotype B, cette proportion a passé de 88% à 78% et de 63% à 50% respectivement pour les deux souches M508 (I1) et M620 (I2) lorsque les plantes sont cultivées à 7°C au lieu de 9°C. Concernant l'écotype R, la baisse observée par la basse température a été moins marquée où nous observons que la souche BZI a enregistré des proportions d'azote provenant de la fixation de 74% et 72% pour les plantes cultivées à 9°C et à 7°C respectivement. Cette proportion n'a pas été affectée par la basse température chez la souche M508.

2.3.4. Quantité d'azote total des plantes

Les plantes de l'écotype B ont systématiquement présenté une quantité d'azote plus élevée que celle élaborée par l'écotype R. Dans le cas des plantes cultivées à 9°C, la quantité

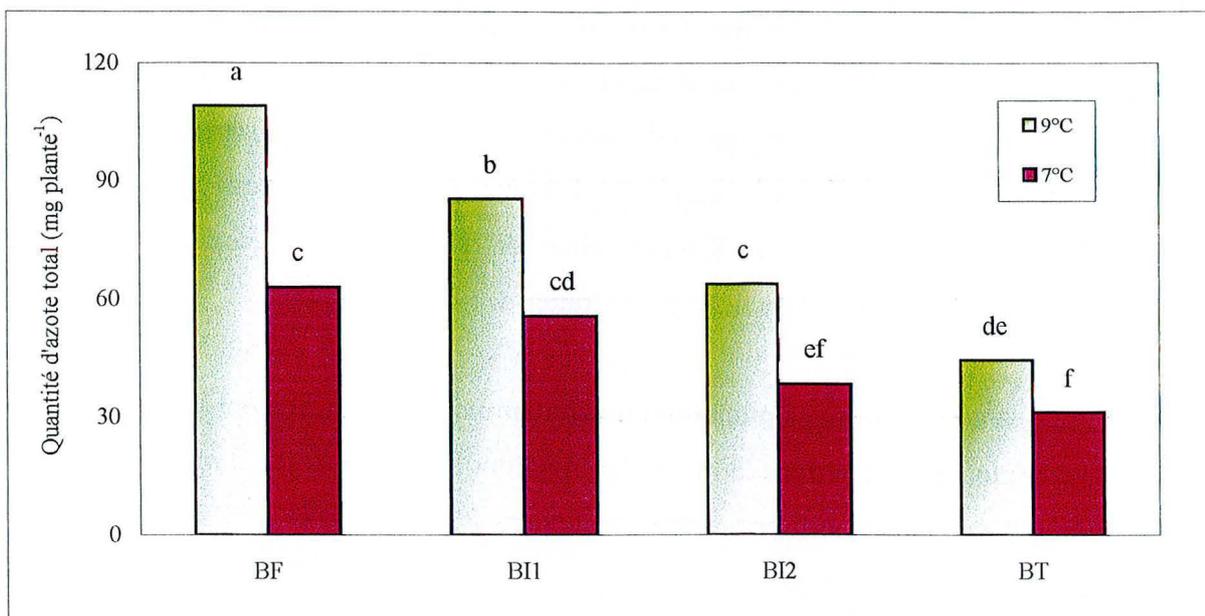


Fig. 4.13. Quantité d'azote total par plante au deuxième échantillonnage du deuxième essai pour les différents traitements de l'écotype *M. aculeata* 5099 (B). Ces traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche M508), I2 (inoculé par la souche M620) et T (témoin).

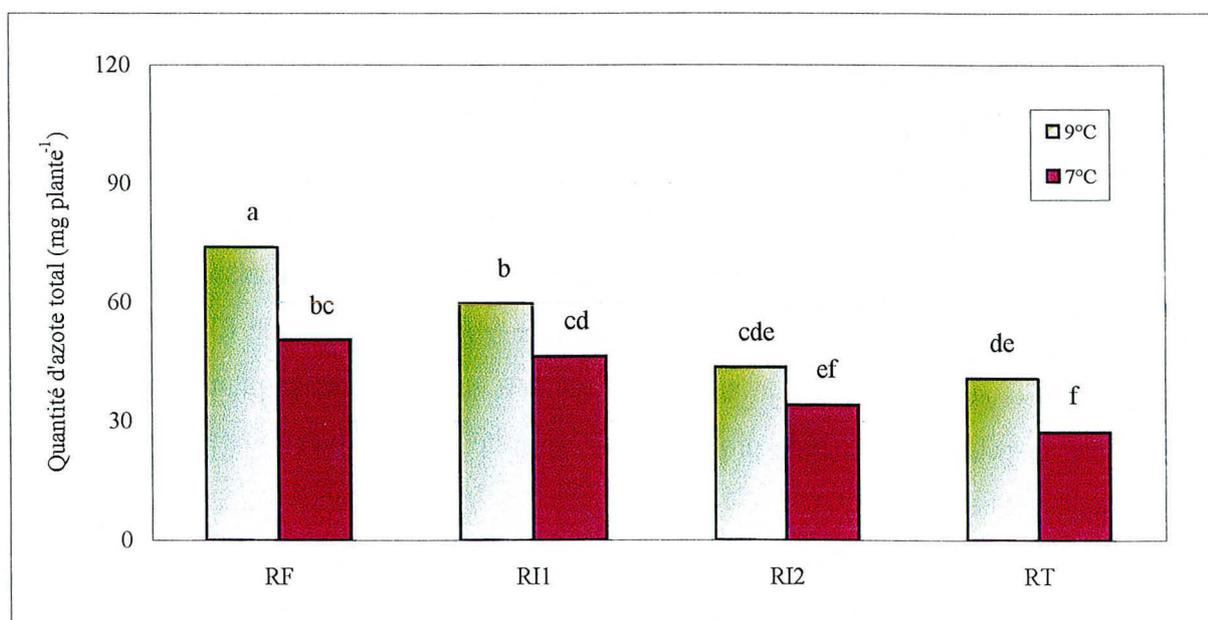


Fig. 4.14. Quantité d'azote total par plante au deuxième échantillonnage du deuxième essai pour les différents traitements de l'écotype *M. rigidula* 716 (R). Ces traitements sont : F (fertilisé), I1 (inoculé par la souche BZI), I2 (inoculé par la souche M53) et T (témoin).

d'azote produite par les traitements fertilisé et inoculés (I1 et I2) de l'écotype B a été supérieure de 42 à 47% à celle produite par leurs homologues de l'écotype R.

Pour les deux écotypes B et R, le traitement F a produit une quantité d'azote plus élevée que les autres traitements (Fig. 4.13 et 4.14). Le classement des traitements pour les deux écotypes selon la quantité d'azote produite est le suivant : $F > I1 > I2 > T$. Lorsque les plantes sont cultivées à 7°C, les traitements F et I1 présentent des quantités d'azote non significativement différentes.

La culture des plantes à 7°C au lieu de 9°C s'est traduite par une quantité d'azote total significativement plus faible. La quantité d'azote produite par le traitement F de l'écotype B cultivé à 7°C a été inférieure de 42% à celle produite à 9°C. Cet effet dépressif de la basse température (7°C) a été de l'ordre de 34, 41 et 30% pour les traitements I1, I2 et T, respectivement. Pour l'écotype R, la quantité d'azote produite par les traitements F, I1, I2 et T a été inférieure de 32, 23, 22 et 34%, respectivement lorsque les plantes sont cultivées à 7°C par rapport à 9°C.

La quantité d'azote fixé et la proportion d'azote provenant de la fixation ont été plus élevées pour l'écotype *M. aculeata* 5099 que pour l'écotype *M. rigidula* 716. D'autre part, les souches du traitement I1 (M508 et BZI) des deux écotypes ont présenté une quantité d'azote fixé supérieure à celle observée pour les souches utilisées pour le traitement I2 (M53 et M620). La température de 7°C a significativement réduit la quantité d'azote fixé, la proportion d'azote provenant de la fixation et la quantité d'azote total de la plante.

3. Discussion

Ces essais en conditions contrôlées montrent que le choix de la température limite de 7°C a été judicieux puisque la nodulation n'a pas eu lieu avec certaines associations *Médicus-Sinorhizobium* alors qu'à 9°C des nodosités ont été observées chez toutes les associations. Cette température de 7°C, qui est fréquente en hiver dans le Mashreq et le Maghreb, inhibe ou ralentit la fixation d'azote et l'assimilation du nitrate du sol.

Il convient tout d'abord de remarquer que les résultats observés pour l'écotype *M. aculeata* 5099, au niveau du développement et de la croissance des plantes ainsi que pour l'initiation des nodosités, se reproduisent entre le premier et le deuxième essai. Ceci montre que nos résultats sont fiables et extrapolables pour les conditions de culture contrôlées.

La culture des plantes à 7°C a induit un retard de la formation des nodosités pour toutes les souches testées. Pour le traitement I, la baisse de la température de deux degrés a retardé la formation des nodosités de 2 à 3 jours pour *M. aculeata* 5099, 5 jours pour *M. aculeata* 80 et 2 jours pour *M. rigidula* 716. Cet effet ralentissant des basses températures sur l'initiation des nodosités est déjà documenté dans la littérature. Lors d'un essai en conditions contrôlées, Fyson et Sprent (1982) ont montré que le développement de cordons d'infection sur les racines de la fève a nécessité 24 jours après l'inoculation lorsque les plantes sont cultivées à 10°C par rapport à 8 jours à 18°C. De même, pour des températures comprises entre 17,5°C et 15°C Zhang et Smith (1994) ont rapporté chez le soja que la baisse de la température de la zone rhizosphérique d'un degré retarde le commencement de la fixation d'azote de 5 jours.

L'absence de nodosités (jusqu'à la dernière observation à l'âge de 30 jours) dans le cas du traitement I2 lors de la culture des plantes à 7°C montre que les souches de *Sinorhizobium* isolées des régions froides (souches du traitement I1, notamment M508 et BZI) présentent une meilleure adaptation aux basses températures. Cette variabilité entre les différentes souches de *Sinorhizobium* a été également observée par Roughley (1970) qui a cultivé, sous une gamme de températures, du trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum*) inoculé avec des souches de *Sinorhizobium* d'origine différente. Cet auteur a noté que les deux souches efficaces TA1 et SU297 présentent la même quantité de nodosités à 15°C alors qu'à 7°C seule la souche TA1, isolée d'une région froide, peut former des nodosités.

La culture des plantes sous basses températures induit une baisse de la production de la matière sèche et de la quantité d'azote fixé. L'élaboration de la biomasse sèche et la fixation d'azote ont été significativement inférieures chez les plantes cultivées à 7°C par rapport à celles disposées à 9°C. La réduction induite par la température la plus basse a été plus marquée chez les plantes fertilisées par rapport aux plantes inoculées (notamment le traitement I1). Ces observations concordent avec les données de Roughley et Dart (1970) qui

ont montré que les basses températures réduisent la croissance et la production de la matière sèche du trèfle souterrain qu'il soit inoculé ou non. Toutefois, cet effet des basses températures a été variable selon les souches de *Sinorhizobium* utilisées pour l'inoculation.

Ce travail a permis de mettre en évidence une forte variation entre les écotypes de luzernes annuelles testés. L'écotype *M. aculeata* 5099 présente la meilleure performance sous basses températures au niveau de la production de la matière sèche et la fixation symbiotique d'azote. De même, une forte variabilité au sein des souches de *Sinorhizobium* utilisées a été observée lors de la culture en conditions contrôlées. Les souches M508 et BZI utilisées pour inoculer respectivement les écotypes *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716 ont présenté les meilleures valeurs en terme de production de matière sèche et de quantité d'azote fixé. Ceci montre l'importance de l'efficacité de la souche de *Sinorhizobium* en vue d'obtenir une association *Medicago-Sinorhizobium* de performance satisfaisante. Ce résultat est en accord avec les observations de Brockwell *et al.* (1988) qui ont rapporté que les symbioses efficaces entre *M. rigidula* et *S. meliloti* sont très spécifiques. L'effet de cette spécificité a été mise en évidence par Bowman *et al.* (1998) qui ont isolé sur 48 sites australiens des souches autochtones de *Sinorhizobium* dont les plus efficaces ne présentent que 46% des capacités fixatrices observées chez les souches efficaces identifiées.

Nous avons observé une interaction significative entre écotype de *Medicago* et souche de *Sinorhizobium* pour la nodulation à 7°C (Tableaux 4.2 et 4.5). La présence de cette interaction suggère que les souches utilisées pour inoculer les écotypes à fort potentiel de production (*M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716) sont plus efficaces que les autres. Cette interaction variété-souche pour la sensibilité de la nodulation et de la fixation d'azote aux basses températures avait été observée chez le pois (Lie, 1974) et le soja (Dashti *et al.*, 1997). Il conviendrait donc d'effectuer un criblage de nombreuses souches et d'écotypes pour améliorer la capacité de nodulation en hiver.

L'interaction cultivar-souche pour l'action de la température est confirmée par les mesures d'activité de la nitrogénase (ARA) et de la fixation de l'azote (¹⁵N). D'autre part, la fixation d'azote observée chez les souches du traitement I2 provient probablement de nodosités formées par des souches indigènes de *Sinorhizobium meliloti* après l'âge de 30 jours (auquel la dernière observation a été effectuée).

En ce qui concerne les relations entre photosynthèse et températures basses, des essais préliminaires n'ont pas abouti à des résultats satisfaisants du fait du protocole expérimental : mesures sur une feuille de dimension très faible, ce qui a entraîné une grande variabilité. Des recherches ultérieures devraient reprendre ces investigations à plus grande échelle (plante entière).

CHAPITRE V

DISCUSSION GENERALE

V. DISCUSSION GENERALE

Les systèmes d'élevage des zones marginales de l'arrière-pays du bassin méditerranéen nécessitent du matériel végétal capable de croître en hiver pour fournir du fourrage le plus tôt possible au printemps (Gintzburger *et al.*, 1990).

Les expériences que nous avons menées au champ et en conditions contrôlées ont montré que l'inoculation induit un effet stimulateur sur la croissance et l'élaboration de la matière sèche par rapport aux plantes témoins. De même, l'inoculation a allongé la période de croissance végétative des plantes offrant ainsi une possibilité de pâturage plus long pour le bétail.

Au champ, l'apport d'azote minéral permet une meilleure croissance hivernale des médics par rapport à l'inoculation. Par contre, en chambre de culture à 7°C généralement on n'observe pas de différence pour la matière sèche entre les traitements fertilisés et inoculés (II). Cette différence entre les résultats au champ et ceux obtenus en conditions contrôlées peut être due au fait qu'en chambre de culture l'ensemble de la plante et du sol se trouvent à 7°C, ce qui peut limiter l'absorption de nitrate par les racines et/ou sa réduction par la nitrate réductase des feuilles. Alors qu'au champ la variation rapide des conditions climatiques par élévation brève de la température des feuilles pendant les heures les moins froides (par exemple température minimale -2°C, maximale 16°C mesurées le même jour à Tel Hadya) permet sans doute quelques heures d'activité de la nitrate réductase. Cette explication est appuyée par les données de Zhang et Smith (1994) qui ont montré que l'exposition du système racinaire des plantes de soja à une température de 25°C pendant 12 heures avant de cultiver ces plantes à 15°C accélère le démarrage de la fixation d'azote de 6 jours. La détermination des températures limites pour l'absorption du nitrate des racines, sa réduction dans les feuilles, ainsi que pour l'activité photosynthétique des feuilles chez les médics pourrait constituer une suite logique de ce travail.

La normalisation des données obtenues au champ entre les 2 années (et en conditions contrôlées) en les exprimant en fonction des sommes des températures aurait permis une comparaison plus pertinente des données entre elles.

La confrontation des résultats obtenus au champ à ceux observés en conditions contrôlées indique que l'écotype *M. aculeata* 5099 présente la meilleure performance sous basses températures hivernales parmi les écotypes testés. Cet écotype montre une précocité de développement et une meilleure production de matière sèche pendant la période froide par rapport aux autres écotypes de médics étudiés. Nos résultats confirment des données bibliographiques rapportant que des collectes de légumineuses annuelles au Maroc identifient *M. aculeata* jusqu'à 2200 m d'altitude (Cremer-Bach, 1991). De même, Bounejmate *et al.* (1992) ont préconisé l'utilisation de cette espèce dans les zones méditerranéennes froides. L'écotype *M. rigidula* 716 inoculé par la souche BZI a également présenté une bonne performance notamment en printemps. Ceci est en accord avec les travaux de Cocks et Ehrman (1987) qui ont identifié des écotypes de *M. rigidula* spécifiquement originaires des zones froides du Moyen-Orient. L'utilisation fourragère potentielle de cette espèce dans la rotation céréales-médics en Syrie a d'ailleurs été recommandée par Abd El-Moneim et Cocks (1986). De plus, cet écotype peut être le meilleur candidat pour les projets de production fourragères dans les pays présentant des températures hivernales moins sévères comme la Jordanie ou la Palestine.

En revanche, l'écotype *M. aculeata* 80 n'a pas présenté d'intérêt à cause de sa faible productivité et sa sensibilité aux basses températures que ce soit au champ ou en conditions contrôlées. Ainsi, nos résultats nous permettent de déconseiller cet écotype pour les travaux visant à améliorer la production fourragère en hiver.

Outre la performance prometteuse de l'écotype *M. aculeata* 5099, des essais au champ en Australie ont montré généralement que l'espèce *M. polymorpha* présente la meilleure production fourragère en hiver parmi 13 espèces testées (Crawford *et al.*, 1989). La production de la matière fraîche en hiver de cette espèce varie entre 4 et 58 tonnes ha⁻¹ selon les écotypes alors que cette production oscille entre 3 et 25 tonnes ha⁻¹ pour *M. aculeata* et 1 et 12 tonnes ha⁻¹ pour *M. rigidula* (Crawford *et al.*, 1989). La collection australienne qui comprend 15000 écotypes de luzernes annuelles isolés dans 57 pays montre qu'il est encore possible d'améliorer la production de fourrage en hiver en criblant les écotypes originaires des zones froides.

L'importance de l'efficacité de la souche de *Sinorhizobium* et sa compatibilité avec l'écotype de luzerne a été mise en évidence lors des expériences en conditions contrôlées. Les souches M508 et BZI utilisées respectivement pour inoculer les écotypes *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716 ont présenté des meilleures performances par rapport aux autres souches testées. Le criblage des souches de *Sinorhizobium* permettrait probablement d'obtenir des associations légumineuse-*Sinorhizobium* encore plus tolérantes aux basses températures. Il serait aussi intéressant d'essayer d'isoler d'autres souches tolérantes au froid à partir des régions froides (notamment montagneuses) du bassin méditerranéen afin d'améliorer le comportement de ces associations.

Parmi les facteurs limitant (déficit hydrique, pH du sol élevé, salinité, etc....) que rencontre la production fourragère dans les pays du bassin méditerranéen, les basses températures hivernales restent la contrainte majeure face à la mise en place du "Ley Farming System" à base de luzernes annuelles dans nos régions. En effet, ces plantes sont peu exigeantes en éléments minéraux et plus ou moins adaptées aux conditions du sol local.

L'inoculation de luzernes annuelles avec des souches efficaces de *Sinorhizobium meliloti* a montré un effet prometteur sur la croissance et la fixation d'azote en hiver. Cependant, la réussite de l'inoculation et ainsi du système Ley Farming nécessite d'assurer la survie des souches bactériennes étant donné le coût économique et la difficulté technique d'effectuer l'inoculation de façon fréquente.

D'autre part, l'introduction massive de certaines souches efficaces vis-à-vis des luzernes annuelles pourrait présenter des dangers pour d'autres légumineuses. En effet, ces souches peuvent remplacer ou affecter des souches de *S. meliloti* installées dans le sol et efficaces avec certaines espèces. Il serait ainsi nécessaire avant d'introduire les souches sélectionnées d'étudier l'interaction de ces souches avec d'autres espèces présentes au champ afin d'éviter les effets négatifs que cette introduction peut présenter pour les autres associations Légumineuse-*S. meliloti*.

CHAPITRE VI

***CONCLUSIONS GENERALES
ET PERSPECTIVES***

VI. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet qui vise à étudier l'effet des basses températures sur la croissance et l'efficacité de la fixation d'azote chez plusieurs associations luzerne annuelle-*Sinorhizobium* dans le contexte de la valorisation des parcours à ovins des zones marginales de la Syrie. Nous avons étudié la performance au niveau de la fixation d'azote et de la production de matière sèche de trois associations à base de médics et de souches de *Sinorhizobium* sélectionnées (*M. aculeata* 80 x M620, *M. aculeata* 5099 x M508 et *M. rigidula* 716 x BZI). Ces expériences ont été effectuées au champ sur le site de l'ICARDA à Alep pendant deux ans. Pour valider les résultats dégagés de ces expériences de terrain et trouver les meilleures souches adaptées aux écotypes concernés, nous avons étudié en conditions contrôlées la croissance et la fixation d'azote de ces écotypes inoculés chacun par deux souches différentes de *Sinorhizobium*.

Des variations génétiques ont été observées entre les différents écotypes testés. L'écotype *M. aculeata* 5099 a présenté les meilleures performances pendant la période froide en terme de production de matière sèche et de quantité d'azote fixé. Cependant, grâce à sa bonne croissance printanière, l'écotype *M. rigidula* 716 a légèrement dépassé *M. aculeata* 5099 à la maturité physiologique. Toutefois, l'écotype *M. aculeata* 5099 reste le meilleur candidat capable de satisfaire les besoins fourragers en hiver grâce à son développement rapide, sa précocité d'élaboration de la matière sèche et sa croissance érigée. Les données obtenues sur nos parcelles expérimentales extrapolées à l'hectare donnent des valeurs de production sur des parcelles semées allant de 3,7 à 4,3 tonnes de matière sèche ha⁻¹ pour *M. aculeata* 5099 selon les conditions climatiques de l'année. Ces chiffres montrent qu'il existe un potentiel de production fourragère intéressant qui mérite d'être valorisé à l'avenir. Les biomasses produites dans nos conditions sont comparables à celles mentionnées par d'autres auteurs (Cocks et Ehrman, 1987) dans d'autres situations méditerranéennes.

L'inoculation des plantes a exercé un effet similaire à celui de la fertilisation azotée. L'inoculation a accéléré le développement des plantes aux premiers stades de la culture et a rallongé la période de croissance végétative. De plus, elle a augmenté l'expansion de la surface foliaire et l'élaboration de la matière sèche. Les valeurs obtenues pour les plantes inoculées ont été proches de celles des traitements fertilisés. La proportion d'azote provenant

de la fixation a été élevée par rapport aux données de la bibliographie (Papastilianou, 1987) puisqu'elle a atteint 85 et 87% respectivement pour les écotypes *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716 en 1999. Cette forte proportion d'azote provenant de la fixation peut résulter de la faible quantité en azote minéral des sols utilisés. La quantité d'azote fixé au champ en 1999 a été de l'ordre de 109 et 113 kg ha⁻¹ pour *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716, respectivement. Cette quantité d'azote représente un intérêt considérable au niveau agronomique et économique puisque l'apport d'engrais azotés n'est pas pratiqué actuellement dans les zones marginales pour des raisons économiques et techniques.

Cependant, les souches utilisées ont présenté des degrés variables de tolérance aux basses températures hivernales. Pour l'écotype *M. aculeata* 80 les deux souches utilisées (M53 et M620) ont été sensibles aux basses températures. Elles ne présentent donc pas d'intérêt pour des travaux ultérieurs impliquant des associations *Medicago-Sinorhizobium* tolérantes au froid. En revanche, les souches M508 et BZI ont montré les meilleurs résultats pour les écotypes *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716, respectivement. Ces deux souches représentent de ce fait des bons candidats susceptibles d'améliorer la production fourragère hivernale et printanière.

Les basses températures ralentissent le rythme de développement des plantes et réduisent l'élaboration de la matière sèche. Néanmoins, nos résultats montrent que la fixation d'azote existe en hiver bien qu'elle reste faible aux températures les plus basses. Avec un choix judicieux d'écotype et de *Sinorhizobium*, on peut augmenter fortement cette fixation. Par ailleurs, un semis avec les premières pluies en octobre ou même en novembre permettrait d'augmenter considérablement la durée de végétation et donc la quantité d'azote fixé.

Ce travail a mis en évidence la possibilité d'augmenter la fixation d'azote et d'améliorer ainsi la production fourragère surtout pendant l'hiver sans avoir à utiliser des engrais azotés. Ce résultat est important aux niveaux agro-économique, environnemental et social étant donné les difficultés que l'on rencontre lorsqu'il s'agit d'exploiter les terrains marginaux dans l'arrière-pays. La version australienne du système Ley Farming a échoué en zones méditerranéennes à cause d'un certain nombre de difficultés, et en particulier la faible adaptation des variétés introduites (essentiellement *M. truncatula*). Cependant, il existe des écotypes capables de remplacer *M. truncatula* grâce à leur tolérance aux basses températures.

Le plus prometteur parmi ces écotypes est *M. aculeata* 5099 qui a présenté une élaboration de matière sèche précoce et satisfaisante en hiver, pouvant ainsi contribuer à la nutrition des troupeaux pendant cette période critique. Néanmoins, il faut encore améliorer le fonctionnement de l'association (*M. aculeata* 5099-*Sinorhizobium*) en sélectionnant des souches ayant une bonne efficacité de fixation à basse température.

Ce travail montre l'importance de sélectionner des écotypes de *Medicago* annuelles et des souches de *Sinorhizobium* tolérants aux basses températures. Pour les écotypes, il conviendrait notamment d'étudier le comportement de *M. aculeata* 5099 dans d'autres pays méditerranéens afin de valider nos résultats et examiner le comportement de cet écotype dans des milieux variables notamment en ce qui concerne la nature du sol. Il est cependant important aussi de continuer à tester d'autres écotypes de luzernes annuelles (par exemple *M. rotata* et *M. polymorpha*) afin d'élargir la gamme d'écotypes tolérants au froid. Le criblage des écotypes originaires des régions froides dans la collection australienne de luzernes annuelles, qui atteint 15000 écotypes rassemblés de 57 pays (Crawford *et al.*, 1989), pourrait donner des résultats prometteurs. En ce qui concerne le *Sinorhizobium*, la souche M508 utilisée pour inoculer *M. aculeata* 5099 a montré un comportement prometteur sous basses températures hivernales. Cependant, il paraît indispensable de continuer à tester d'autres souches en vue d'améliorer la tolérance des associations luzernes annuelles-*Sinorhizobium* aux basses températures, notamment pour l'écotype *M. rigidula* 716.

Nos résultats ont montré que l'inoculation peut apporter aux cultures une quantité importante d'azote dépassant parfois 100 kg N ha⁻¹. De plus, la proportion d'azote provenant de la fixation a été particulièrement élevée par rapport aux résultats de la littérature. Il serait ainsi pertinent de déterminer la proportion d'azote provenant de la fixation et la quantité d'azote fixé par ces mêmes écotypes dans des conditions climatiques variables et dans différents types du sol afin d'affiner nos observations. De même, il est intéressant d'évaluer la quantité d'azote fixé issue des souches autochtones puisqu'il est possible d'avoir une interaction entre la souche utilisée comme inoculum et les souches indigènes du sol. Nous pourrions déterminer l'efficacité de l'inoculation en quantifiant par immunofluorescence la présence des bactéries inoculées par rapport aux souches indigènes au niveau du système fixateur.

La réussite des efforts actuels visant à augmenter la production fourragère dans les zones marginales des pays méditerranéens ne peut avoir lieu qu'en présence d'écotypes de luzernes annuelles auto-régénérants et de souches de *Sinorhizobium* viables et possédant la qualité de survivre l'assolement céréales-médics et les conditions du milieu. Il est ainsi indispensable d'assurer ces deux paramètres lors de l'application du savoir-faire au terrain afin de garantir la durabilité du système Ley Farming. Au cas où l'autorégénération des écotypes et la survie des souches ne sont pas assurées, ce système peut échouer à cause du coût élevé de l'inoculation de façon fréquente. Cette étude montre un potentiel prometteur de l'inoculation mais il reste à vérifier la faisabilité technique et la rentabilité économique de l'inoculation sur le terrain.

La présence d'écotypes possédant une capacité photosynthétique satisfaisante sous basses températures hivernales représente une étape majeure vers l'obtention d'associations capables de croître et de fixer l'azote en ces conditions. La température limite pour le fonctionnement de la photosynthèse chez les luzernes annuelles mérite ainsi d'être établie étant donné l'importance de cette source d'énergie pour le fonctionnement des nodosités et la fixation d'azote.

Il serait ainsi souhaitable de reprendre des études plus fines lors de la période critique hivernale mettant en relation la température, la photosynthèse, l'absorption du nitrate, l'activité nitrate réductase des feuilles et la fixation d'azote.

En définitive, nos résultats permettent d'envisager la mise en place d'un projet visant à améliorer la production fourragère en hiver dans les pays méditerranéens. Un pays exemplaire pour l'application de ce type de projet est la Palestine qui n'a pas profité jusqu'à présent des projets initiés dans des pays voisins. Les surfaces montagneuses de ce pays présentent un potentiel d'expansion assez important pour développer la production animale. Une coopération entre le ministère d'agriculture palestinien et des organismes de recherche internationaux comme l'ICARDA et la FAO pourrait permettre la mise en valeur des vastes surfaces marginales non exploitées actuellement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El-Moneim A.M., Cocks P.S., 1986.** Adaptation of *Medicago rigidula* to a cereal-pasture rotation in north-west Syria. *Journal of Agricultural Science* 107, 179-186.
- Abdelguerfi A., 1993.** The use of annual medics in pasture systems in Algeria. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), *Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International Workshop, Perugia, Italy*, pp. 135-143.
- Abdelguerfi A., Chapot J.Y., Conesa A.P., 1988.** Contribution à l'étude de la répartition de luzernes annuelles spontanées en Algérie selon certains facteurs du milieu. *Fourrages* 113, 89-106.
- Beck D.P., Materon L.A., Afandi F., 1993.** Practical *Rhizobium*-legume technology manual. Technical manual no. 19. ICARDA, Aleppo, Syria, pp. 389.
- Bezdicek D.F., Evans D.W., Abeda B., Witters R.E., 1978.** Evaluation of peat and granular inoculum for soybean yield and N₂ fixation under irrigation. *Agronomy Journal* 70, 865-868.
- Bigot J., Boucaud J., 1994.** Low-temperature pretreatment of the root system of *Brassica rapa* L. plants: effects on the xylem sap exudation and on the nitrate absorption rate. *Plant, Cell and Environment* 17, 721-729.
- Bole J.B., Rennie R.J., 1983.** Comments on paper "Estimation of nitrogen fixation by isotope dilution in field and greenhouse experiments" by Broadbent *et al.* (1982). *Agronomy Journal* 75, 717.
- Bounejmate M., Beale P.E., Robson A.D., 1992.** Annual *Medicago* species in Morocco. I. Species and their abundance. *Australian Journal of Agricultural Research* 43, 739-749.
- Bowman A.M., Hebb D.M., Munnich D.J., Brockwell J., 1998.** *Rhizobium* as a factor in the re-establishment of legume-based pastures on clay soils of the wheat belt of north-western New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38(6), 555-566.
- Bowen G.D., Kennedy M.M., 1959.** Effect of high soil temperature on *Rhizobium* spp. *Queensland Journal of Agricultural Research* 16, 177-197.
- Brockwell J., Halliday R.A., Daoud D.M., Materon L.A., 1988.** Symbiotic characteristics of a *Rhizobium*-specific annual medic, *Medicago rigidula* (L.) All. *Soil Biology and Biochemistry* 20, 593-600.

- Butler J.H.A., 1988.** Growth and N₂ fixation by field grown *Medicago littoralis* in response to added nitrate and competition from *Lolium multiflorum*. *Soil Biology and Biochemistry* 20, 863-868.
- Carter E.D., 1978.** A review of the existing and potential role of legumes in the farming systems of Near East and North African region. A report to ICARDA, Aleppo, Syria, pp. 120.
- Chalk P., 1985.** Estimation of N₂ fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ¹⁵N enrichment and their application. *Soil Biology and Biochemistry* 17(4), 389-410.
- Chatterton B., Chatterton L., 1984.** Alleviating land degradation and increasing cereal and livestock production in North Africa and the Middle East using annual *Medicago* pasture. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 11, 117-129.
- Cocks P.S., 1989.** Seed production and seed survival under grazing of annual medics (*Medicago* spp.) in north Syria. *Journal of Agricultural Science* 110(3), 455-463.
- Cocks P.S., 1993.** ICARDA's approach to introducing Ley Farming. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), *Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International Workshop, Perugia, Italy*, pp. 165-172.
- Cocks P.S., Ehrman T.A.M., 1987.** The geographic origin of frost tolerance in Syrian pasture legumes. *Journal of Applied Ecology* 24, 673-683.
- Cocks P.S., Mawlawi B., Sawmy-Edo H., 1993.** Introduction of Ley Farming in Syrian villages. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), *Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International Workshop, Perugia, Italy*, pp. 52-64.
- Corbin E.J., Brockwell J., Gault R.R., 1977.** Nodulation studies on chickpea. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 17, 126-134.
- Crawford E.J., Lake A.W.H., Boyce K.G., 1989.** Breeding annual *Medicago* species for semiarid conditions in Southern Australia. *Advances in Agronomy* 42, 399-437.
- Cremer-Bach M., 1991.** Sélection des écotypes locaux de *Medicago* spp. Annuelles pour sols acides au Maroc. In: Amine M. (Ed.), *Proceedings « Ley Farming », Rabat, Maroc*, pp. 113-120.
- Dart P.J.D., Day J.M., 1971.** Effect of incubation temperature and oxygen tension on nitrogenase activity and legume root nodules. *Plant and Soil, Special Volume*, 167-184.

- Dashti N., Zhang F., Hynes R., Smith D.L., 1997.** Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. *Plant and Soil* 188(1), 33-41.
- Dilworth M.J., 1966.** Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica and Biophysica Acta* 127, 285-294.
- Doolette J.B., 1976.** The strategy of establishing a crop rotation programme using forage legumes. In: Proceedings of the Third Regional Wheat Workshop, Tunis, CYMMIT, Mexico, pp. 243-251.
- Drevon J.-J., Heckmann M.-O., Soussana J.-F., Salsac L., 1988.** Inhibition of nitrogen fixation by nitrate assimilation in legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Physiology and Biochemistry* 26(2), 197-203.
- Dunne T.C., Shier F.L., 1934.** A modified rotation for the wheat belt. *Journal of Agriculture of Western Australia* 11, 254-260.
- Eckard R.J., Francks D.R., 1998.** Strategic nitrogen fertilizer use on perennial ryegrass and white clover pasture in north-western Tasmania. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38, 155-160.
- Ek-Jandér J., Fåhraeus G., 1971.** Adaptation of Rhizobium to subarctic environment in Scandinavia. *Plant and Soil, Special Volume*, 129-137.
- FAO, 2000.** FAO Statistical databases of primary agricultural production in 1999. Electronic edition. FAO, Rome, Italy.
- Francis C.M., Katznelson J.S., 1977.** Observations on the distribution and ecology of subterranean clover, some other clovers, and medics in Greece and Crete. *Australian Plant Introduction Review* 12, 17-25.
- Fyson A., Sprent J.I., 1982.** The development of primary root nodules on *Vicia faba* L. grown at two root temperatures. *Annals of Botany* 50, 681-692.
- Gibson A.H., 1971.** Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. *Plant and Soil, Special Volume*, 139-152.
- Gibson A.H., 1977.** The influence of the environment and managerial practices on the legume-Rhizobium symbiosis. In: Hardy R.W.F., Gibson A.H., (Eds.), *A treatise on dinitrogen fixation*. John Wiley-Interscience, New York, USA, pp. 393-438.
- Gintzburger G., 1994.** Durabilité du développement fourrager et pastoral, et ressources phyto-génétiques en zones méditerranéennes semi-arides et arides. In: Tazi M., Gharbaoui A.,

- (Eds.), Actes « Production Fourragères et ressources phytogénétiques au Maghreb », INRA Maroc, pp. 51-77.
- Gintzburger G., Rochon J.J., Conesa A.P., 1990.** The French Mediterranean zones: Sheep rearing systems and the present and potential role of pasture legumes. In: Osman A.E., Ibrahim H., Jones M.A. (Eds.), The role of legumes in the farming systems of the Mediterranean areas. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 179-194.
- Gladstones J.S., Collins W.J., 1983.** Subterranean clover as a naturalized plant in Australia. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* 44, 21-27.
- Halse N.J., 1993.** Australian attempts to introduce the Ley Farming System to West Asia and North Africa. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International Workshop, Perugia, Italy, pp. 1-14.
- Halse S.A., Trevenen H.J., 1985.** Damage to medic pastures by skylarks in north-western Iraq. *Journal of Applied Ecology* 22, 337-346.
- Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C., 1968.** The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43, 1185-1207.
- Hardarson G., Bliss F.A., Cigales-rivero M.R., Henson R.A., Kipe-Nolt J.A., Longeri L., Manrique A., Peña-Cabriaes J.J., Pereira P.A.A., Sanabria C.A., Tsai S.M., 1993.** Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. *Plant and Soil* 152, 59-70.
- Hartwig U.A., Heim I., Lüscher A., Nösberger J., 1994.** The nitrogen-sink is involved in the regulation of nitrogenase activity in white clover after defoliation. *Physiologia Plantarum* 92, 375-382.
- Hatch D.J., Macduff J.H., 1991.** Concurrent rates of N₂ fixation, nitrate and ammonium uptake by white clover in response to growth at different root temperatures. *Annals of Botany* 67, 265-274.
- Herridge D.F., Bergersen F.J., Peoples M.B., 1990.** Measurement of nitrogen fixation by soybean in the field using ureide and natural abundance methods. *Plant Physiology* 93, 708-716.
- Herridge D.F., Rupela O.P., Serraj R., Beck D.P., 1994.** Screening techniques and improved biological nitrogen fixation in cool season food legumes. *Euphytica* 73, 95-108.

- Høgh-Jensen H., Schjoerring J.K., 1994.** Measurement of biological dinitrogen fixation in grassland: Comparison of the enriched ^{15}N dilution and the natural ^{15}N abundance methods at different nitrogen application rates and defoliation frequencies. *Plant and Soil* 166, 153-163.
- Hoglund J.H., 1979.** Temperature effects on the nitrogen nutrition of legumes. *Proceedings Agronomy Society of New Zealand* 9, 55-58.
- Jaritz G., 1982.** Amélioration des herbages et cultures fourragères dans le Nord-Ouest de la Tunisie : Etude particulière des prairies de trèfles-graminées avec *Trifolium subterraneum*. *GTZ-Eschborn* 119, 340 p.
- Jones F.R., Tisdale W.B., 1921.** Effect of soil temperature upon the development of nodules on the roots of certain legumes. *Journal of Agricultural Research* 22, 17-37.
- Kerley S.J., Jarvis S.C., 1999.** The use of nitrogen-15 natural abundance in white clover (*Trifolium repens* L.) to determine nitrogen fixation under different management practices. *Biology and Fertility of Soils* 29, 437-440.
- Laperrière C., 1984.** Etude de la fixation de l'azote par le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) : Aspects biologiques et agronomiques. Thèse de doctorat de l'INPL, Nancy, France, pp. 99.
- Layzell D.B., Rochmann P., Canvin D.T., 1984.** Low temperatures and nitrogenase activity in soy bean. *Canadian Journal of Botany* 62, 965-971.
- Ledgard S.F., Steele K.W., 1992.** Biological nitrogen fixation in mixed legume-grass pastures. *Plant and Soil* 141, 137-153.
- Le Houérou H.N., 1969.** La végétation de la Tunisie steppique (avec référence aux végétations analogues d'Algérie, de Libye et du Maroc). *Annales de l'INRA de Tunisie* 42(5), 622.
- Le Houérou H.N., 1989.** Classification écoclimatique des zones arides (s.l.) de l'Afrique du Nord. *Ecologia Mediterranea* 15(3/4), 95-144.
- Lie T.A., 1971.** Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. In: Lie T.A. (Ed.), *Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, pp. 117-127.
- Lie T.A., 1974.** Environmental effects on nodulation and symbiotic nitrogen fixation. In: Quispel A. (Ed.), *The biology of nitrogen fixation*. North Holland, Amsterdam, The Netherlands, pp. 555-582.
- Lindemann W.C., Ham G.E., 1979.** Soybean plant growth, nodulation, and nitrogen fixation as affected by root temperature. *Soil Science Society of America Journal* 43, 1134-1137.

- Lynch D.H., Smith D.L., 1993.** Soybean (*Glycine max*) nodulation and N₂ fixation as affected by exposure to a low root-zone temperature. *Physiologia Plantarum* 88, 212-220.
- Maatougui M.E.H., 1993.** Constraints to the Ley Farming System in Algeria. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), *Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International Workshop, Perugia, Italy*, pp. 127-134.
- Macduff J.H., Gordon A.J., Ryle G.J.A., Powell C.E., 1989.** White clover N₂ fixation in response to root temperature and nitrate. I. Growth and uptake of nitrate from flowing nutrient solutions. *Journal of Experimental Botany* 40(214), 517-526.
- Materon L.A., 1993.** Constraints to nodulation of annual medics by indigenous populations of *Rhizobium meliloti* in West Asian soils. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), *Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International Workshop, Perugia, Italy*, pp. 192-202.
- Materon L.A., Cocks P.S., 1988.** Constraints to biological nitrogen fixation in ley-farming systems designed for West Asia. In: Murrell I.R., Kennedy W.G. (Eds.), *Microbiology in action*. John Wiley and Sons, New York, USA, pp. 93-106.
- Materon L.A., Ryan J., 1995.** Rhizobial inoculation and phosphorus and zinc nutrition for annual medics adapted to Mediterranean environments. *Agronomy Journal* 87, 692-698.
- Mathews D.J., Hayes P., 1982.** Effect of root zone temperature on early growth, nodulation and nitrogen fixation in soya beans. *Journal of Agricultural Science* 98, 371-376.
- McKnight T., 1949.** Efficiency of isolates of *Rhizobium* in the cowpea group, with proposed additions to this group. *Queensland Journal of Agricultural Science* 6, 61-76.
- McNeill A.M., Wood M., 1990.** ¹⁵N estimates of nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens* L.) growing in a mixture with ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant and Soil* 128, 265-273.
- McWilliams J.R., 1988.** Striving for sustainability in dryland farming: the Australian experience. In: *Proceedings of the International Conference on Dryland Farming, Amarillo-Bushland, Texas, USA*, pp. 45-49.
- Minchin F.R., Witty J.W., Sheehy J.E., Muller M., 1983.** A major error in the acetylene reduction assay: decreases nodular nitrogenase activity under assay conditions. *Journal of Experimental Botany* 34, 641-649.
- Nautiyal C.S., 1997.** A method for selection and characterization of rhizosphere-competent bacteria of chickpea. *Current Microbiology* 34, 12-17.

- Nazari-Dashlibrown P., 1993.** The potential of medic-based Ley Farming: Constraints and recommendations for implementation within Iran. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), *Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International Workshop, Perugia, Italy*, pp. 86-97.
- Nordblom T.L., 1993.** Ley farming in the Mediterranean from an economic point of view. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), *Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International Workshop, Perugia, Italy*, pp. 144-164.
- Nordblom T.L., Shomo F., Gintzburger G., 1995.** Rangeland and rising feed deficits in West Asia and North Africa. In: *Proceedings of the Fifth International Rangeland Congress, Salt Lake City, Utah, USA*, pp. 399-400.
- Obaton M., 1993.** Mise au point de la technique de mesure de la fixation biologique de l'azote sur Légumineuses cultivées en pots et au champ par l'activité réductrice d'acétylène (ARA). INRA, Montpellier, France, 28 p.
- Obaton M., Materon L., Zaklouta M., Gintzburger G., 1996.** Effect of low temperature on the nitrogen nutrition of annual medics: Preliminary results. In: Genier G., Prosperi J.M., (Eds.), *Le Genre *Medicago* en Méditerranée: Bilan et perspective de la recherche, FAO/CIHEAM Réseau Méditerranéen « Pâturage et cultures fourragères », Options Méditerranéennes 18*, 103-112.
- Papastylianou I., 1987.** Effect of preceding legume or cereal on barley grain and nitrogen yield. *Journal of Agricultural Science* 108, 623-626.
- Papastylianou I., 1993.** Nitrogen fixation by medics and their role in rotations and in marginal areas in Cyprus. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), *Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International Workshop, Perugia, Italy*, pp. 99-105.
- Paquin R., Bernier-Cardou M., Castonguay Y., 1987.** Influence de l'humidité du sol, de la température et de la durée du gel sur la survie de la luzerne. *Canadian Journal of Plant Science* 67, 765-775.
- Pate J.S., 1961.** Temperature characteristics of bacterial variation in legume symbiosis. *Nature* 192, 637-639.
- Peoples M.B., Ladha J.K., Herridge D.F., 1995.** Enhancing legume N₂ fixation through plant and soil management. *Plant and Soil* 174, 83-101.

- Peoples M.B., Gault R.R., Scammell G.J., Dear B.S., Virgona J., Sandral G.A., Paul J., Wolfe E.C., Angus J.F., 1998.** Effect of pasture management on the contributions of fixed N to the N economy of ley-farming systems. *Australian Journal of Agricultural Research* 49, 459-474.
- Peters N.K., Verma D.P.S., 1990.** Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3, 4-8.
- Plancquaert P., 1968.** La culture de la luzerne en vue de la production de fourrage. I.T.C.F., No. 18.
- Prosperi J.M., 1993.** Selection of annual medics for French Mediterranean regions. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), *Introducing ley-farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International workshop, Perugia, Italy*, pp. 173-191.
- Prosperi J.M., Gensolen V., Olivieri I., Mansat P., 1989.** Observation sur la répartition et l'écologie de luzernes annuelles et de trèfle souterrain en Corse. XVI^e Congrès International des Herbages, Nice, France, pp. 295-296.
- Prosperi J.M., Boumard P., Angevain M., Mansat P., 1991.** Répartition et adaptation écotypique de *Medicago* spp. Annuelles en Méditerranée occidentale. IV^e Congrès International des Terres de Parcours, Montpellier, France, pp. 413-416.
- Puckridge D.W., French R.J., 1983.** The annual legume pasture in cereal-Ley Farming systems of Southern Australia: A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 9, 229-267.
- Reid R., Konopka J., Rihan J.R., 1993.** Needs and priorities for further collection of annual medic germplasm. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), *Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International Workshop, Perugia, Italy*, pp. 252-270.
- Rennie R.J., 1979.** Comparison of ¹⁵N-aided methods for determining symbiotic dinitrogen fixation. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 16, 455-463.
- Rennie R.J., 1982.** Quantifying dinitrogen (N₂) fixation in soybeans by ¹⁵N isotope dilution: The question of the nonfixing control plant. *Canadian Journal of Botany* 60, 856-861.
- Rennie R.J., Dubetz S., 1986.** Nitrogen -15-determined nitrogen fixation in field-grown chickpea, lentil, fababean, and fieldpea. *Agronomy Journal* 78, 654-660

- Rennie R.J., Kemp G.A., 1982.** Dinitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* at low temperatures: interaction of temperature, growth stage and time of inoculation. Canadian Journal of Botany 60, 1423-1427.
- Riveros F., Crespo D., Ben Ali M.N., 1993.** Constraints to introducing Ley Farming System in the Mediterranean Basin. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International Workshop, Perugia, Italy, pp. 15-22.
- Robson A.D., 1969.** Soil factors affecting the distribution of annual medic species. Journal of the Australian Institute of Agricultural Science 35, 154-167.
- Rome, 1996.** Diversité génétique et fonctionnelle des *Rhizobium* isolés de *Medicago truncatula*. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard, Lyon, France.
- Roughley R.J., 1970.** The influence of root temperature, *Rhizobium* strain and host selection on the structure and nitrogen-fixing efficiency of the root nodules of *Trifolium subterraneum*. Annals of Botany 34, 631-646.
- Roughley R.J., Dart P.J., 1970.** Growth of *Trifolium subterraneum* L. selected for sparse and abundant nodulation as affected by root temperature and *Rhizobium* strain. Journal of Experimental Botany 21(68), 776-786.
- Roughley R.J., Date R.A., 1986.** The effect of strain of *Rhizobium* and of temperature on nodulation and early growth of *Trifolium semipilosum*. Experimental Agriculture 22, 123-131.
- Ryan J., Masri S., Garabet S., Diekmann J., Habib H., 1997.** Soils of ICARDA's agricultural experimental stations and sites: Climate, classification, physical and chemical properties, and land use. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria, 107 p.
- Saunders D.A., 1976.** Early management issues in establishing wheat-forage legume rotations. Proceedings of the 2nd Scientific Conference, Scientific Research Foundation, Baghdad, Iraq, pp. 15.
- Schubert K.R., Evans M.J., 1976.** Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proceedings of the National Academy of Science, USA, 73, 1207-1211.
- Seklani H., Hassen H., 1990.** Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Medicago* en Tunisie. Annales de l'INRA de Tunisie 63(20), 3-15.

- Smith D., 1970.** Influence of temperature on the yield and chemical composition of five forage legume species. *Agronomy Journal* 62, 520-523.
- Smith R.S., 1987.** Production and quality of inoculants. In: Elkan G.H. (Ed.), *Symbiotic nitrogen fixation technology*. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 391-411.
- Stacey G., Sanjuen J., Luka S., Dockendorff T., Carlson R.W., 1995.** Signal exchange in the *Bradyrhizobium*-soybean symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 473-483.
- Vance C.P., Heichel G.H., 1991.** Carbon in N₂ fixation: Limitation or exquisite adaptation? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 373-392.
- Verma D.P.S., 1992.** Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* 4, 373-382.
- Walsh K.B., Layzell D.B., 1986.** Carbon and nitrogen assimilation and partitioning in soybeans exposed to low root temperatures. *Plant Physiology* 80, 249-255.
- Wani S.P., Rupela O.P., Lee K.K., 1995.** Sustainable agriculture in semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil* 174(1-2), 29-49.
- Webber G.D., 1993.** Extension of Ley Farming in the Mediterranean basin. In: Christiansen S., Materon L., Falcinelli M., Cocks P. (Eds.), *Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin*. Proceedings of an International Workshop, Perugia, Italy, pp. 165-172.
- Zhang F., Smith D.L., 1994.** Effects of low root zone temperatures on the early stages of symbiosis establishment between soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] and *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Experimental Botany* 45(279), 1467-1473.
- Zhang F., Lynch D.H., Smith D.L., 1995.** Impact of low root temperatures in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] on nodulation and nitrogen fixation. *Environmental and Experimental Botany* 35(3), 279-285.
- Zoghlami A., Hassen H., Seklani H., Robertson L., Salkini A.K., 1996.** Distribution des luzernes annuelles en Tunisie centrale en fonction des facteurs édaphiques climatiques. *Fourrages* 145, 5-16.

ANNEXES

Annexe 1

Caractéristiques physico-chimiques des sols du Centre International des Recherches Agronomiques dans les Régions Arides et Semi-arides à Tel-Hadya en 1997-1998.

Granulométrie 5 fractions sans décarbonation (g Kg⁻¹)

Argile (<2 microns)	573
Limon (2-50 microns)	279
Sable (>50)	148

pH à l'eau : 8

Teneur en eau : 7,9%

NH₄-N (ppm) : 2,7

NO₃-N (ppm) : 4,1

Teneur en phosphore méthode Olsen (ppm) : 3,0

Teneur en azote méthode Kjeldahl (ppm) : 964

Teneur en Potassium (ppm) : 360

Matière organique (%) : 1,2

Annexe 2.

Dispositif expérimental de la première expérimentation au champ (saison 1998).

D-BZI	A-M620	R-T	B-M620	B-M508	A-T	R-BZI	D-T	Orge	D-53	A-53	R-53	B-T	D-N	B-N	A-N	R-N
-------	--------	-----	--------	--------	-----	-------	-----	------	------	------	------	-----	-----	-----	-----	-----

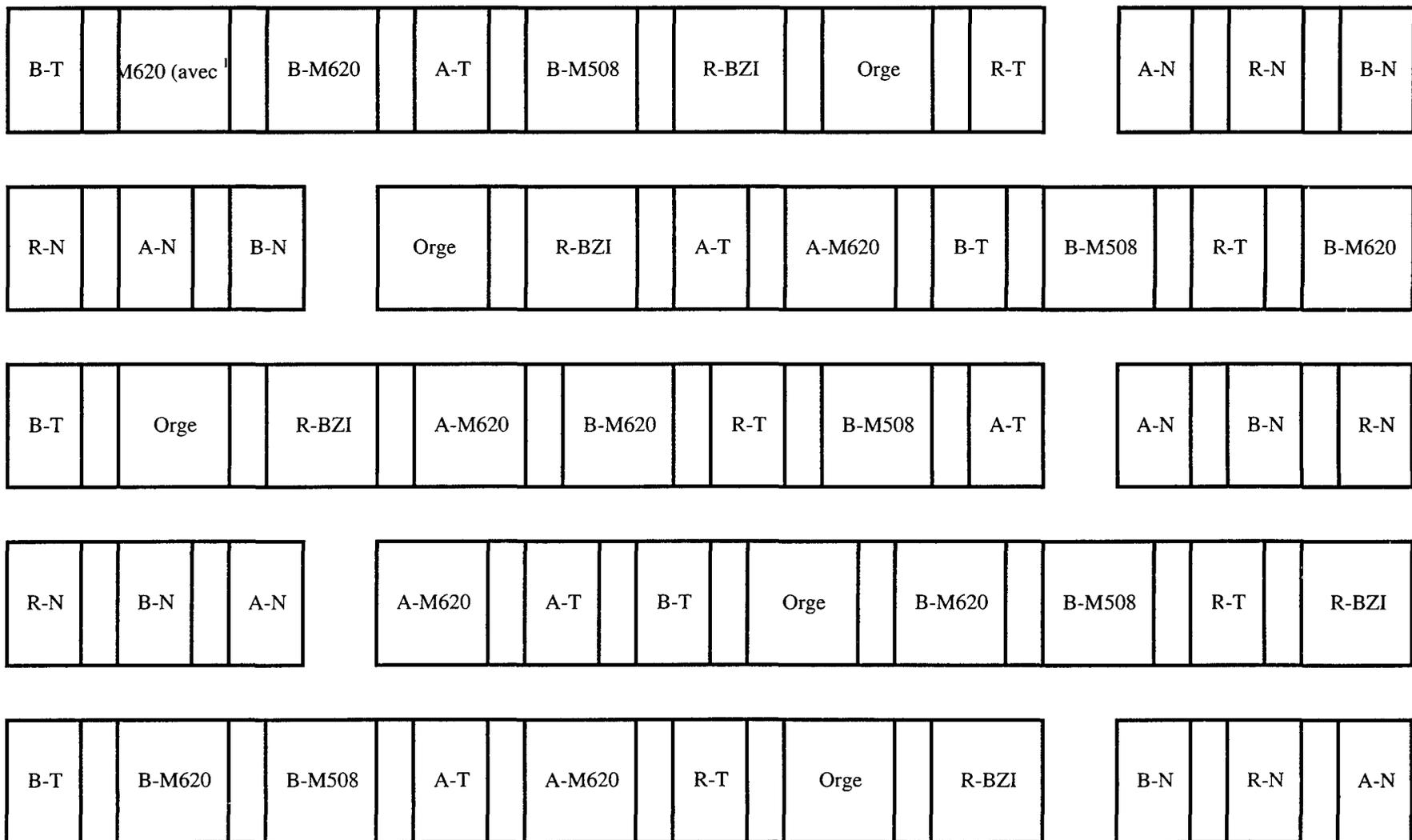
R-N	D-N	B-N	A-N	D-T	B-T	B-M508	R-T	B-M620	D-53	R-53	D-BZI	A-53	Orge	R-BZI	A-T	A-M620
-----	-----	-----	-----	-----	-----	--------	-----	--------	------	------	-------	------	------	-------	-----	--------

B-T	Orge	D-BZI	A-M620	D-T	B-M508	D-53	R-T	B-M620	A-53	R-53	R-BZI	A-T	R-N	A-N	B-N	D-N
-----	------	-------	--------	-----	--------	------	-----	--------	------	------	-------	-----	-----	-----	-----	-----

A-N	B-N	R-N	D-N	A-M620	A-T	D-T	B-T	B-M508	D-53	R-BZI	Orge	B-M620	D-BZI	R-T	A-53	R-53
-----	-----	-----	-----	--------	-----	-----	-----	--------	------	-------	------	--------	-------	-----	------	------

Annexe 3.

Dispositif expérimental de la deuxième expérimentation au champ (saison 1999).



Annexe 4

Plante de référence : (Orge, cultivar Arabi Aswad)

C'est un cultivar à deux rangs qui présente des grains noirs. Etant cultivé sur une surface de 1 500 000 ha, le cultivar Arabi Aswad est le cultivar d'orge le plus cultivé en Syrie. Du fait de sa résistance à la sécheresse, il est essentiellement cultivé dans les zones les plus arides du pays. Il est utilisé pour l'alimentation animale grâce à la production de paille tendre. Cet écotype est tolérant au froid et nécessite une vernalisation pour atteindre le stade productif.

Annexe 5

Echelle de notation des nodosités (d'après Corbin *et al.*, 1977)

Nombre et distribution de nodosités efficaces :

<u>Echelle de notation des nodosités</u>	<u>Couronne</u>	<u>Autres endroits</u>
0	0	0
1	0	peu nombreuses
2	peu nombreuses	0
3	nombreuses	0
4	nombreuses	peu nombreuses
5	nombreuses	nombreuses

Annexe 6

Caractéristiques physico-chimiques de la terre utilisée dans les expérimentations en conditions contrôlées.

Granulométrie 5 fractions sans décarbonation (g Kg⁻¹)

Argile (<2 microns)	303
Limon fin (2-20 microns)	191
Limon grossier (20-50 microns)	104
Sable fin (50-200 microns)	209
Sable grossier (200-2000 microns)	193

Carbone organique Méthode Anne Matière organique (g Kg⁻¹)

Carbone organique	23,4
Matière organique	40,2

pH à l'eau	8
Calcaire (CaCO ₃) Total	27
Phosphore (P ₂ PO ₅) Méthode Olsen	0,142
Capacité d'Echange Cationique Méthode Metson (Cmol ⁺ Kg ⁻¹)	13,4
Potassium (K ₂ O) Echangeable acetate d'ammonium (g Kg ⁻¹)	0,36
Carbone et azote organiques/analyse élémentaire (g Kg ⁻¹)	
Carbone organique	24,26
Azote organique	2,33
Azote nitrique (N de NO ₃) (mg Kg ⁻¹)	4,66
Azote ammoniacal (N de NH ₄) (mg Kg ⁻¹)	1,90

Annexe 7

Détermination de la capacité au champ

Le sol sec, dans des pots troués par le fond, est arrosés avec une quantité abondante d'eau (= 70% du poids sec). Après un drainage pendant 48 heures, les pots sont pesés et le poids d'eau restant dans le sol est déterminé.

La capacité au champ de notre sol est égale à 29% du poids sec du sol.

Poids du pot : 1100 g

Pour ajuster le niveau hydrique à 60% de la capacité au champ, il faut ajouter 195 mL d'eau au sol sec.

Annexe 8**Solution nutritive de McKnight (1949) déficiente en azote**

<u>Produit</u>	<u>Concentration (g L⁻¹)</u>
CaSO ₄	24
MgSO ₄ .7H ₂ O	4
KH ₂ PO ₄	4
KCl	4
FeCl ₃	0,20
MnSO ₄ .H ₂ O	1,54
H ₃ BO ₃	2,80
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
MnCl ₂ .4H ₂ O	2,49
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,021
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,286

Annexe 9

A. Calcul de la quantité d'engrais azoté (sulfate d'ammonium 21,21% N) ajoutée aux pots en conditions contrôlées

- $90 \text{ kg N ha}^{-1} = 90\,000\,000 \text{ mg N ha}^{-1}$
- Poids d'un hectare de sol (à 20 cm de profondeur et 1,8 de poids spécifique)
- $= 100 \times 100 \times 0,2 \times 1,8 \times 1000 = 3\,600\,000 \text{ kg sol}$
- $90\,000\,000 / 3\,600\,000 = 25 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ sol}$
- $25 \times 1,1 \text{ kg sol} = 27,5 \text{ mg N pot}^{-1}$
- $27,5 / 0,2121 = 129,6 \text{ mg de } (\text{NH}_3)_2\text{SO}_4 \text{ pot}^{-1}$

B. Calcul de la quantité d'azoté marqué (sulfate d'ammonium enrichi à %10 en ^{15}N) ajoutée aux pots en conditions contrôlées

- $10 \text{ kg N ha}^{-1} = 10\,000\,000 \text{ mg N ha}^{-1}$
- Poids d'un hectare de sol (à 20 cm de profondeur et 1,8 de poids spécifique)
- $= 100 \times 100 \times 0,2 \times 1,8 \times 1000 = 3\,600\,000 \text{ kg sol}$
- $10\,000\,000 / 3\,600\,000 = 2,777 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ sol}$
- $2,777 \times 1,1 \text{ kg sol} = 3,05 \text{ mg N pot}^{-1}$
- $3,05 / 0,2121 = 14,40 \text{ mg de } ^{15}\text{N}-(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4 \text{ pot}^{-1}$

Annexe 10

Calculs de la quantité de N fixée selon la méthode de la dilution isotopique

1. DMY : Dry matter yield [kg/ha]
2. Total plant nitrogen [totN] = %N * DMY
3. % 15N atom.excess = %15N - 0.3663
4. %NdfF = (% 15N atom.excess legume * 100) / % 15Natom.excess fert.
5. A value = [(100 - % NdfF) / % NdfF] * rate of Fertilizer for legume
6. A reference = [(100 - % NdfF) / % NdfF] * rate of fertilizer
7. A FIX = A value - A reference
8. NdfF = (% NdfF * totN) / 100
9. %FUE = (NdfF * 100) / rate of Fertilizer FUE: fertilizer utilization efficiency
10. NdfFix = [A Fix * %FUE] / 100 NdfFix: amount of N fixed
11. % NdfFix = [NdfFix * 100] / totN
12. NdfS = totN - [NdfF + NdfFix] NdfS: N derived from soil

RESUME

RESUME

Les basses températures hivernales dans les zones méditerranéennes réduisent la production et la fixation d'azote chez les plantes fourragères. L'objectif de cette étude consiste à trouver des écotypes de luzernes annuelles et des souches spécifiques de *Sinorhizobium* tolérant au froid en vue d'établir des associations capables de croître et de fixer l'azote en hiver.

Trois écotypes de luzernes (*M. aculeata* 80, *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716) ont été cultivés en conditions contrôlées et au champ avec trois traitements azotés : fertilisation, inoculation et témoin. Chaque écototype a été inoculé par deux souches de *Sinorhizobium* pour tester l'efficacité des associations cultivées sous basses températures. Nous avons suivi le développement des plantes, la production de la matière sèche, la formation des nodosités et la fixation d'azote.

Nos résultats indiquent une variabilité génétique au niveau de la tolérance au froid des écotypes étudiés. *M. aculeata* 5099 a présenté les meilleures valeurs de biomasse sèche et de fixation d'azote en hiver. Cependant, l'écotype *M. rigidula* 716 a montré les meilleurs résultats à la fin de la culture grâce à sa bonne croissance au printemps. L'inoculation a présenté un effet stimulateur sur la croissance. Les traitements inoculés ont généralement produit une biomasse comparable à celle des plantes fertilisées. La proportion d'azote provenant de la fixation a atteint 85 à 87% pour les écotypes *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716. La spécificité entre *Sinorhizobium* et écototype de luzerne a joué un rôle primordial dans la fixation d'azote puisque les différentes souches ont présenté des degrés variables de tolérance aux basses températures. Les souches M508 pour *M. aculeata* 5099 et BZI pour *M. rigidula* 716 ont présenté les meilleures performances parmi les souches testées.

L'utilisation de *M. aculeata* 5099 inoculé par la souche M508 dans un système d'assolement avec des céréales pourrait contribuer à satisfaire les besoins fourragers en hiver.

Mots-clés : luzernes annuelles, basses températures, nodulation, dilution isotopique, fixation d'azote, climat méditerranéen.

ABSTRACT

ABSTRACT

Low winter temperature in Mediterranean rangelands reduces biomass production and nitrogen fixation in forage plants. The objective of this work was to find efficient associations of medic-*Sinorhizobium* capable to grow and fix nitrogen at low temperature.

We studied the performance of three *Medicago* cultivars: *M. aculeata* accessions 80 and 5099 and *M. rigidula* accession 716 grown in the field and in controlled environment (growth chambers) with three different nitrogen sources. The first treatment was obtained through fertilization while the second was ensured by inoculation of each accession with two strains of *Sinorhizobium meliloti*. A third treatment was neither inoculated nor fertilized and used as a control. Plant development, dry matter production, nodule initiation, and symbiotic nitrogen fixation were investigated.

Our results indicated a genotypic variation in low-temperature tolerance of annual medics. *M. aculeata* 5099 presented the higher dry matter production at early growth stages. However, by physiological maturity *M. rigidula* 716 showed a slightly higher dry matter thanks to the fast spring growth of the latter. Inoculation of annual medics with specific *S. meliloti* strains proved to be beneficial for plants as fertilized and some inoculated plants showed comparable values in terms of dry matter accumulation and nitrogen fixation. The proportion of nitrogen derived from fixation was as high as 85 and 87% for *M. aculeata* 5099 and *M. rigidula* 716. Compatibility between *Medicago* accession and *Sinorhizobium* strain played a key role in nitrogen fixation as the strains differ in their tolerance to low temperatures. M508 for *M. aculeata* 5099 and BZI for *M. rigidula* 716 were the best performers among the tested strains.

The use of *M. aculeata* 5099 inoculated with M508 in rotation with cereals may provide adequate forage production during winter.

Key words: Annual medics, Low temperature, Nodulation, ¹⁵N Isotopic dilution, Nitrogen fixation, Mediterranean conditions.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Michel OBATON, Directeur de Recherche, INRA - Montpellier.

Monsieur Jean-François SOUSSANA, Directeur de Recherche, INRA - Clermont Ferrand.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame SULTAN épouse TUBEILEH Kholoud

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**" Etude du comportement hivernal d'associations luzernes annuelles-rhizobium en région
Méditerranéenne. Elaboration de la matière sèche et fixation d'azote."**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences Agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 03 mai 2001

Le Président de l'I.N.P.L.,

J. HARDY



RESUME

Les basses températures hivernales dans les zones méditerranéennes réduisent la production et la fixation d'azote chez les plantes fourragères. L'objectif de cette étude consiste à trouver des écotypes de luzernes annuelles et des souches spécifiques de *Sinorhizobium* tolérant au froid en vue d'établir des associations capables de croître et de fixer l'azote en hiver.

Trois écotypes de luzernes (*M. aculeata* 80, *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716) ont été cultivés en conditions contrôlées et au champ avec trois traitements azotés : fertilisation, inoculation et témoin. Chaque écotpe a été inoculé par deux souches de *Sinorhizobium* pour tester l'efficacité des associations cultivées sous basses températures. Nous avons suivi le développement des plantes, la production de la matière sèche, la formation des nodosités et la fixation d'azote.

Nos résultats indiquent une variabilité génétique au niveau de la tolérance au froid des écotypes étudiés. *M. aculeata* 5099 a présenté les meilleures valeurs de biomasse sèche et de fixation d'azote en hiver. Cependant, l'écotype *M. rigidula* 716 a montré les meilleurs résultats à la fin de la culture grâce à sa bonne croissance au printemps. L'inoculation a présenté un effet stimulateur sur la croissance. Les traitements inoculés ont généralement produit une biomasse comparable à celle des plantes fertilisées. La proportion d'azote provenant de la fixation a atteint 85 à 87% pour les écotypes *M. aculeata* 5099 et *M. rigidula* 716. La spécificité entre *Sinorhizobium* et écotpe de luzerne a joué un rôle primordial dans la fixation d'azote puisque les différentes souches ont présenté des degrés variables de tolérance aux basses températures. Les souches M508 pour *M. aculeata* 5099 et BZI pour *M. rigidula* 716 ont présenté les meilleures performances parmi les souches testées.

L'utilisation de *M. aculeata* 5099 inoculé par la souche M508 dans un système d'assolement avec des céréales pourrait contribuer à satisfaire les besoins fourragers en hiver.

Mots-clés : luzernes annuelles, basses températures, nodulation, dilution isotopique, fixation d'azote, climat méditerranéen.

ABSTRACT

Low winter temperature in Mediterranean rangelands reduces biomass production and nitrogen fixation in forage plants. The objective of this work was to find efficient associations of medic-*Sinorhizobium* capable to grow and fix nitrogen at low temperature.

We studied the performance of three *Medicago* cultivars: *M. aculeata* accessions 80 and 5099 and *M. rigidula* accession 716 grown in the field and in controlled environment (growth chambers) with three different nitrogen sources. The first treatment was obtained through fertilization while the second was ensured by inoculation of each accession with two strains of *Sinorhizobium meliloti*. A third treatment was neither inoculated nor fertilized and used as a control. Plant development, dry matter production, nodule initiation, and symbiotic nitrogen fixation were investigated.

Our results indicated a genotypic variation in low-temperature tolerance of annual medics. *M. aculeata* 5099 presented the higher dry matter production at early growth stages. However, by physiological maturity *M. rigidula* 716 showed a slightly higher dry matter thanks to the fast spring growth of the latter. Inoculation of annual medics with specific *S. meliloti* strains proved to be beneficial for plants as fertilized and some inoculated plants showed comparable values in terms of dry matter accumulation and nitrogen fixation. The proportion of nitrogen derived from fixation was as high as 85 and 87% for *M. aculeata* 5099 and *M. rigidula* 716. Compatibility between *Medicago* accession and *Sinorhizobium* strain played a key role in nitrogen fixation as the strains differ in their tolerance to low temperatures. M508 for *M. aculeata* 5099 and BZI for *M. rigidula* 716 were the best performers among the tested strains. The use of *M. aculeata* 5099 inoculated with M508 in rotation with cereals may provide adequate forage production during winter.

Key words: Annual medics, Low temperature, Nodulation, ¹⁵N Isotopic dilution, Nitrogen fixation, Mediterranean conditions.