

## SELECTION DE SOUCHES DE *RHIZOBIUM MELILOTI* TOLERANTES A L'ACIDITE DES SOLS POUR LA CULTURE DE *MEDICAGO* SPP.

I. THAMI ALAMI<sup>1</sup>

### SUMMARY

Nodules of six annual *Medicago* species were collected from 103 sites with acidic to neutral soils during collection missions conducted in 1987 and 1988. Among a total of 187 *Rhizobium meliloti* isolates collected, 58 were tolerant to pH 5.3. of which only 24 formed effective nodules when tested on four *Medicago* species (*M. tornata*, *truncatula*, *M. polymorpha* and *M. murex*). In a glasshouse experiment where the 24 strains were used to inoculate the four *Medicago* species grown on three different soils, highly significant response to inoculation was observed with *M. tornata*. For this species, a 100% increase in dry matter yield was observed with inoculation and response to inoculation was observed at a pH as low as 4.2. In general, strains showed different effectiveness with a *Medicago* species and in various soils. There was a high variability in the biological and physiological characteristics of the 24 strains but these were not related to their effectiveness.

**Key words:** Nodulation, *Medicago* spp., acidity, soil, inoculation.

### RESUME

Les nodules de six espèces de *Medicago* annuelles ont été collectées en 1987 et 1988 sur 103 sites à sols acides à neutres. Parmi les 187 isolats de *Rhizobium meliloti* isolées et testées pour leur tolérance à l'acidité, 58 ont montré une tolérance vis à vis du pH 5,3. Les tests d'infectivité, d'efficacité et de spécificité de ces souches vis-à-vis de la plante hôte, réalisés dans des tubes à essai, ont montré que seules 24 souches ont induit efficacement la nodulation chez *Medicago tornata*, *M. truncatula*, *M. polymorpha* et *M. murex*. La réponse à l'inoculation des 24 souches dans un essai en pots avec 3 sols différents a été plus efficace chez *M. tornata* par rapport aux autres espèces. Pour cette espèce végétale, l'inoculation a permis une augmentation moyenne du rendement en matière sèche de 100%. L'efficacité de certaines souches a été notée même dans un sol à pH 4,2. En

<sup>1</sup> INRA/Programme Fourrages, B.P. 415, Rabat

général, les souches ont montré une efficacité variable en fonction du sol et de l'espèce de *Medicago*. Les caractéristiques biologiques et physiologiques des 24 souches présentent une grande variabilité, sans que celle-ci puisse être reliée à leur efficacité.

**Mots clés:** Nodulation, *Medicago* spp., acidité, sols, inoculation.

## INTRODUCTION

Dans l'optique d'intensifier l'assolement et d'augmenter les disponibilités fourragères dans les régions semi-arides du Maroc, une opération de grande envergure intitulée "Ley-farming" a été lancée en 1985/86 (MARA 1986). Cette opération visait l'introduction dans ces régions de prairies temporaires à base de *Medicago* annuelles en rotation avec les céréales.

Lors de la mise en oeuvre de cette opération, une absence totale de nodulation des variétés de *Medicago* annuelles utilisées a été observée sur les sols faiblement acides et acides. Aussi, le Programme Fourrages de l'Institut National de la Recherche Agronomique a entamé à partir de 1987 un programme de sélection de variétés de *Medicago* annuelles et de souches de *Rhizobium meliloti* adaptées aux sols faiblement acides et acides.

Le présent article rapporte les résultats des travaux entrepris en vue de la sélection de souches indigènes de *Rhizobium meliloti* adaptées aux sols acides et faiblement acides au Maroc.

## MATERIEL ET METHODES

Une prospection pour la collecte des nodosités de *Medicago* spp. annuelles dans des sols acides et faiblement acides a été effectuée en novembre-décembre 1987 et en mars-mai 1988 dans différentes régions du Maroc.

Les isolats de *Rhizobium* ont été isolées, purifiées et multipliées sur milieu Yeast mannitol agar (Y.M.A). Elles ont ensuite subi le test de tolérance à l'acidité à pH 5,3 en se servant du milieu 6 (Howieson 1985). Les isolats qui ont une croissance normale à pH 5,3 ont servi de matériel de base pour les essais et les tests ultérieurs. Une caractéristique morphologique des isolats a été déterminée. Les tests d'infectivité, d'efficacité et de spécificité des souches vis-à-vis de la plante hôte ont été effectués dans des tubes avec de la vermiculite contenant 4 espèces de *Medicago* (*M. polymorpha*, *M. truncatula*, *M. tornata* et *M. murex*) et arrosés avec une solution nutritive complète (Mc Knight 1949).

Ce test a été conduit dans des conditions aseptiques pour éviter toute sorte de contamination entre les souches. Ensuite, la réponse de ces quatre dernières espèces de *Medicago* à l'inoculation par les souches sélectionnées a été déterminée dans un essai en serre. Les semences utilisées ont été stérilisées et prégermées aseptiquement. Le sol utilisé n'a pas été stérilisé et provenait de 3 régions différentes: Had Ghoualem (1), Oulmès (2) et El Koudia (3). Ces sols diffèrent par leur pH, leur teneur en matière organique, leur rapport C/N et leurs teneurs en éléments nutritifs (Tableau 1). L'ensemble des pots a été fertilisé avec du phosphore et du potassium. L'apport d'azote a concerné seulement les témoins non inoculés (NT) comparés à un témoin (T) non inoculé et sans fertilisation azotée (Tabl. 1). L'inoculation a été faite en utilisant de l'inoculum liquide (1 ml/plantule). Cet inoculum contenait un minimum de  $2,5 \times 10^8$  cellules/ml.

Les caractéristiques biologiques et physiologiques des souches sélectionnées, à savoir: la vitesse de croissance, l'utilisation de la source d'énergie "Micro-Plate-Test" (Biolog 1992) ainsi que le test de résistance aux antibiotiques ont été également déterminés.

**Tableau 1: Caractéristiques des sols utilisés et fertilisation appliquée**

Caractéristiques	Sols et origines		
	Had Ghoualem (1)	Oulmès (2)	El Koudia (3)
pH (0-20cm) (0,01M KCl)	5,1	4,5	4,2
N (g/kg sol)	1,2	2,8	0,6
C org. (g/kg sol)	12,2	22,4	8,3
C/N	10,2	8,0	13,9
P (ppm)	19	75	24
K (ppm)	174	123	103
Fertilisation (mg/pot) Sol (1)		Sol (2)	Sol (3)
Nitrate d'ammonium (33,5% N)*	168	168	168
Superphosphate** (45 % P2O5)	335	335	335
KCl (60 % K2O)**	250	125	250

\* témoin avec fertilisation azotée (NT) seulement

\*\* tous les pots

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Prospection

Un total de 103 sites ont été échantillonnés. Le pH a varié entre 4,1 et 7,0. La majorité (52 %) des sites avait un pH compris entre 5,6 et 6,5. Environ 24 % des sites ont été caractérisés par un pH allant de 4,1 à 5,5. Un pH situé entre 6,6 et 7,0 a été mesuré sur 24 % des sites.

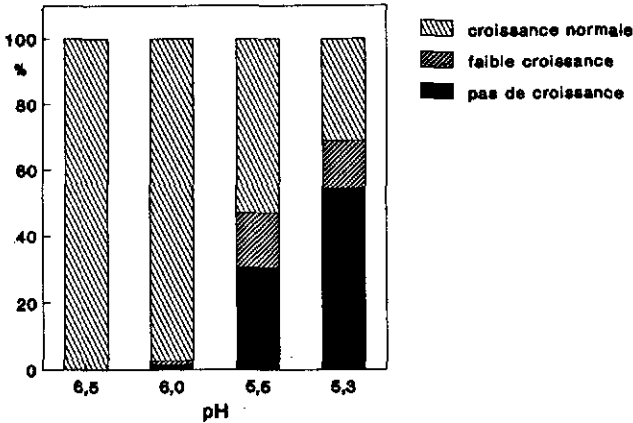
Sur les 103 sites échantillonnés, six espèces de *Medicago* annuelles ont été collectées: *M. aculeata*, *M. minima*, *M. murex*, *M. polymorpha*, *M. truncatula* et *M. tornata*. *Medicago polymorpha* est l'espèce la plus répandue et *M. minima* la moins fréquente.

Quatres espèces ont été collectées dans la classe de pH allant de 4,1 à 5,5: *M. murex*, *M. polymorpha*, *M. truncatula* et *M. tornata*. Dans la classe 5,6 à 6,5, les six espèces de *Medicago* ont été présentes avec une fréquence élevée pour *M. tornata*. Pour les sites à pH se situant entre 6,6 et 7,0 cinq ont été trouvées: *M. aculeata*, *M. minima*, *M. murex*, *M. polymorpha*, et *M. truncatula*.

La présence de *M. murex* et de *M. polymorpha* sur des sites à pH compris entre 4,1 et 5,5 sont en accord avec les observations de Piano *et al.* (1982), de Gillespie (1988) et de Ewing et Howiesson (1989). Ce résultat confirme donc le potentiel de ces deux espèces pour la culture sur des sols acides. Un résultat important qui ressort de cette prospection est la présence de *M. tornata* et de *M. truncatula* sur ces sols acides. Ceci suggère comme l'ont constaté Bounejmate *et al.* (1992) que des possibilités de sélection pour la tolérance à l'acidité du sol existent au sein de ces deux espèces.

### Sélection de *Rhizobium meliloti* pour pH faible au laboratoire

Un total de 187 isolats de *Rhizobium meliloti* ont été isolées à partir des nodules collectées. L'ensemble de ces isolats ont fait l'objet d'un test d'acido-tolérance. Le pourcentage des isolats ayant une croissance normale a été de 100 % à pH 6,5, de 97 % à pH 6,0, de 50 % à pH 5,5 et de 31 % à pH 5,3 (fig. 1). Les 58 isolats qui ont une croissance normale à pH 5,3 ont servi de matériel de base pour les essais et les tests ultérieurs.



**Fig. 1:** Croissance des souches de *Rhizobium* en fonction du pH (en % du témoin à pH 7)

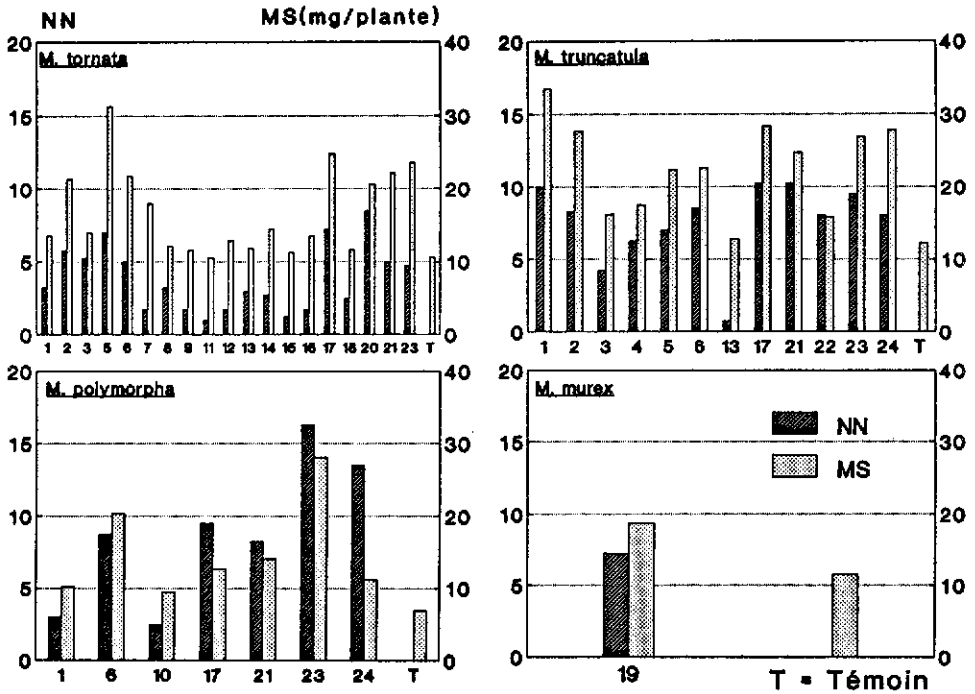
Ces isolats sont originaires de sols dont le pH ne dépasse pas 6,6. Les isolats de *Rhizobium* isolées des sols acides montrent en général une tolérance beaucoup plus élevée que celles originaires des sols basiques (Howieson and Ewing 1986; Howieson *et al.* 1988) malgré l'existence d'une grande variabilité entre les souches issues du même site (Graham et Parker 1964; Graham *et al.* 1982).

Dans notre étude, nous avons noté l'existence d'une relation entre les caractéristiques morphologiques des colonies et la tolérance des isolats vis-à-vis du pH acide. Les colonies tolérantes montrent une consistance gommeuse. Cependant, une variabilité a été observée entre les souches; certaines se caractérisent par des colonies plus ou moins visqueuses qui sèchent rapidement avec l'âge. La même constatation a été faite par Ayanaba *et al.* (1983) et Howieson *et al.* (1988). Jusqu'à présent, les mécanismes physiologiques expliquant cette tolérance ne sont pas bien connus. Les souches tolérantes secrètent des substances alcalines dans le milieu de croissance alors que les souches sensibles secrètent des substances acides (Norris 1965). Cunningham et Munns (1984) ont mis en évidence une relation positive entre la tolérance des souches au pH faible et la production d'exopolysaccharides (EPS). Cela peut être imputé aux lectines produites par la plante hôte (Bauer 1981; Bohlool et Schmidt 1974). En effet, cette relation n'est pas aussi étroite qu'on le pensait (Howieson *et al.* 1988), des études biochimiques et génétiques ont mis l'accent sur le rôle primordial du maintien du pH intracellulaire (O'Hara *et al.* 1989) en relation avec ce phénomène.

## Test d'infection en tube à essai

Le test d'infectivité, d'efficacité et de spécificité des 58 isolats de *Rhizobium meliloti* vis-à-vis de la plante-hôte a montré que seules 24 souches ont pu induire efficacement la nodulation chez les 4 espèces de *Medicago* étudiées. Le nombre de souches infectives et efficaces a été de 19 pour *M. tornata*, de 12 pour *M. truncatula*, de 7 pour *M. polymorpha* et d'une seule pour *M. murex*. L'efficacité des souches a été très variable selon l'espèce (fig. 2).

Le nombre de nodules et la matière sèche des parties aériennes des plantes sont corrélés significativement. Le coefficient de corrélation est très hautement significatif dans le cas de *M. tornata* et *M. truncatula* ( $r=0.88^{***}$  et  $r=0.84^{***}$  respectivement), et significatif pour *M. polymorpha* ( $r=0.75^*$ ). Cette corrélation n'a pas été établie pour *M. murex*, car on ne disposait que d'une seule souche au cours de l'essai. Ce test prouve qu'il y a une spécificité et éventuellement une variabilité importante entre *Rhizobium meliloti* et les espèces de *Medicago* concernant la préférence à la nodulation. Materon (1991) a montré que la population de *Rhizobium meliloti* présente une plus grande variabilité quant au pouvoir symbiotique avec *Medicago* spp. Thurman et Bromfield (1987) ont expliqué cette variabilité et éventuellement la préférence des souches à noduler certaines espèces de *Medicago* par leur adaptation aux conditions du milieu. Cette variabilité a été aussi mise en évidence dans l'essai en serre.

Souches de *Rhizobium*:

1= INRA-M008	7= INRA-M110	13= INRA-M172	19= INRA-M207
2= INRA-M010	8= INRA-M114	14= INRA-M175	20= INRA-M221
3= INRA-M011	9= INRA-M118	15= INRA-M176	21= INRA-M222
4= INRA-M012	10= INRA-M120	16= INRA-M185	22= INRA-M223
5= INRA-M016	11= INRA-M165	17= INRA-M200	23= INRA-M245
6= INRA-M105	12= INRA-M167	18= INRA-M206	24= INRA-M248

**Fig. 2:** Nombre de nodules (NN) et poids sec de la partie aérienne (MS) des plantes en fonction des souches et de l'espèce de *Medicago* (test en tube)

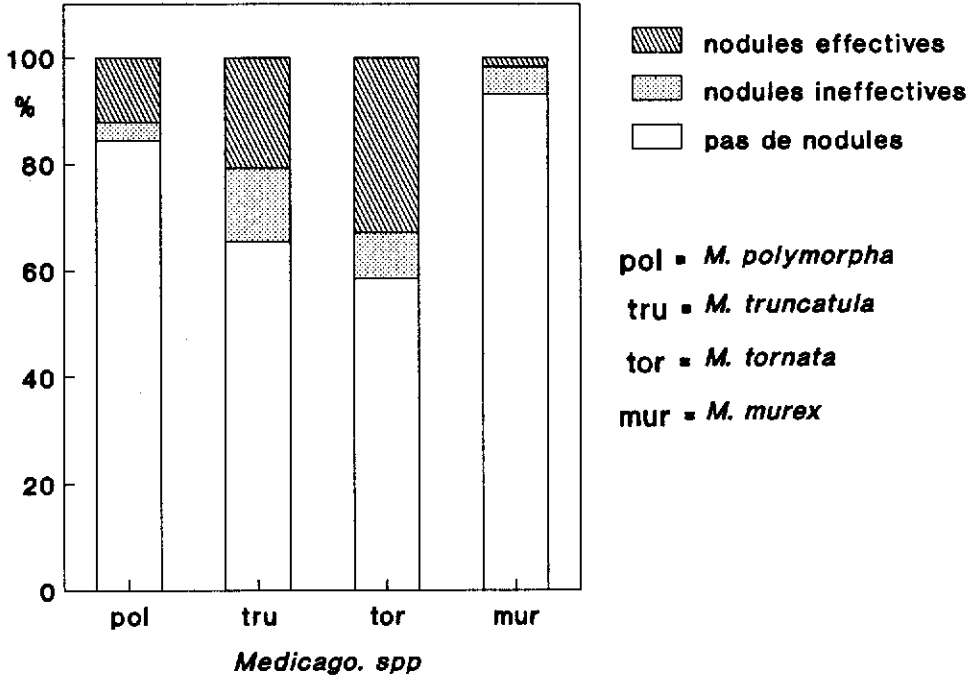
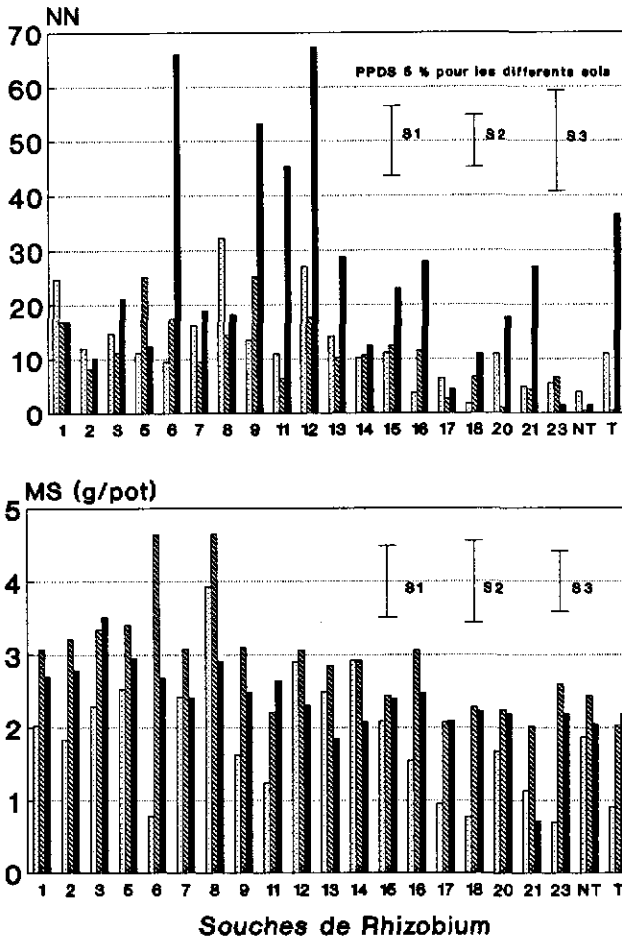


Fig. 3: Nodulation de 4 espèces de *Medicago* avec 58 souches de *Rhizobium* (test en tube) en % du nombre de souches

### Réponse de 4 espèces de *Medicago* annuelles à l'inoculation par des souches de *Rhizobium meliloti* dans un essai en serre

Les 4 espèces de *Medicago* ont été inoculées par les 24 souches de *Rhizobium* sélectionnées auparavant. Dans le cas de *M. tornata*, on constate que les souches prises individuellement diffèrent dans leurs efficacité en fonction du sol (fig.4). Cette observation est valable en particulier pour le nombre de nodules dans le sol 3 caractérisé par le pH le plus bas et une faible teneur en éléments minéraux.





- 1. INRA-M008
- 2. INRA-M010
- 3. INRA-M011
- 5. INRA-M016
- 6. INRA-M105
- 7. INRA-M110
- 8. INRA-M114
- 9. INRA-M118
- 11. INRA-M165
- 12. INRA-M167

- 13. INRA-M172
- 14. INRA-M175
- 15. INRA-M176
- 16. INRA-M185
- 17. INRA-M200
- 18. INRA-M206
- 20. INRA-M221
- 21. INRA-M222
- 23. INRA-M245

Témoins:

NT=témoin avec fertilisation azotée  
 T=témoin sans fertilisation azotée

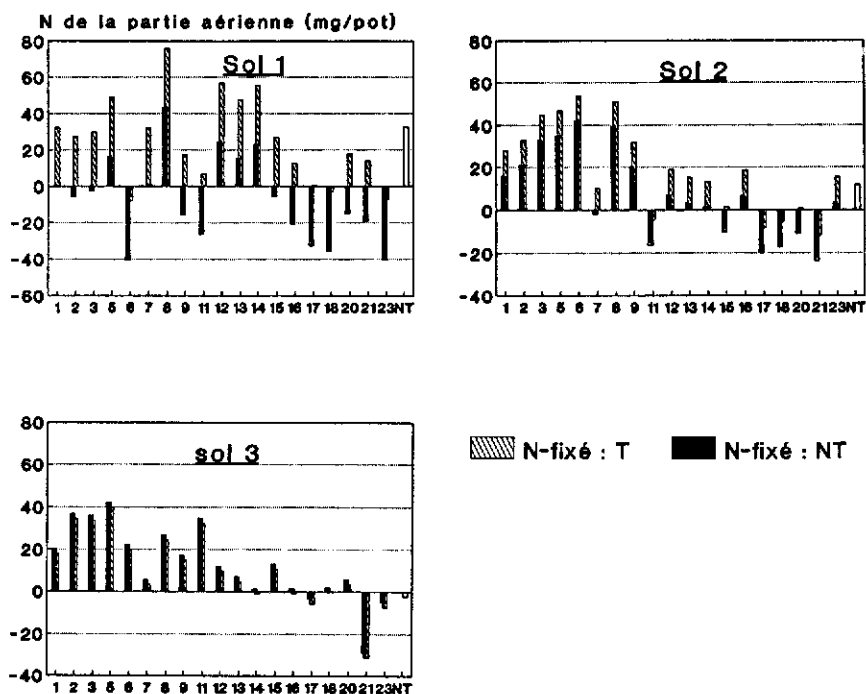
- S1 - Sol 1
- S2 - Sol 2
- S3 - Sol 3

**Fig. 4:** Effet de l'inoculation sur le nombre de nodules (NN) et sur la matière sèche des parties aériennes des plantes (MS) chez *M. tornata* dans trois sols différents (voir Tab. 1)

Parmi les témoins non inoculés (T et NT), les témoins à fertilisation azotée (NT) ont formé un faible nombre de nodules, en comparaison avec ceux non inoculés et sans fertilisation azotée (T), sauf dans le cas du sol 2. Ce phénomène est lié à l'effet négatif de l'azote sur la symbiose (Streeter 1985 ; Drevon *et al.* 1988). On note une variabilité similaire des souches concernant la matière sèche de la partie aérienne, mais dans ce cas, le témoin non inoculé et à fertilisation azotée (NT) a produit une quantité de matière sèche supérieure à celle obtenue par les témoins non inoculés et sans fertilisation azotée. Cette augmentation de production est due à l'effet de l'azote sur la croissance de la plante. Les souches N° 6 et N° 8 ont montré une réaction plus positive qu'un apport d'azote. Par contre les souches N° 18 et N° 23 ont réagi négativement par rapport aux témoins non inoculés et sans fertilisation azotée. La teneur en N des parties aériennes montre une variabilité importante en fonction des souches et du sol (fig. 5).

Dans certains cas, la teneur en azote chez les traitements inoculés est plus élevée que chez les témoins à fertilisation azotée. C'est le cas des souches 8, 12, 13, et 14 dans le sol 1. Dans le cas des 2 autres sols, cette observation s'applique à d'autres souches (fig. 5). En outre, d'autres souches ont montré un bilan négatif, en particulier vis-à-vis du témoin azoté. Il en est de même pour la teneur en azote des racines. Dans le cas des trois autres espèces de *Medicago* testées, on a pu mettre en évidence une variabilité et une hétérogénéité identique aux résultats obtenus dans les tests précédents (Thami Alami 1994). A l'exception du sol 3, l'inoculation a été fréquemment significative vis-à-vis des deux témoins, notamment le témoin sans fertilisation azotée (T). La majorité des souches sont effectives sur *M. tornata* dans le sol 2 (Tab. 2), dans le sol 3, les souches indigènes sont plus effectives que celles apportées par inoculation. Il en est de même pour l'espèce *M. murex* dans les trois sols étudiés.

Etant donné que la partie aérienne des *Medicago spp.* est la partie utilisée comme fourrage, ce paramètre est exprimé en % d'efficacité par rapport au témoin pour chaque espèce de *Medicago*; une première fois en prenant toutes les souches (Tab. 2), puis en ne considérant que les souches efficaces (Tab. 3). Ces pourcentages restent presque identiques si l'en ne tient compte que des souches efficaces; ce qui signifie que la quasi-totalité des souches sont efficaces sur *M. tornata* dans les trois sols étudiés.

Souches de *Rhizobium*

- |               |                   |
|---------------|-------------------|
| 1. INRA-M008  | 13. INRA-M172     |
| 2. INRA-M010  | 14. INRA-M175     |
| 3. INRA-M011  | 15. INRA-M176     |
| 5. INRA-M016  | 16. INRA-M185     |
| 6. INRA-M105  | 17. INRA-M200     |
| 7. INRA-M110  | 18. INRA-M206     |
| 8. INRA-M114  | 20. INRA-M221     |
| 9. INRA-M118  | 21. INRA-M222     |
| 11. INRA-M165 | 23. INRA-M245     |
| 12. INRA-M167 | NT = Témoin-azoté |

Fig. 5: Effet de différentes souches de *Rhizobium* sur la teneur en azote de la biomasse aérienne chez *M. tornata* exprimée en % du témoin non inoculé sans fertilisation azotée et du témoin non inoculé avec fertilisation azotée

**Tableau 2: Récapitulatif des souches et leurs pourcentages d'efficacité vis à vis du témoin non azoté (T) à P = 5 %**

Espèces de <i>Medicago</i>												
	<i>M. tornata</i>			<i>M. truncatula</i>			<i>M. polymorpha</i>			<i>M. murex</i>		
Sols	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
> 70 %	8	8		1			6					
	1	3										
		5										
		6										
		16										
50-70 %	12	1					10					
		2					23					
		7					24					
		12										
		14										
		15										
		16										
30-50%	3	9	3	5	2		17					
	5	13		13	3							
	7				13							
	13				17							
	14				23							
	15											

\* L'efficacité est déterminée en tenant compte de tous les paramètres mesurés tels que, le nombre et le poids sec de nodule, la biomasse aérienne et racinaire des plantes ainsi que la teneur en azote de ces derniers.

L'inoculation a permis une augmentation importante de la matière sèche et plus particulièrement chez *M. tornata* où cette augmentation était supérieure à 100 % dans le sol 1. Dans le sol 2, on constate une augmentation de 50 %, alors que dans le sol 3, elle n'est que de 10 % (Tab. 3). Toutefois les trois autres *Medicago* montrent une augmentation moins importante. *M. murex* a réagi positivement à l'inoculation dans tous les sols, mais cette réponse est statistiquement non significative à P= 5 % (Tab. 3).

**Tableau 3: Augmentation de la matière sèche des parties aériennes des plantes en % du témoin (T)**

en moyenne de toutes les souches				
Soils	<i>M. tornata</i>	<i>M. truncatula</i>	<i>M. polymorpha</i>	<i>M. murex</i>
1	206	72	110	111
2	155	122	107	116
3	110	61	68	120
en moyenne des souches efficaces seulement				
1	210	117	110	111
2	155	125	107	116
3	114	114	104	120

### Tests biologiques et physiologiques des 24 souches de *Rhizobium meliloti*

Ces tests montrent une grande variabilité et hétérogénéité entre les souches sans que celles-ci soient systématiquement liées à leur efficacité. Par exemple, le test de l'effet de la température sur la croissance des souches a mis en évidence une différence entre elles. A 10°C, la croissance des souches est faible. Quelques unes, ont montrées une croissance satisfaisante à 36°C, alors qu'à 25°C la plupart d'entre elles ont une croissance optimale.

Chez quelques souches, telles que N°10 et 23, une relation a été constatée entre leurs croissances et leurs origines, cette corrélation n'a pas été identifiée pour les autres souches. Ceci confirme les résultats trouvés par Karanja et Wood (1988).

Concernant l'étude de la vitesse de croissance des souches, il a été constaté que toutes les souches sont à croissance rapide. Toutefois, il existe une variabilité entre elles, certaines (N°1, 9 et 23) sont relativement lentes, d'autres (N° 2, 3, 4, 10 et 12) se situent à un niveau intermédiaire, tandis que

d'autres sont relativement rapides. Celles-ci ont atteint déjà 80 à 100 % du maximum de turbidité après 24 heures. En ce qui concerne l'utilisation de la source d'énergie et la résistance des souches aux différents antibiotiques, les mêmes constatations relatives à l'hétérogénéité des souches restent valables.

En conclusion, les souches acido-tolérantes de *Rhizobium meliloti* sont aptes à noduler effectivement les espèces de *Medicago* annuelles testées. Le choix des souches efficaces correspondantes permet, par le biais de l'inoculation d'obtenir une production importante de biomasse et de mettre à jours le potentiel fixateur d'azote de l'espèce considérée.

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont à tous ceux qui ont bien voulu revoir le manuscrit.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ayanaba, A., Asanuma, S. and Munns, D.N. (1983). An Agar plate Method for Rapid Screening of *Rhizobium* for Tolerance to Acid-Aluminium stress. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**, 256-58.
- Bauer, W. D. (1981). Infection of legumes by Rhizobia. *Amer. Rev. Plant Physiol.* **32**, 407-49.
- Biolog. (1992). GN Micro Plate<sup>TM</sup>, Instructions for use. BIOLOG. 3938 Trust Way, Hayward, California 94545, U.S.A.
- Bohlool, B. B. and Schmidt, E.L. (1974). Lectines: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-Legume root nodule symbiosis. *Science.* **185**, 269-71.
- Bounejmate, M., Robson, A.D. and Beale, P.E. (1992). Annual *Medicago* species in Morocco. II. Distribution in relation to soil and climate. *Aust. J. Agric. Res.* **43**, 751-63.
- Cunningham, S.D. and Munns, D.N. (1984). The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **48**, 1273-6.

- Drevon, J. J., Heckmann, M. O., Soussana, J. F. and Salsac, L. (1988). Inhibition of nitrogen fixation by nitrate assimilation in legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant Physiol. Biochem.* **26**, 1-7.
- Ewing, M.A. and Howieson, J.G. (1989). The development of *Medicago polymorpha* L. as an important pasture species for southern Australia. XVI International Grassland Congress. Nice, France. 197-8.
- Gillespie, D. (1988). Murex medic a new pasture species. *J. Agric.* **29**, 132-8.
- Graham, P. H. and Parker, C. A. (1964). Diagnostic features in the characterisation of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant and Soil.* **20**, 383-96.
- Graham, P.H., Viteri, S.E., Mcakie, F., Vargas, A.T. and Palacios, A. (1982). Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* **5**, 121-8.
- Howieson, J.G. (1985). Use of an organic buffer for the selection of acid tolerant *Rhizobium meliloti* strains. *Plant and Soil.* **88**, 367-76.
- Howieson, J.G. and Ewing, M.A. (1986). Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*-*Medicago* symbiosis. *Aust. J. Agric. Res.* **37**, 55-64.
- Howieson, J.G. and Ewing, M.A. and D'antuono, M. F. (1988). Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil.* **105**, 832-7.
- Howieson, J.G., Ewing, M.A. and D'antuono, M. F. (1988). Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil* **105**, 832-7.
- Karanja, N. K. and Wood, M. (1988). Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris*. L.) in Kenya: tolerance of high temperature and antibiotic resistance. *Plant and Soil.* **112**, 15-22.
- MARA. (1986). Opération ley farming. Manusc. ronéot. 1-18.
- Materon, L. A. (1991). Symbiotic characteristics of *Rhizobium meliloti* in West Asian soils. *Soil. Biol. Biochem.* **23**, 429-34.
- Mc Knight, T. (1949). Efficiency of isolates of *Rhizobium* in the Cowpea group, with proposed addition to this group. Queensland. *J. Agric Sci.* **6**, 61-76.
- Norris, D. O. (1965). Acid production by *Rhizobium*. A unifying concept. *Plant and Soil.* **22**, 143-66.

- O'Hara, G. W., Goss, T. J., Dilworth, M. J. and Glenn, A. R. (1989). Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1870-6.
- Piano, E., Sardara, M., Pusceddu, S. (1982). Observations on the distribution and ecology of *Subterraneum* Clover and other annual legumes in Sardinia. *Revista di Agronomia.* **3**, 273-83.
- Streeter, J. G. (1985). Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. II. Short term studies with high nitrate supply. *Plant. Physiol.* **77**, 325-8.
- Thami Alami, I. (1994). Prospektion, Selektion sowie Prüfung auf Effektivität von säuretoleranten *Rhizobium meliloti*-Stämmen für den Anbau von annualen *Medicago*-Arten auf sauren und schwach sauren Böden in Marokko. - Thèse de doctorat, Universität Gießen. Allemagne.
- Thurman, N. P. and Bromfield, E. S. P. (1987). Effect of variation within and between *Medicago* and *Melilotus species* on the composition and dynamics of indigenous populations of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol. Biochem.* **1**, 31-8.