

DIVERSITE DE RHIZOBIA DANS UN CHAMP CULTIVE DE POIS D'ANGOLE (*Cajanus cajan* L.) (LEGUMINEUSES) A YAMOOUSSOUKRO (CENTRE CÔTE D'IVOIRE)

R. K. FOSSOU¹ N. K. IKOUASSI² G. C. Z. KOUADJO¹ S. M. I. B. ZAKO¹ et A. ZEZE¹

¹Groupe de Recherche sur les Biotechnologies Végétale et Microbienne, Département Agriculture et Ressources Animales, Ecole Supérieure d'Agronomie, Institut National Polytechnique Houphouët-Boigny, BP 1093 Yamoussoukro, Côte d'Ivoire. Email : youhe.deba@gmail.com

²Laboratoire Central de Biotechnologies, Centre National de la Recherche Agronomique KM17 Route de Dabou, 01 BP 1740 Abidjan 01 (Côte d'Ivoire)

RESUME

Le pois d'Angole (*Cajanus cajan*) est une importante légumineuse à graines cultivée dans les zones tropicales, notamment en Afrique de l'Ouest. Toutefois, dans cette partie de l'Afrique, la diversité des rhizobia nodulant la plante est peu connue, alors que son exploration peut permettre d'améliorer son intérêt particulièrement en agriculture. Cette étude vise à évaluer la diversité génétique des rhizobia nodulant un champ de pois d'Angole à Yamoussoukro (centre de la Côte d'Ivoire). Au total, 169 souches de rhizobia ont été isolées à partir de nodules collectés en champ. Le milieu synthétique TY utilisé pour cultiver et purifier les isolats, avant l'étude génétique, a permis de distinguer ceux-ci en deux groupes en fonction de la vitesse de croissance. La diversité génétique a été étudiée par PCR-RFLP du gène codant l'ARNr 16S des bactéries. L'analyse des produits de la digestion du gène ARNr 16S des isolats avec l'endonucléase *Tsp 509I* a révélé 3 différents génotypes, dans des proportions de 11,2 et 53,9 %, pour le moins représenté et le plus important, respectivement. Ces résultats montrent l'existence d'une variabilité physiologique et génétique au sein des rhizobia nodulant le pois d'Angole.

Mots clés : *Cajanus cajan*, diversité, rhizobia, PCR-RFLP ADNr 16S, Côte d'Ivoire.

ABSTRACT

DIVERSITY OF RHIZOBIA NODULATING PIGEON PEA

Pigeon pea (Cajanus cajan) is an important grain legume in tropical zone, notably in West Africa. However, in this area of Africa the diversity of rhizobia nodulating this plant is poorly understood even though its exploration can contribute to increase its interest, notably in agriculture. This work aims at determining the genetic diversity of rhizobia nodulating a pigeon pea field in Yamoussoukro (Center Ivory Coast). One hundred sixty-nine (169) rhizobia's strains were isolated from field nodules. The use of TY medium allowed the purification and identification of two groups according to their growth rate. PCR-RFLP analyses of the 16S rRNA genes with the endonuclease Tsp 509I enabled the characterization of three main genotypes within the pigeon pea nodulating rhizobia community. The occurrence of these genotypes varied from 11.2 % for the least to 53.9 % for the most important. These studies showed the evidence of physiological and genetic variability within the pigeon pea nodulating rhizobia strains.

Keywords : *Cajanus cajan*, diversity, Rhizobia, PCR-RFLP rDNA16S, Côte d'Ivoire.

INTRODUCTION

Le pois d'Angole ou pois cajan (*Cajanus cajan*) est une importante légumineuse à graines cultivée sous les tropiques, les zones semi-arides comprises. Sa production annuelle estimée en moyenne à 3,1 millions de tonnes par la FAO représente 5 % de la production mondiale des légumineuses à graines (Van Der Maesen, 2006). Avec cette production, dont plus de 70 % provient de l'Inde, le pois d'Angole occupe la 5^e place parmi les légumineuses à graines qui contribuent à elles seules pour 33 % aux besoins azotés de l'alimentation humaine (Vance *et al.*, 2000).

Dans les pays en développement, l'intérêt porté à la culture du pois d'Angole se justifie par les nombreuses opportunités qu'il offre aux populations rurales. En effet, grâce à son excellente source de protéines (21 %) comparable à celle du haricot (Niyonkuru, 2002), à son potentiel énergétique considérable et la teneur en acides aminés essentiels (lysine, phénylalanine, valine, leucine et isoleucine) de ses graines (Van Der Maesen, 2006), le pois cajan contribue à l'amélioration du régime alimentaire de ces populations. En Afrique subsaharienne par exemple, les populations comprennent environ 30 % d'enfants de moins de 5 ans mal nourris (Odeny, 2007). Le pois cajan participe également à la sécurité alimentaire en Afrique de l'ouest. En Côte d'Ivoire, les graines de la plante constituent pour les populations autochtones du Nord-Est, en l'occurrence les Koulango et les Abrons, un véritable aliment de soudure (Ndabalyshe, 1995). Grâce à son feuillage très riche en protéines (21 - 25 % Matière Sèche (MS) et en fibres (30 - 35 % de cellulose brute/MS) (Grimaud, 1988), le pois cajan joue également un rôle important en élevage dans les régions où il est cultivé. Dans les îles du Cap Vert, ses feuilles sont régulièrement utilisées pour la complémentation des bovins et des caprins (Lepape, 1980). Dans le centre de la Côte d'Ivoire, les graines broyées sont incorporées dans l'aliment des poulets de chair et des pondeuses (Fossou, 2011). En agriculture, le pois cajan possède aussi de nombreux intérêts. En effet, utilisée comme brise-vent ou comme plante de couverture dans certaines plantations industrielles (Barrios *et al.*, 1997 ; Bashir *et al.*, 1998), la plante permet de contrôler l'érosion des sols (Siambi *et al.*, 1992).

Par ailleurs, grâce à son système racinaire étendu, à l'azote atmosphérique qu'il fixe en symbiose avec les bactéries de type *Rhizobium* du sol et au mulch formé par ses feuilles rejetées durant sa culture, le pois cajan améliore significativement la fertilité des sols agricoles (Siambi *et al.*, 1992 ; Van der maesen, 2006). La plante peut, en outre, fixer jusqu'à 235 kg ha⁻¹ N (Peoples *et al.*, 1995) et laisser environ 40 kg de résidus azotés au sol ha⁻¹ (Van Der Maesen, 2006). Ces résidus permettent d'améliorer la fertilité des jachères (Boehringer et Cadwel, 1989) et d'augmenter le rendement des cultures en rotation. Au Nigeria, des essais de rotation avec des résidus de pois d'Angole ont permis d'augmenter de 50 % le rendement du maïs par rapport à la culture sans engrais (Hulugalle et Lal, 1986). En Côte d'Ivoire, l'utilisation de cette légumineuse comme plante améliorante des jachères de courtes durées, dans les systèmes agricoles à base de riz pluvial, a permis de réduire l'enherbement et d'améliorer le rendement du riz pluvial de plus de 67 % (Akanvou *et al.*, 2002). Dans plusieurs pays d'Asie et d'Afrique, l'identification des bactéries fixatrices de N du pois d'Angole a conduit à la sélection de souches performantes de bactéries avec le développement d'inoculum. Les inoculats développés permettent en effet d'accroître la fixation de N atmosphérique par les légumineuses et de mieux réduire leur dépendance vis-à-vis des engrais azotés, tout en améliorant leur productivité. Les activités de détermination de la diversité des partenaires bactériens du pois d'Angole s'inscrivent donc dans la logique d'un développement agricole durable. Les travaux taxonomiques menés en Inde et en Afrique de l'Est, respectivement premier et deuxième centre de diversité et de culture de cette légumineuse (Van Der Maesen, 2006), ont permis d'identifier aujourd'hui une dizaine d'espèces bactériennes symbiotiques. Celles-ci appartiennent à 3 principaux genres de rhizobia ou bactéries nodulatrices de légumineuses (BNL). Il s'agit des genres *Rhizobium* (Bender *et al.*, 1986 ; Wolde-Meskel *et al.*, 2004 a), *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988 ; Dubey *et al.*, 2010) et *Bradyrhizobium* (Ramsubhag *et al.*, 2002 ; Wolde-Meskel *et al.*, 2004 a).

En Côte d'Ivoire, malgré l'importance avérée du pois d'Angole, aucune détermination de ces bactéries symbiotiques n'a encore été menée.

Le but de la présente étude est d'évaluer la diversité des rhizobia nodulant le pois d'Angole dans un champ cultivé à Yamoussoukro. Spécifiquement, il s'agira de mettre en évidence la variabilité de la région 16S de l'ADNr des bactéries symbiotiques de cette légumineuse et d'en constituer une collection locale.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL VEGETAL

Le matériel biologique utilisé est constitué de souches de rhizobia isolées de 200 nodules du pois d'Angole. Ces nodules ont été collectés en Septembre 2010 sur de jeunes plants âgés de 4 à 14 mois en croissance dans un champ cultivé de la ferme expérimentale de l'Ecole Supérieure d'Agronomie (ESA) de l'Institut National Polytechnique Félix Houphouët (INP-HB) de Yamoussoukro (Côte d'Ivoire). Ce champ (N 06°53.044' ; W 05°13.523') est d'une superficie de 1,5 ha et a été créé dans le but de produire des graines utilisées comme source principale de protéines dans la formulation d'aliments pour les poudeuses et pour les poulets de chair. Les semences de pois d'Angole utilisées lors de la création du champ sont constituées de variétés traditionnelles non caractérisées, obtenues sur le marché local.

TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE CONSERVATION DES RHIZOBIA

Récolte et préparation des nodules

Les nodules ont été récoltés aléatoirement sur toute l'étendue du champ, à l'aide d'une tarière. Des tubes de 15 ml, remplis d'eau à moitié, ont servi à maintenir hydratés les nodules. Au laboratoire, les nodules ont été lavés avec de l'eau distillée pour enlever toute trace de terre. Les nodules ainsi lavés ont été désinfectés par trempage dans de l'eau de javel (12 °Chl) pendant 30 s et rincés 3 fois avec de l'eau distillée stérile. Les nodules ont ensuite été déposés individuellement, (sur des gouttes d'eau) dans des Boîtes de Pétri.

Isolement, purification et conservation des bactéries

Sous une hotte à flux laminaire, les nodules ont été écrasés au moyen de cônes préalablement stérilisés à 120 °C pendant 2 h.

Les bactéries ont été isolées par prélèvement d'une quantité de broyat de chaque nodule à l'aide d'un cure-dent stérilisé. Les broyats prélevés ont été ensemencés sur du milieu TY (*Tryptone Yeast*) solide (Beringer, 1974) reparti dans des Boîtes de Pétri et divisé en quartiers. Les milieux ensemencés puis identifiés ont ensuite été incubés à l'étuve à 30 °C de 24 à 48 h.

Par la suite, les bactéries ont été successivement cultivées dans des Boîtes de Pétri, à intervalles de temps variables, en vue de les purifier. Après 3 cycles de purification, les souches ont été mises en suspension dans 3 ml du milieu TY et incubées sous agitation à 30 °C pendant 48 h pour l'étude de la diversité. La collection des rhizobia a nécessité l'utilisation de 2 plaques de 96 puits chacune. Cent (100) µl de suspension bactérienne additionnés de quelques gouttes de glycérol ont été placés dans chaque puits et les plaques étiquetées ont été conservées à -80 °C.

METHODES D'ANALYSE AU LABORATOIRE POUR L'ETUDE DE LA DIVERSITE

Préparation de cellules bactériennes pour la PCR

Pour chaque souche bactérienne, un choc thermique (Zézé *et al.*, 2001) a été appliqué sur 1 ml de suspension et centrifugé à 12 000 t min⁻¹ pendant 5 min. Le culot bactérien a été repris dans 100 µl d'eau distillée stérile, puis homogénéisé au vortex. Les suspensions bactériennes ont été placées dans un bain marie à 100 °C pendant 10 min, puis transférées immédiatement sur glace jusqu'à refroidissement total.

Amplification de la région 16S de l'ADNr des rhizobia par PCR

Les amorces FGPS 6 et FGPS 1509 (Normand *et al.*, 1992) ont été utilisées pour l'amplification de la région 16S de l'ADNr des rhizobia dans un volume réactionnel total de 25 µl contenant des dNTP (0,2 mM), des amorces (0,2 µM), de la *Taq* DNA polymérase (0,5 U) et un tampon. Les suspensions bactériennes (2,5 à 4 µl) ont été utilisées pour la PCR. Les conditions d'amplification ont été les suivantes : une phase de préchauffage à 94 °C pendant 5 min et une phase terminale (72 °C pendant 7 min) ; les

étapes de dénaturation (94 °C pendant 30 s), d'amorçage (55 °C pendant 30 s) et de polymérisation (72 °C pendant 1 minute 30 s) ont été répétées 35 fois. Le temps total de la PCR a été de 2 h 7 min. Pour chaque réaction d'amplification, un microtube contenant uniquement le milieu réactionnel sans ADN a été utilisé comme témoin négatif.

Evaluation par RFLP de la variation du gène de l'ARNr 16S

Après l'amplification, 5 à 8 µl d'amplifiats préalablement mélangés avec 2 µl de tampon de charge (bleu de bromophénol) ont été mis en migration sur un gel d'agarose à 0,8 % pendant 30 min à 100 V pour l'électrophorèse. Un marqueur de poids moléculaire 1Kb (100 pb à 12000 bp) a servi pour la vérification de la taille attendue de l'ADNr 16S amplifié. La digestion des produits PCR a été réalisée en présence d'un tampon et d'un témoin négatif à 65 °C pendant 4 h avec l'endo-nucléase *Tsp* 509I (R0576S). Les amplifiats digérés ont ensuite été

soumis à une électrophorèse à 100 V pendant 50 min sur un gel d'agarose à 3 %.

RESULTATS

DIVERSITE PHYSIOLOGIQUE DES BACTERIES ISOLEES

Au total, 169 souches de bactéries ont été isolées des nodules du pois d'ajon pour l'étude. La culture de ces isolats sur milieu TY solide, en vue de leur purification, a permis de les subdiviser en deux groupes selon le temps d'apparition des colonies. Le premier groupe, à croissance rapide développe des colonies denses et facilement identifiables après 24 h d'incubation. Les bactéries de ce groupe ont été les plus abondantes (65 %). Pour l'autre groupe, il a fallu 48 h (bactéries à croissance lente) pour développer des colonies ayant les mêmes aspects (Figure 1). Ce résultat a été observé pendant 4 cycles de purification des isolats sur le milieu TY.

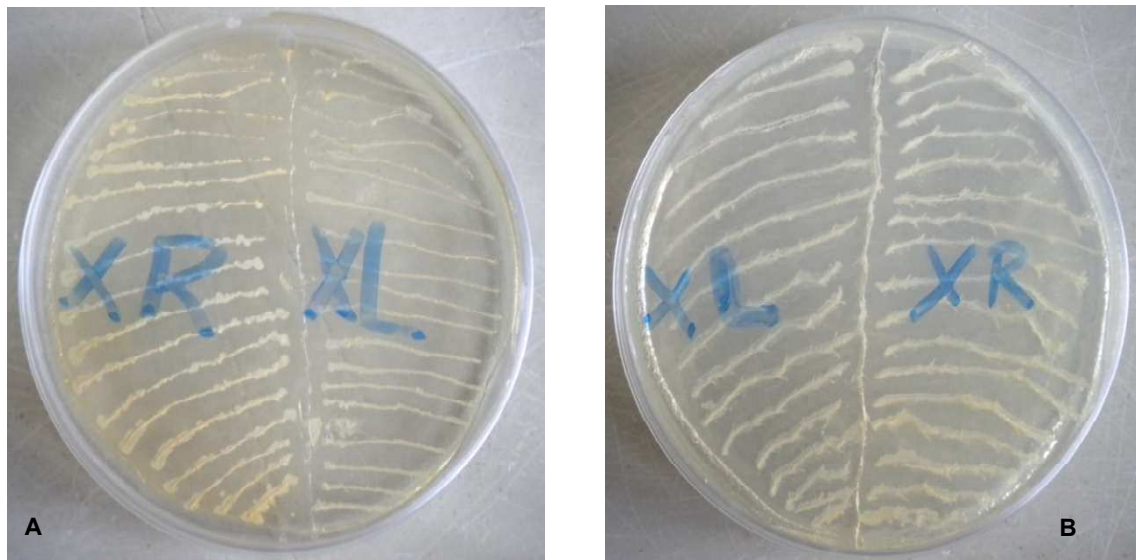


Figure 1 : Photographies montrant le mode de croissance sur milieu TY de deux groupes (XR : croissance rapide et XL : croissance lente) de rhizobia isolés du pois d'Angole.

Photographs showing the growth pattern of two groups (XR : fast growth and XL : slow growth) of rhizobia isolated from pigeon pea on TY medium.

A) Croissance des rhizobia issus des groupes XR et XL 24 h après ensemencement et B) Croissance des rhizobia issus des groupes XR et XL 48 h après ensemencement.

A) Growth of rhizobia from the XR and XL groups 24 hours after inoculation and B) Growth of rhizobia from the XR and XL groups 48 hours after inoculation.

MISE EN EVIDENCE D'UNE DIVERSITE GENETIQUE DU GENE ARNr 16S PAR ANALYSE RFLP

La PCR réalisée sur l'ADNr 16S de toutes les bactéries isolées a permis d'amplifier un fragment unique de taille 1500 pb (Figure 2). La digestion effectuée sur toutes les souches amplifiées avec l'enzyme de restriction *Tsp* 509I a généré 3 types de profils sur la base du nombre de bandes de digestion générées par souche. Il s'agit d'un type de profils à 2 bandes (A), d'un type de profils à 3 bandes (B) et d'un dernier type de profils à 4 bandes (C) (Figure 3). Une analyse de l'abondance de tous les profils (152) montre que le génotype à 3 bandes (53,9 %) a été le plus abondant (Figure 4). Le génotype à

2 bandes a été le moins abondant et a représenté 11,2 % de l'ensemble des souches digérées.

Une corrélation des génotypes obtenus, en rapport avec la vitesse de croissance des souches, a été effectuée. Cette analyse montre que les 3 génotypes observés ont été mis en évidence chez les bactéries à croissance lente (Figure 5). Ces mêmes observations ont été faites avec les souches à croissance rapide. Ainsi, l'analyse des types de profils de digestion en rapport avec la vitesse de croissance des souches n'a pas montré de corrélation spécifique entre les 3 génotypes obtenus et l'un des 2 groupes de bactéries définis par la vitesse de croissance.

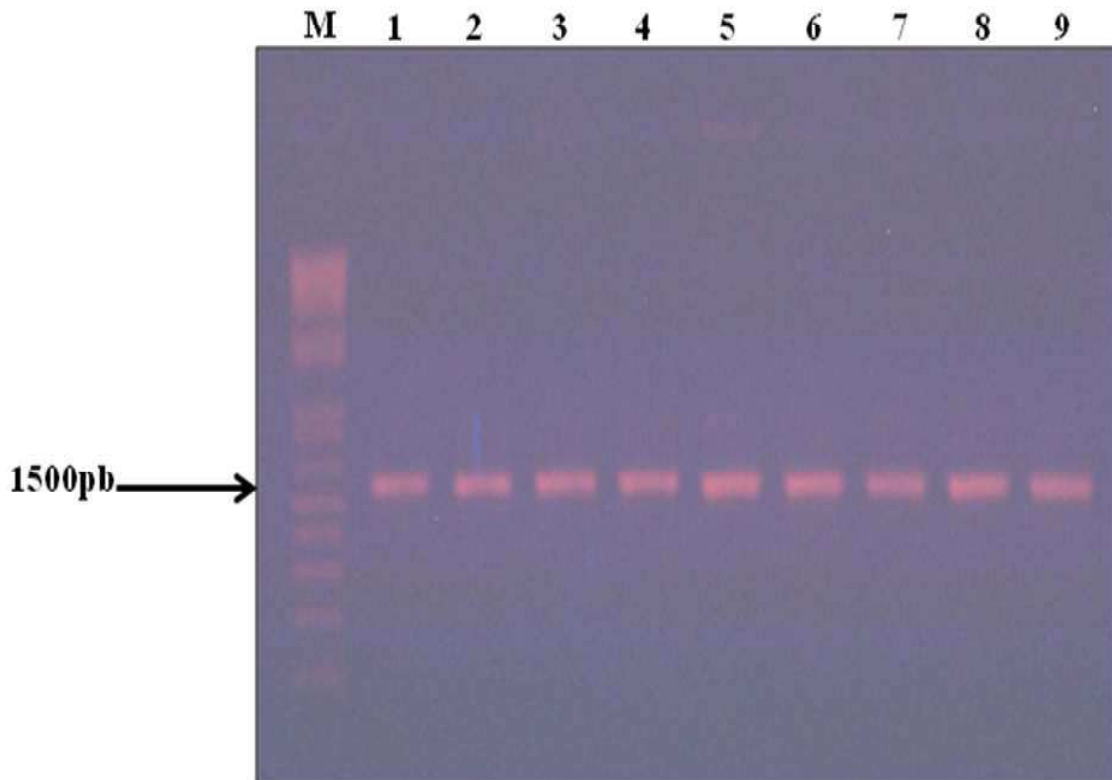


Figure 2 : Gel d'électrophorèse d'agarose (0,8 %) des gènes ARNr 16s amplifiés par PCR obtenus à partir de 9 bactéries isolées de *Cajanus cajan*. M) marqueur moléculaire 1 kbp.

*Agarose gel electrophoresis (0.8 %) of 16S rRNA genes amplified by PCR from 9 bacteria isolated from *Cajanus cajan*. M) molecular marker 1 kbp.*

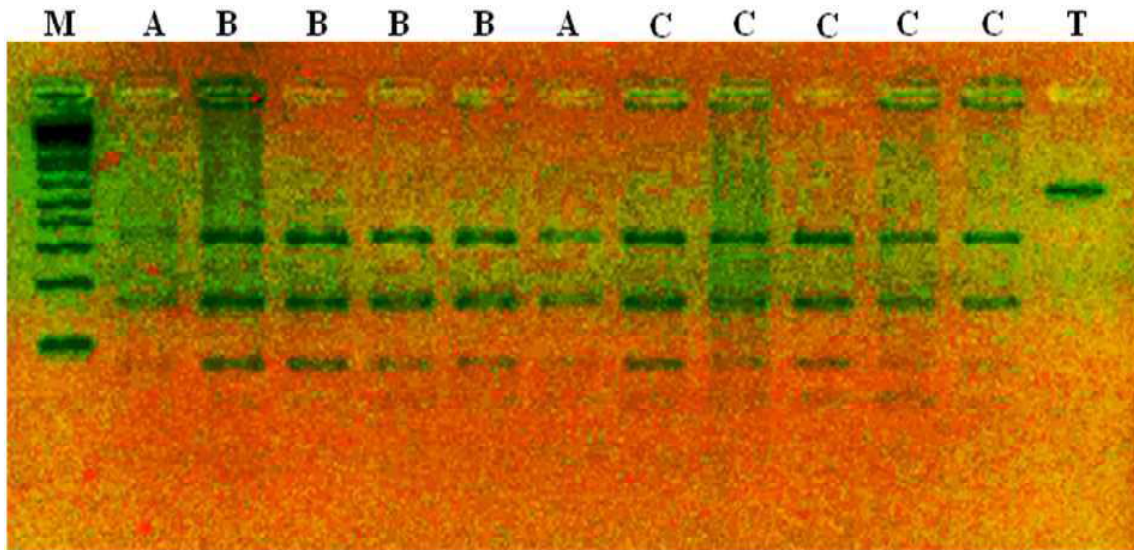


Figure 3 : Gel d'électrophorèse d'agarose (3 %) des fragments de gènes ARNr 16S digérés avec l'enzyme *Tsp* 509I. 3 profils sont représentés sur le gel. Ce sont : A) Profil à 2 bandes, B) Profil à 3 bandes, C) Profil à 4 bandes. M) marqueur moléculaire 1 kbp. T) Gène ARNr 16S non digéré.

Agarose gel electrophoresis (3 %) of 16S rRNA gene fragments digested with the enzyme Tsp 509I. 3 profiles are shown : A) Profile 2 band, B) Profile 3 band, C) Profile 4 band. M) molecular marker 1 kbp. T) undigested 16S rRNA gene.

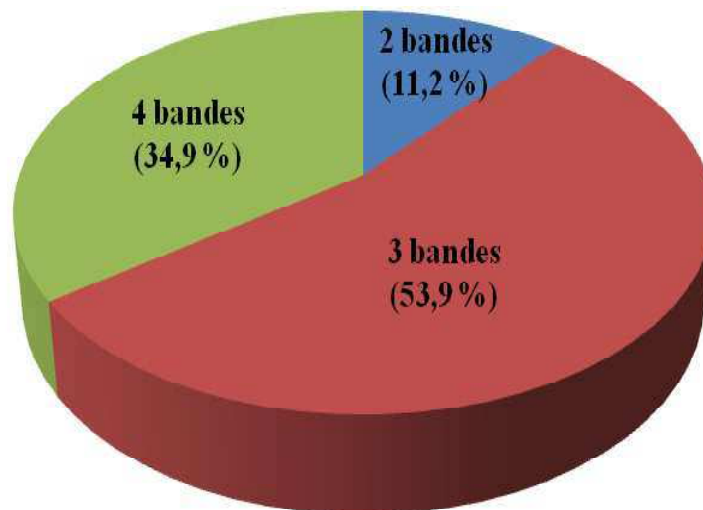


Figure 4 : Proportions relatives des 3 profils obtenus par PCR-RFLP.

Relative proportions of the 3 profiles obtained by PCR-RFLP.

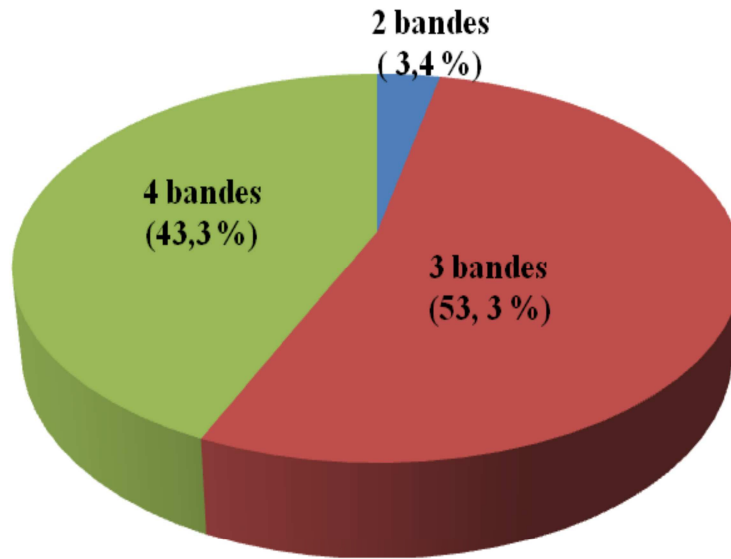


Figure 5 : Corrélation entre bactéries à croissance lente et profils de digestion obtenus par PCR-RFLP.
Correlation between slow-growing bacteria and digestion profiles obtained by PCR-RFLP.

DISCUSSION

La différence de temps de croissance observée entre les isolats symbiotiques du pois d'Angole, pendant les cycles de culture et de purification sur milieu TY solide, pourrait être rapprochée des résultats obtenus en cultivant les rhizobia sur milieu YMA (*Yeast Manitol Agar*) (Vincent, 1970). En effet, les rhizobia se subdivisent en deux groupes lorsqu'ils sont cultivés sur le milieu de culture YMA. Ce milieu est celui utilisé pour l'évaluation de la vitesse de croissance des bactéries, à travers la détermination de leur temps de génération, ainsi que le temps nécessaire pour le développement de colonies complètes. En l'utilisant, Jordan (1982) a pu établir la première classification des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote en deux genres (genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*). Le premier genre représente le groupe des bactéries possédant un temps d'apparition de colonies complètes inférieur ou égal à 5 j d'incubation et dites bactéries «à croissance rapide». Quant au second, il représente les bactéries dites «à croissance lente», caractérisées par le développement de colonies complètes entre 5 et 7 j d'incubation.

Par ailleurs, en prenant pour critère leur vitesse de croissance sur le milieu de culture YMA, Sy *et al.* (2001) ont pu répartir une collection de 126 souches de rhizobia isolées du *Crotalaria*

spp. en 2 groupes distincts. Un premier groupe de 81 souches à croissance rapide, dont les colonies apparaissent après 48 h de culture, et un second groupe de 45 souches, à croissance lente pour lesquelles les colonies n'apparaissent qu'au bout de 72 h de culture.

Nos résultats sont quasi-identiques à ceux obtenus par Sy *et al.*, en 2001 et révèlent de ce fait, une diversité physiologique au sein des bactéries étudiées. Le milieu TY pourrait donc être utilisé pour évaluer la diversité physiologique des rhizobia en fonction de leur vitesse de croissance.

La taille des amplifiats (1500 pb) correspond bien à celle de l'ADNr 16S des bactéries, mise en évidence par Weisburg *et al.* (1991). Ce résultat est aussi identique à celui obtenu par Dubey *et al.* (2010) sur les mêmes partenaires symbiotiques du pois d'Angole en Inde. Le nombre de profils obtenus après digestion des amplifiats (03) met en évidence une diversité génétique au sein des bactéries symbiotes du pois d'Angole en Côte d'Ivoire. Ce résultat confirme l'importance de l'ADNr 16S dans l'évaluation de la diversité des bactéries, en général, et des rhizobia, en particulier. En effet, grâce à sa structure bien conservée mise en évidence par Woese (1987), l'étude du gène de l'ARNr 16S constitue une excellente approche rapide pour évaluer la variabilité génétique entre les souches de rhizobia (Laguerre *et al.*, 1994 ;

Nour *et al.*, 1994b ; Sylla, 1998 ; Ndoye, 1999). Par ailleurs, la diversité observée est aussi comparable à celle obtenue en Inde par Dubey *et al.* (2010). Avec l'utilisation de 3 enzymes de restriction différentes (contre une dans notre cas), leur étude a permis d'établir une diversité au sein des symbiotes du pois d'Angole dans le District de Betul. Les profils ont varié d'1 à 4 selon l'enzyme utilisée. Quant au nombre de bandes de digestion générées par profil, il s'est situé entre 2 et 3. Enfin, l'inégalité constatée entre les fréquences des 3 groupes génétiques constitués par l'étude peut s'expliquer par une capacité compétitive non identique de ces groupes au cours du processus de nodulation (Zézé *et al.*, 2001). En effet, les différentes souches de rhizobia coexistant simultanément dans un sol présentent des différences de capacité à rivaliser pour la formation des nodules (Postma *et al.*, 1989 ; Heijnen et Van Veen, 1991). Ainsi, les deux groupes génétiques les plus représentés au sein de la population rhizobienne étudiée pourraient être ceux des souches symbiotiques les plus performantes dans la nodulation du pois d'Angole au champ. Par ailleurs, ces résultats peuvent s'expliquer par une densité de population saprophytique inégale entre les différentes souches rhizobiennes présentes dans la rhizosphère du pois d'Angole. En effet, certaines souches maintiennent dans le sol une faible densité de population en absence de la légumineuse hôte (Hirsch, 1996 ; Zézé *et al.*, 2001), alors que le succès de celles-ci, dans la symbiose, est aussi influencé par cette taille initiale (Postma *et al.*, 1989 ; Heijnen et Van Veen, 1991). Les souches ayant une plus forte densité de population initiale ont naturellement plus de candidats potentiels à la nodulation et leur abondance au sein de la population symbiotique peut, par conséquent, être plus élevée. Enfin, ces résultats pourraient s'expliquer par une infectivité plus élevée pour les deux groupes génétiques les plus représentés au sein de la population rhizobienne étudiée.

CONCLUSION

Notre étude a permis de mettre en évidence l'existence d'une variabilité physiologique et génétique au sein de la population de bactéries nodulantes le pois d'Angole dans un champ cultivé à Yamoussoukro. Toutefois, le recours à des techniques plus avancées comme le séquençage de l'ADNr 16S est nécessaire pour

l'identification taxonomique des différents génotypes constitués par le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction. Par ailleurs, le renforcement de la collection initiale des souches symbiotiques, à travers une étude multilocale, s'avère également nécessaire pour avoir une vision globale de la diversité des populations de rhizobia symbiotes du pois d'Angole en Côte d'Ivoire.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement les techniciens du Laboratoire de Phytopathologie de l'Ecole Supérieure d'Agronomie de l'Institut National Polytechnique Houphouët-Boigny et du Laboratoire Central de Biotechnologies (CNRA) pour leur assistance technique. Ils remercient également Monsieur Kouadio Bertin, qui a accepté de mettre à leur disposition son champ de pois d'Angole pour l'étude. Ce projet de recherche a été financé par le Groupe de Recherche sur les Biotechnologies Végétale et Microbienne (GRBVM).

REFERENCES

- Akanvou R., Kropff M.J., Bastiaans L. and M. Becker. 2002. Evaluating the use of two contrasting legume species as relay intercrop in upland rice cropping systems. *Field Crop. Res.* 74 : 23 - 36.
- Barrios E., Kwesiga F., Buresh R.J. and J. I. Sprent. 1997. Light fraction soil organic matter and available nitrogen following trees and maize. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61 : 826 - 831.
- Bashir J., Buresh R.J. and F. M. Place. 1998. Sesbania tree fallows on phosphorus-deficient sites : Maize yield and financial benefit. *Agron. J.* 90 : 717 - 726.
- Bender G.L., Plazinski J. and B. G. Rolfe. 1986. A symbiotic acetylene reduction by a fast-growing cowpea *Rhizobium* strain with nitrogen structural genes located on a symbiotic plasmid. *Environ. Microbiol.* 51. 868 - 871.
- Beringer J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Genet. Microbiol.* 84 : 188 - 198.
- Boehringer A. and R. Cadwel. 1989. *Cajanus cajan* (L.) millsp. as potentiel agroforestry component in the eastern province of Zambia. *Agroforest. syst.* 9 : 127 - 140.

- Chen W. X., Yan G. H. and J. L. Li. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned by *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 38 : 392 - 397.
- Dubey R. C., Maheshwari D. K., Kumar H. and K. Houre. 2010. Assessment of diversity and plant growth promoting attributes of rhizobia isolated from *Cajanus cajan* L. *Afr. J. Biotechnol.* 9 : 8619 - 8629.
- Fossou K. R. 2011. Diversité génétique des rhizobia associés à un champ de pois d'Angole (*Cajanus cajan* L.) à Yamoussoukro (Centre de la Côte d'Ivoire). Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'Agronomie Approfondie, Ecole Supérieure d'Agronomie de Yamoussoukro (Côte d'Ivoire), 63 p.
- Grimaud P. 1988. La graine d'ambrevade (*Cajanus cajan*) : une solution possible pour l'élevage traditionnel des monogastriques en Nouvelle-Calédonie. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire de Nouvelle-Calédonie* .11 : 29 - 36.
- Heijnen C. E. and J. A. van Veen. 1991. A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. *Fems Microbiol. Ecol.* 85 : 73 - 80.
- Hirsch P. R. 1996. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytol.* 133 : 159 - 171.
- Hulugalle R. N. and R. Lal. 1986. Root growth of maize in compacted gravely tropical alfisol as affected by rotation with a woody perennial. *Field Crop. Res.* 13 : 33 - 44.
- Jordan D. C. 1982. Transfer of *rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plant. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32 : 136 - 139.
- Laguerre G., Allard M. R., Revoy F. and N. Amarger. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16s rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 56 - 63.
- Lepape M. C. 1980. Aperçu sur les fourrages ligneux des îles du cap-vert. *In* : Le houeroir (Eds.). Les fourrages ligneux en Afrique, état actuel des connaissances. Cipea, Addis Abeba : pp 123 - 125.
- Ndabalishé I. 1995. Agriculture vivrière ouest africaine à travers le cas de la côte d'ivoire. Idessa, 383 p.
- Ndoye I. 1999. Caractérisation taxonomique des bactéries fixatrices d'azote nodulant *acacia nilotica* var. *andansonii* et var. *tomentosa* (mimosoideae, sous famille des acacieae). Rapport de stage séjour scientifique haut niveau, Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes de Montpellier (France), 35 p.
- Niyonkuru D. N. 2002. La culture du pois cajan. Saïd Cameroun, 23 p.
- Normand P., Cournoyer B., Nazaret S. and P. Simonet. 1992. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *frankia*. *Gene.* 3 : 119 - 124.
- Nour S. M., Cleyet-Marel J. C., Beck D., Effose A. and M. P. Fernandez. 1994b. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can. J. Microbiol.* 44 : 345 - 354.
- Odeny D. A. 2007. The potential of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in Africa. *Nat. Resour. Forum.* 31 : 297 - 3005.
- Peoples M. B., Herridge D. F. and J. K. Ladha. 1995. Biological nitrogen fixation : an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production?. *Plant. Soil.* 174 : 3 - 28.
- Postma J., Walter S. and J. A. van Veen. 1989. Influence of different initial moisture contents on the distribution and population dynamics of introduced *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* 21 : 437 - 442.
- Ramsubhag A., Umaharan P. and A. Donawa. 2002. Partial 16S rRNA gene sequence diversity and numerical taxonomy of slow growing pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp) nodulating rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 216 : 139 - 144.
- Siambi M., Omanga P. G. A. and W. Songa. 1992. Status and needs of the national pigeonpea research program in kenya. *Int. Pigeon pea Newslett.* 16 : 31 - 36.
- Sy A., Giraud E., Samba R., de Lajudie P., Gillis M. and B. Dreyfus. 2001. Certaines légumineuses du genre *Crotalaria* sont spécifiquement nodulées par une nouvelle espèce de *Methylobacterium*. *Can J Microbiol.* 47 : 503 - 508.
- Sylla E. S. N. 1998. Caractérisation des rhizobiums et l'ontogénèse des nodules chez *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*. Rapport de stage séjour scientifique haut niveau, Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes LSTM - Cirad – IRD de Montpellier (France), 16 p.

- Van der maesen, L. J. G. *cajanus cajan (L.) millsp.*, 2006, (page consultée le 16 octobre 2010) <<http://database.prota.org/recherche.htm>>.
- Vance C. P., Graham P. H. and D. L. Allan. 2000. Biological nitrogen fixation. Phosphorus : a critical future need. *In* : F. O. Pedrosa, M. Hungria and M. G. Yates (Eds.). Nitrogen fixation : from molecules to crop productivity. Newton WE. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (The Netherlands) : pp 506 - 514.
- Vincent J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP handbook, n° 15. Blackwell scientific publications, Ltd., Oxford, England.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. and D. J. Lae. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173 : 697 - 703.
- Woese C. R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 512 : 221 - 271.
- Wolde-Meskel E., Berg T., Peters N. K. and A. Frostegard. 2004a. Nodulation status of native woody legumes, and phenotypic characteristics of associated rhizobia in soils of southern Ethiopia. *Biol. Fertil. Soils.* 40 : 55 - 66.
- Zézé A., Mutch L. A. and J. P. W. Young. 2001. Direct amplification of *nodD* from community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil. *Environ. Microbiol.* 3(6) : 363 - 370