

Diversité taxonomique et propriétés symbiotiques des rhizobia nodulant *Acacia raddiana* au nord et au sud du Sahara

P. DE LAJUDIE, B. DREYFUS,
C. BOVIN, S. BÂ, A. N'DIAYE,
J. LORQUIN, M. NEYRA,
C. DETREZ, A. WILLEMS, M. GILLIS,
H. JEDER, J.-C. PROMÉ



Résumé

Nous avons étudié une collection de 76 nouveaux isolats bactériens de nodules obtenus par piégeage sur plantes d'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana* *in vitro*, inoculées avec des suspensions de sols prélevés dans divers sites au nord (Tunisie) et au sud (Sénégal, Mauritanie) du Sahara, en comparaison avec 54 souches de références. L'analyse des nouveaux isolats par RAPD et SDS-PAGE a montré une grande diversité taxonomique parmi les isolats d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*. En effet, bien que toutes les souches puissent être qualifiées de « rhizobium à croissance rapide », elles se répartissent en au moins 9 groupes différents, dont plusieurs ne correspondent à aucun des groupes de rhizobia déjà décrits. Aucune relation entre la position taxonomique des souches, leur origine géographique, les conditions édaphiques ou la profondeur d'isolement n'a pu être établie. La caractérisation symbiotique des souches d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* a, au contraire, montré une grande homogénéité des caractéristiques symbiotiques majeures. Toutes les souches nodulent également *A. senegal*, *Prosopis juliflora* et *Leucaena leucocephala*, qui constituent avec *A. tortilis* subsp. *raddiana* un groupe d'inoculation. L'analyse des profils chromatographiques des facteurs Nod (FN) d'une quinzaine de souches réparties dans les différents groupes taxonomiques montre qu'ils sont très similaires. L'homogénéité structurale des FN des souches d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* a été confirmée par la détermination de la structure des FN de quelques souches représentatives. Cette étroite relation entre FN et plante d'isolement/spectre d'hôte indépendamment de la taxonomie des souches suggère l'existence d'une

forte pression de sélection de la part de la plante hôte et confirme nos observations précédentes, à savoir que les facteurs Nod sont de bons indicateurs du potentiel de nodulation d'un rhizobium donné.

Mots-clés :

RHIZOBIA TROPICAUX, ACACIA TORTILIS SUBSP. RADDIANA, TAXONOMIE, FACTEURS NOD,
SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE.

Abstract

We studied a collection of 76 new bacterial isolates from nodules developed on *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* plants inoculated *in vitro* with soil suspensions harvested in different sites in North (Tunisia) and South (Senegal, Mauritania) parts of Sahara. RAPD and SDS-PAGE analyses in comparison with 54 reference strains from diverse origins showed great taxonomic diversity among the new isolates. All of them are fast-growing and form at least 9 different groups, several of which could correspond to undescribed groups. No relationship could be established between taxonomic groups, geographical origin (North/South of Sahara) of the strains, edaphic conditions, or depth of soil sampling (down to - 32 m). Opposite to their taxonomic diversity, the new isolates share identical main symbiotic properties. All strains nodulating *A. tortilis* subsp. *raddiana* can also nodulate *Prosopis juliflora*, *Acacia senegal* and *Leucaena leucocephala*, these four plants then constituting a cross-inoculation group. By thin-layer chromatography, we showed that 20 *A. tortilis* subsp. *raddiana* strains, representative of the different taxonomic groups, share very similar Nod factor (NF) profiles, independently from their geographical origins. NF structure homogeneity was confirmed by NF structure determination of some representative strains. The consistency between NF and plant of isolation/nodulation spectrum, independently of the taxonomic position of the strains suggests a high selection pressure from the plant, and confirms our previous observations that NF are good markers for predicting the nodulation potential of a given rhizobial strain.

Keywords:

TROPICAL RHIZOBIA, ACACIA TORTILIS SUBSP. RADDIANA, TAXONOMY, NOD FACTORS,
NITROGEN-FIXING SYMBIOSIS.

Introduction

Comme de nombreuses plantes de la famille des Légumineuses, la plupart des espèces d'*Acacia* natives d'Afrique peuvent développer des nodules sur leurs

racines et établir ainsi une relation symbiotique fixatrice d'azote avec des bactéries du sol communément appelées rhizobium (HARRIER *et al.*, 1995). L'établissement et le fonctionnement de cette symbiose sont le résultat d'une interaction moléculaire entre la plante et la bactérie, contrôlée au niveau génétique par chacun des deux partenaires. Les plantes sécrètent des flavonoïdes qui, lorsqu'ils sont reconnus par le rhizobium, déclenchent la biosynthèse bactérienne de molécules lipo-oligosaccharidiques appelées facteurs Nod. Ceux-ci induisent chez la plante la formation d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique (DÉNARIÉ *et al.*, 1996 ; SPAINK, 1996).

Il a longtemps été communément admis que les arbres, en particulier les acacias, étaient nodulés par des rhizobia à croissance lente, mais TRINICK (1965, 1968 et 1980) a montré par la suite que des souches à croissance rapide étaient capables de noduler certains arbres appartenant aux genres *Leucaena*, *Mimosa*, *Acacia* et *Sesbania*.

En ce qui concerne *A. tortilis* (Forssk.) Hayne subsp. *raddiana* (Savi) Brenan au Sénégal, nos premières études avaient montré que l'espèce était nodulée par des rhizobia à croissance rapide (DREYFUS et DOMMERGUES, 1981). Depuis cette époque, la taxonomie bactérienne a fait de grands progrès, devenant « polyphasique » en prenant en compte tout un ensemble de caractéristiques phénotypiques et génotypiques (VANDAMME *et al.*, 1996). La classification de ces rhizobia à croissance rapide s'est ainsi considérablement affinée (YOUNG et HAUKKA, 1996), et on y distingue maintenant quatre genres : *Rhizobium* (JORDAN, 1982), *Azorhizobium* (DREYFUS *et al.*, 1988), *Sinorhizobium* (DE LAJUDIE *et al.*, 1994) et *Mesorhizobium* (JARVIS *et al.*, 1997). Phylogénétiquement, les genres *Rhizobium* et *Sinorhizobium* sont proches du genre *Agrobacterium* (WILLEMS et COLLINS, 1993), *Mesorhizobium* est proche de *Phyllobacterium*, (JARVIS *et al.*, 1997) et *Azorhizobium* est proche de *Xanthobacter* (RAINEY et WIEGEL, 1996).

Il est ainsi apparu qu'une même plante peut s'associer avec plusieurs types de microsymbiontes. Le soja (*Glycine max*) peut être nodulé par 6 espèces appartenant à 3 genres différents : *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense*, *Sinorhizobium fredii*, *S. xinjiangensis* et *Mesorhizobium tianshanense* ; *Sesbania rostrata* peut être nodulé par trois espèces appartenant à deux genres différents : *Sinorhizobium saheli*, *S. terangaie* et *Azorhizobium caulinodans* (DREYFUS *et al.*, 1988 ; DE LAJUDIE *et al.*, 1994 ; TRÜPER et DE CLARI, 1997) ; les souches isolées d'*Acacia* sont génétiquement diverses et appartiennent aux genres *Bradyrhizobium* (DREYFUS et DOMMERGUES, 1981 ; DUPUY *et al.*, 1994), *Sinorhizobium* (DE LAJUDIE *et al.*, 1994 ; LORTET *et al.*, 1996 ; NICK *et al.*, 1995, 1999), et *Mesorhizobium* (DE LAJUDIE *et al.*, 1998 b).

Cependant, des tests de nodulation réalisés avec une collection de rhizobia isolés d'*Acacia* et de *Sesbania* et appartenant aux espèces *Sinorhizobium saheli*, *S. terangaie* et *Mesorhizobium plurifarum* ont montré que, malgré cette diversité taxonomique, les isolats d'une même plante présentent une spécificité d'hôte équivalente. Parmi différents marqueurs moléculaires de la nodulation évalués, seuls les profils chromatographiques des facteurs Nod ont regroupé les souches

en fonction de leur spectre d'hôte. Il a été proposé d'utiliser l'analyse chromatographique des facteurs Nod comme méthode de caractérisation symbiotique des rhizobia permettant l'analyse de leur diversité symbiotique (LORTET *et al.*, 1996) et de l'associer à la taxonomie pour la description de biovars à l'intérieur de l'espèce (souches de la même espèce mais de spécificités d'hôte différentes).

Nous rapportons dans cette étude un ensemble de données sur la nodulation d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* en utilisant 54 souches de diverses provenances de notre collection et 76 nouveaux isolats de nodules d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* provenant de diverses régions de son aire de répartition naturelle, notamment au nord et au sud du Sahara. La diversité des nouveaux isolats a été évaluée d'un point de vue taxonomique par les techniques de RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) et SDS-PAGE (analyse des protéines cellulaires totales sur gel de polyacrylamide-SDS), et d'un point de vue symbiotique par l'étude de leurs spectres d'hôtes, de leur efficacité et de l'analyse de leurs facteurs Nod.

Constitution d'une collection d'isolats d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*

Il est rare de trouver des nodules d'arbre dans la nature, et extrêmement difficile d'apporter la preuve que des nodules mis en évidence dans un sol appartiennent de fait à l'arbre qui se trouve à proximité. Cela nous a contraints à utiliser une procédure de « piégeage à partir du sol », bien que celle-ci constitue un biais par rapport à l'isolement direct à partir d'un nodule prélevé sur le terrain. L'isolement a été effectué à partir de nodules formés sur des individus d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* inoculés *in vitro* avec des échantillons de sols prélevés dans diverses régions : pour le nord du Sahara, la station de Haddej, en Tunisie ; pour le sud du Sahara, les sols ont été prélevés dans le sud de la Mauritanie et au Sénégal ; ces sols représentent divers écosystèmes, jusqu'à des zones salées, et sont issus de prélèvements effectués à différentes profondeurs, jusqu'à - 32 mètres. Au total, 76 nouveaux isolats d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* ont ainsi été obtenus (tabl. I).

Analyse moléculaire de la diversité taxonomique

En accord avec nos précédents travaux (DREYFUS et DOMMERGUES, 1981), toutes les souches que nous avons isolées de *A. tortilis* subsp. *raddiana* peuvent être considérées comme des rhizobia à croissance rapide, puisqu'elles forment des

▽ Tableau I – Liste des souches.

N° d'origine	N° LMG	Plante d'isolement ou origine	Origine géographique	Conditions édaphiques / Profondeur de prélèvement	Référence ou source
Nouveaux isolats					
ORS40	15168	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	argilo-sableux, 25 cm	ce travail
ORS46	15169	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 50 cm	ce travail
ORS47	15170	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 75 cm	ce travail
ORS48		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 50 cm	ce travail
ORS49	15171	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 50 cm	ce travail
ORS50	15172, 15173	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 50 cm	ce travail
ORS1042	15283	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Cambérène)		ce travail
ORS1043	15284	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Mbidi)	bas fond 0-15 cm	ce travail
ORS1044	15285	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Richard-Toll)		ce travail
ORS1046	15286	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Cambérène)		ce travail
ORS1080	15287	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 25 - 50 cm	ce travail
ORS1081	15288	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 25 - 50 cm	ce travail
ORS1082	15289	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 25 - 50 cm	ce travail
ORS1083	15290	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 25 - 50 cm	ce travail
ORS1084	15291	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 25 - 50 cm	ce travail
ORS1085	15292	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 25 - 50 cm	ce travail
ORS1086	15293	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 25 - 50 cm	ce travail
ORS1087	15294	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Souilène)	- 25 - 50 cm	ce travail
ORS1089	15295	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Mbidi)		
ORS1091	15296	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Diourbel-Lagbar)		ce travail
ORS 1095	15297	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal Diourbel-Lagbar)		de Lajudie et al., 1998
ORS 1096	15298	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Doundodji)		de Lajudie et al., 1998
ORS1100	15299	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Saint-Louis)		ce travail
ORS1101		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Saint-Louis)		ce travail
ORS1230	15306	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région St-Louis)	sol salé	ce travail
ORS1231	15307	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région St-Louis)	sol salé	ce travail
ORS1232	15308	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région St-Louis)	sol salé	ce travail
ORS1233	15309	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région St-Louis)	sol salé	ce travail
ORS1234	15310	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région St-Louis)	sol salé	ce travail
ORS1236	15311	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région St-Louis)	sol salé	ce travail

▽ Tableau I (suite).

N° d'origine	N° LMG	Plante d'isolement ou origine	Origine géographique	Conditions édaphiques / Profondeur de prélèvement	Référence ou source
ORSI237	15312	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région St-Louis)	sol salé	ce travail
ORSI238	15313	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région St-Louis)	sol salé	ce travail
ORSI239	15314	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région St-Louis)	sol salé	ce travail
ORSI240	15315	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région St-Louis)	sol salé	ce travail
ORSI241		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région St-Louis)	sol salé	ce travail
ORSI242		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Ferlo)	région humide	ce travail
ORSI243	15316	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Ferlo)	région humide	ce travail
ORSI244	15317	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Ferlo)	région humide	ce travail
ORSI245		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Ferlo)	région humide	ce travail
ORSI246		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Ferlo)	région humide	ce travail
ORSI247		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Ferlo)	région humide	ce travail
ORSI248		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Ferlo)	humide non inondé	ce travail
ORSI249		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Ferlo)	humide non inondé	ce travail
ORSI250		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Ferlo)	humide non inondé	ce travail
ORSI251	15318	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Ferlo)	humide non inondé	ce travail
ORSI254	15319	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Ferlo)	humide non inondé	ce travail
ORSI255	15320	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	0 - 50 cm	ce travail
ORSI256	15321	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	0 - 50 cm	ce travail
ORSI257	15322	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	0 - 50 cm	ce travail
ORSI258	15323	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	- 50 - 100 cm	ce travail
ORSI259	15324	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	- 50 - 100 cm	ce travail
ORSI260	15325	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	- 50 - 100 cm	ce travail
ORSI261	15326	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	- 50 - 100 cm	ce travail
ORSI262	15327	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	- 50 - 100 cm	ce travail
ORSI263	15328	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	- 50 - 100 cm	ce travail
ORSI264	15329	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	- 50 - 100 cm	ce travail
ORSI265	15330	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	- 31 - 32 m	ce travail
ORSI266	15331	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	- 31 - 32 m	ce travail
ORSI267	15332	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	- 31 - 32 m	ce travail
ORSI268		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)	- 31 - 32 m	ce travail
ORSI281	15340	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)		ce travail

▽ Tableau I (suite).

N° d'origine	N° LMG	Plante d'isolement ou origine	Origine géographique	Conditions édaphiques / Profondeur de prélèvement	Référence ou source
ORS1282	15341	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (région de Louga)		ce travail
ORS1310	15342	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Burundi		ce travail
ORS1316	15343	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Mauritanie (Sud)		ce travail
ORS1318	15344	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Mauritanie (Sud)		ce travail
ORS1319	15345, 15346	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Mauritanie (Sud)		ce travail
ORS1329	15347	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Mauritanie (Sud)		ce travail
ORS1333	15348	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Mauritanie (Sud)		ce travail
RAT 900		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Tunisie (Haddej)		ce travail
RAT 901	15350	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Tunisie (Haddej)		ce travail
RAT 902	15351	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Tunisie (Haddej)		ce travail
RAT 904	15352	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Tunisie (Haddej)		ce travail
RAT 905	15353	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Tunisie (Haddej)		ce travail
RAT 907	15354	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Tunisie (Haddej)		ce travail
RAT 908	15355	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Tunisie (Haddej)		ce travail
RAT 909		<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Tunisie (Haddej)		ce travail
<i>Mesorhizobium plurifarium</i>					
ORS 13	7921	<i>Acacia</i> sp.	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 654	10056	<i>Leucaena diversifolia</i>	Brésil		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 655	10061	<i>Leucaena pulvurulenta</i>	Brésil		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 656	10093	<i>Leucaena diversifolia</i>	Brésil		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1018	11881	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal (Palmarin)		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1038	11896	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal (Ferlo)		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1040	11898	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal (Ferlo)		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 38	11931	<i>Prosopis juliflora</i>	Sénégal (Mbao)		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1001	7836	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1002	7854	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1004	7848	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1010	7853	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1014t1	7849t1	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b

▽ Tableau I (suite).

N° d'origine	N° LMG	Plante d'isolement ou origine	Origine géographique	Conditions édaphiques / Profondeur de prélèvement	Référence ou source
ORS 1015	7839	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1020	11883	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1024	11884	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1026	11886	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1029	11889	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1030	11890	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1031	11891	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1032 ^T	11892 ^T	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1035	11893	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1036	11894	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1037	11895	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1038	11896	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS 1040	11898	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
ORS1088	11880	<i>Acacia seyal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1998 b
<i>Mesorhizobium loti</i>					
NZP 2230	6126	<i>Lotus maroccanus</i>	Maroc		Jarvis et al., 1986
NZP 2213 ^T	6125 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	Nouvelle-Zélande		Jarvis et al., 1986
ORS 652	6123	<i>Lotus divaricatus</i>	Nouvelle-Zélande		
<i>Mesorhizobium ciceri</i>					
UPM-Ca7 ^T	17150 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Espagne		Nour et al., 1994
522	17149	<i>Cicer arietinum</i>	Russie		Nour et al., 1994
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>					
UPM-Ca142	14990	<i>Cicer arietinum</i>	Espagne		Nour et al., 1995
<i>Mesorhizobium huakuii</i>					
IAM 14158 ^T	14107 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	Nanjing, Chine		Chen et al., 1991

▽ Tableau I (suite).

N° d'origine	N° LMG	Plante d'isolement ou origine	Origine géographique	Conditions édaphiques / Profondeur de prélèvement	Référence ou source
<i>Sinorhizobium fredii</i>					
USDA 205 ^T	6217 ^T	<i>Glycine max</i>	Henan, Chine		Jarvis et al., 1986
USDA 191	8317	Soil	Shanghai, Chine		Jarvis et al., 1986
<i>Sinorhizobium meliloti</i>					
NZP 4009	6130	<i>Medicago sativa</i>	Australie		
<i>Sinorhizobium medicae</i>					
m75 (Hambi 1808)	16579	<i>Medicago sativa</i>			Eardly et al., 1990
m102 (Hambi 1809)	16580	<i>Medicago sativa</i>			Eardly et al., 1990
Hambi 1837	16581				K. Lindström
<i>Sinorhizobium teranga</i> *					
ORS 8	11870	<i>Sesbania rastrata</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1994
ORS15	7833	<i>Sesbania</i> sp.	Sénégal (Mbidi)		de Lajudie et al., 1994
ORS 19	7841t1	<i>Sesbania cannabina</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1994
ORS 22	6463	<i>Sesbania rastrata</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1994
ORS 51	7843	<i>Sesbania rostrata</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1994
ORS 53	11860	<i>Sesbania rastrata</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1994
ORS 604	11865	<i>Sesbania aculeata</i>	Sénégal (Bel Air)		de Lajudie et al., 1994
ORS 929	8313t1	<i>Acacia</i> sp.	Sénégal		de Lajudie et al., 1994
ORS 613	11866	<i>Sesbania sesban</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1994
ORS1007	7847	<i>Acacia laeta</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1994
ORS 1009 ^T	7834 ^T	<i>Acacia laeta</i>	Sénégal (Mbidi)		de Lajudie et al., 1994
ORS 1016	7851	<i>Acacia laeta</i>	Sénégal (Bakel)		de Lajudie et al., 1994
ORS 1025		<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie et al., 1994
ORS1045	11901	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	Sénégal (Sangonie)		de Lajudie et al., 1994

* La nomenclature *S. teranga* (DE LAJUDIE et al., 1994) a été corrigée en *S. teranga* (TRÜPER et DE CLARI, 1997).

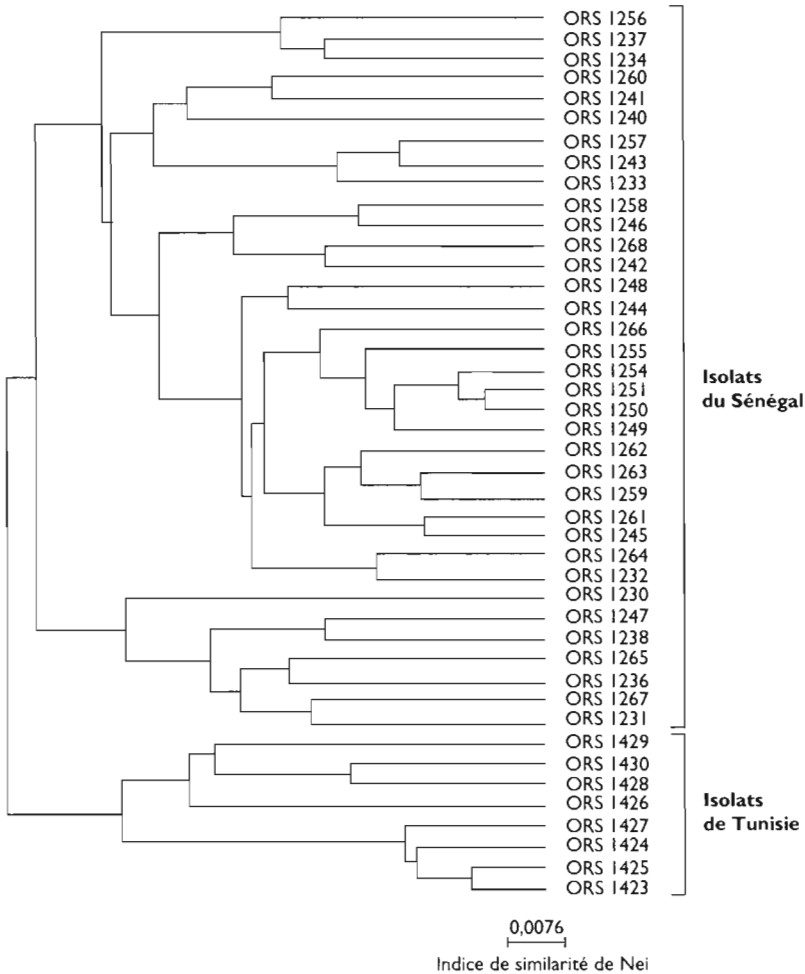
▽ Tableau 1 (suite).

N° d'origine	N° LMG	Plante d'isolement ou origine	Origine géographique	Conditions édaphiques / Profondeur de prélèvement	Référence ou source
ORS 1047	11903	<i>Acacia horrida</i>	Sénégal		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
ORS 1057	11911	<i>Acacia mollissima</i>	Sénégal		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
ORS1058	11912	<i>Acacia mollissima</i>	Sénégal		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
ORS1071	11924	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
ORS1072	11925	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal (Dahra)		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
ORS 1073	11926	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal (Djokoul)		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
<i>Sinorhizobium saheli</i>					
ORS 12	7835t1		Sénégal		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
ORS 600	11864	<i>Sesbania pachycarpa</i>	Sénégal		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
ORS 609 ^T	7837 ^T	<i>Sesbania cannabina</i>	Sénégal (Bel Air)		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
ORS 611	7842	<i>Sesbania grandiflora</i>	Sénégal (Bel Air)		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
<i>Rhizobium leguminosarum</i>					
NZP 561	6122	<i>Trifolium repens</i>	Australie		B. Jarvis
<i>Rhizobium tropici</i>					
Group a					
CFN 299	9517	<i>Phaseolus vulgaris</i>			Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
CNPAF 119	9502	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brésil		Moreira <i>et al.</i> , 1993
Group b					
CIAT 899 ^T	9503 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Colombie		Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
C-05	9518	<i>Phaseolus vulgaris</i>			
<i>Rhizobium etli</i>					
ORS 645 ^T	11937 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mexique		Segovia <i>et al.</i> , 1993
<i>Rhizobium galegae</i>					
HAMBI 540 ^T	6214 ^T	<i>Galega orientalis</i>	Finlande		
HAMBI 1147	6215	<i>Galega orientalis</i>	Russie		
HAMBI 1428	15143				

▽ Tableau I (suite et fin).

N° d'origine	N° LMG	Plante d'isolement ou origine	Origine géographique	Conditions édaphiques / Profondeur de prélèvement	Référence ou source
<i>Agrobacterium</i> biovar I					
ATCC 19358 ^T	140 ^T				
CDC A6597	383				
<i>Agrobacterium vitis</i>					
Pan. AG61	257				
NCPPB 1771	233				
<i>Azorhizobium caulinodans</i>					
ORS 571 ^T	6465 ^T	<i>Sesbania rostrata</i>	Sénégal		Dreyfus et al., 1988
FY12	11352	<i>Sesbania rostrata</i>	Sénégal		Rinaudo et al., 1991
<i>Allorhizobium undicola</i>					
ORS 991	11874	<i>Neptunia natans</i>	Sénégal (Kaolack)		de Lajudie et al., 1998 a
ORS 992 ^T	11875 ^T	<i>Neptunia natans</i>	Sénégal (Kaolack)		de Lajudie et al., 1998 a
ORS 995	11876	<i>Neptunia natans</i>	Sénégal (Kaolack)		de Lajudie et al., 1998 a
ORS 996	11877	<i>Neptunia natans</i>	Sénégal (Kaolack)		de Lajudie et al., 1998 a
ORS 997	11878	<i>Neptunia natans</i>	Sénégal (Kaolack)		de Lajudie et al., 1998 a
ORS 998	11879	<i>Neptunia natans</i>	Sénégal (Dakar-Bel Air)		de Lajudie et al., 1998 a
<i>Sinorhizobium</i> sp.					
NGR 234	16375	<i>Dolichos lablab</i>			
<i>Rhizobium</i> sp.					
ORS 507		<i>Sesbania pachycarpa</i>	Sénégal		
ORS 615		<i>Sesbania rostrata</i>	Sénégal		
ORS 911		<i>Acacia farnesiana</i>	Sénégal		
ORS 1019		<i>Acacia senegal</i>	Sénégal		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.					
ORS 17		<i>Alysicarpus ovalifolius</i>	Sénégal		
ORS 101		<i>Faidherbia albida</i>	Sénégal		

colonies en 48 heures sur milieu YMA. Pour caractériser ces souches, nous avons employé deux techniques dont le niveau de résolution se situe entre la souche et l'espèce (VANDAMME *et al.*, 1996) ; l'une, relativement récente, est génotypique (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA), et l'autre phénotypique (analyse des profils de protéines totales par SDS-PAGE).



▽ Fig. 1

Dendrogramme (coefficient de Jaccard en utilisant la méthode UPGMA) montrant les relations entre 43 isolats de nodules d'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana* sur la base de leurs profils RAPD.

Les profils RAPD (utilisant l'amorce OP B14) sont analysés visuellement et chaque produit d'amplification est identifié en fonction de sa position de migration.

Chaque isolat est examiné pour la présence ou l'absence de chaque amplifiat.

Le dendrogramme est ensuite construit par comparaison par paires sur la base de la proportion des amplifiats communs et sur les indices de Nei, en utilisant la technique UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages).

RAPD

Afin d'évaluer le degré de diversité génomique des nouveaux isolats obtenus à partir de nodules d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*, 43 d'entre eux ont été analysés par une technique RAPD modifiée en utilisant deux combinaisons d'amorces (WILLIAMS *et al.*, 1990). Les résultats montrent une grande diversité génomique puisque aucun profil complet n'est conservé parmi les isolats. Les isolats de Tunisie forment un groupe qui semble diverger de ceux formés par les isolats du Sénégal (fig. 1). Cependant, le pouvoir discriminant de cette technique s'est avéré trop fin pour une technique de groupage ; nous avons donc employé une autre technique, l'analyse des protéines cellulaires totales par SDS-PAGE, déjà éprouvée dans le cas des rhizobia (MOREIRA *et al.*, 1993 ; DE LAJUDIE *et al.*, 1994, 1998 a, 1998 b).

SDS-PAGE

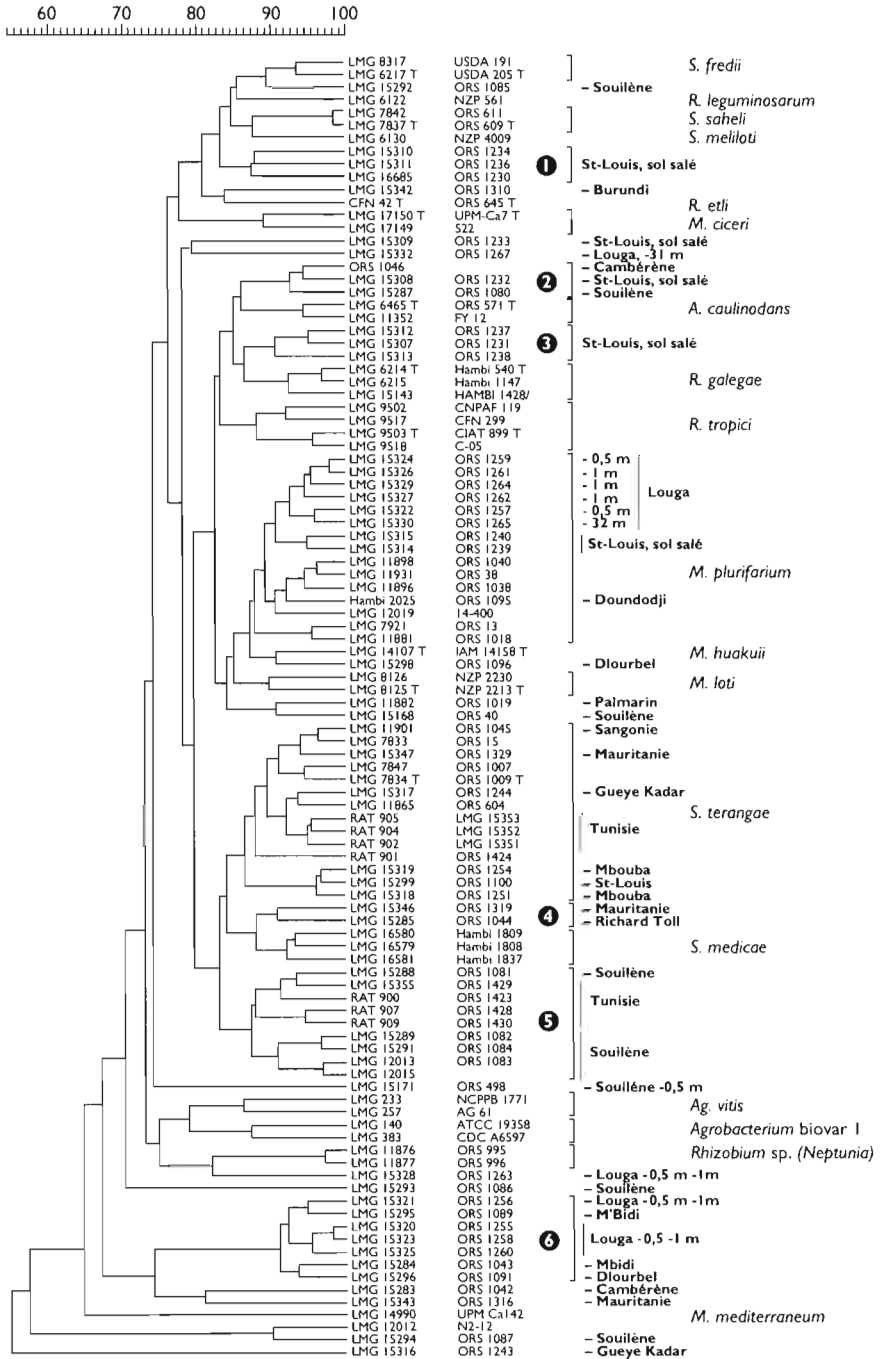
La technique SDS-PAGE est simple et rapide, très informative (au niveau de l'espèce) et nous disposons d'une importante base de données avec de nombreuses souches de référence (DE LAJUDIE *et al.*, 1994, 1998 a, 1998 b). Les protéines cellulaires totales sont purifiées à partir d'une culture bactérienne et séparées sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Chaque étape de l'expérimentation est réalisée dans des conditions très standardisées. Le profil électrophorétique obtenu pour chaque souche est digitalisé, normalisé et analysé à l'aide du logiciel GelCompar (Applied Maths, Kortrijk, Belgique), et confronté à la base de données.

L'analyse des isolats de *A. tortilis* subsp. *raddiana* par la technique SDS-PAGE a confirmé la diversité mise en évidence par RAPD en faisant apparaître une grande hétérogénéité de profils électrophorétiques. Les résultats, illustrés par la figure 2, montrent qu'une vingtaine de ces souches sont regroupées avec les souches de référence de *S. teranga*, *S. fredii*, et *M. plurifarum*, suggérant que ces souches appartiennent à ces espèces. Les 56 autres souches sont réparties dans six groupes différents de ceux formés par les espèces décrites. Certains d'entre eux pourraient représenter des groupes nouveaux, mais leur place taxonomique reste à préciser par des techniques complémentaires. Des expériences préliminaires de séquençage d'une partie du gène codant pour l'ARNr 16S et d'hybridations ADN/ADN ont, jusqu'à présent, confirmé ces résultats.

Relation entre taxonomie et origine écologique, géographique et édaphique de la souche

Aucune relation n'a pu être établie entre l'origine géographique et écologique et le groupe électrophorétique des souches d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*. Les souches tunisiennes, mauritaniennes et sénégalaises se groupent en mélange, notamment dans *S. teranga*. Certaines souches provenant de zones salées de la région de St-Louis (Sénégal) forment les groupes 1 et 2, mais d'autres appartiennent à différents groupes comprenant des souches d'autres provenances. À l'intérieur

Un arbre au désert,
Acacia raddiana



▽ Fig. 2

Dendrogramme montrant les relations entre les profils protéiques totaux obtenus par SDS-PAGE des souches de *A. tortilis* subsp. *raddiana* et de souches de référence de différentes espèces de *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Agrobacterium*.

Le dendrogramme est construit en utilisant le logiciel *GelCompar* et la méthode *UPGMA*.

du groupe de *M. plurifarium* sont retrouvées des souches de diverses profondeurs (0-15 cm, 50-100 cm, 31-32 m), suggérant l'identité des populations de rhizobia en surface et en profondeur, de façon analogue à ce qui avait été montré dans le cas des souches de *Bradyrhizobium* de *Faidherbia albida* par DUPUY *et al.* (1994).

Analyse de la diversité symbiotique

Spectre d'hôte des isolats d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* et nodulation d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*

LORTET *et al.* (1996) ont montré que les souches isolées de divers *Acacia* (*A. senegal*, *A. tortilis* subsp. *raddiana*, *A. laeta*, *A. mollissima*, *A. horrida*, *A. seyal*) nodulent *Acacia tortilis* ainsi que *Leucaena leucocephala* et *Prosopis juliflora*.

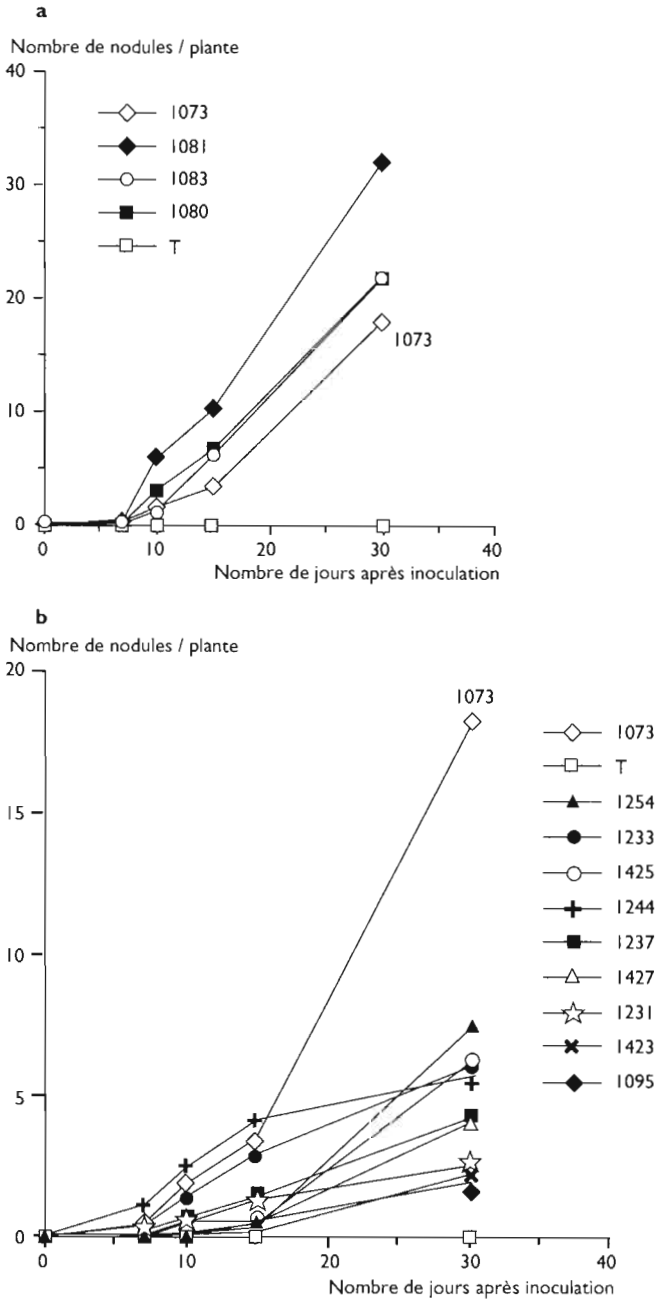
Nous avons donc testé 13 nouveaux isolats d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* pour leur capacité à noduler *A. raddiana*, *A. senegal*, *Prosopis juliflora* et *Leucaena leucocephala*. Le test que nous avons utilisé pour cela est celui décrit par GIBSON (1963) qui consiste à inoculer la racine d'une jeune plante bactériologiquement stérile en croissance dans un tube avec une culture de la souche à tester (6 à 8 répétitions par souche). Les 13 isolats testés (voir fig. 3) nodulent *A. tortilis* subsp. *raddiana*, *A. senegal* et *L. leucocephala* et également *P. juliflora*, à l'exception de la souche RAT 902.

L'étude comparative des cinétiques de nodulation d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* par chacun de ces 13 isolats montre que le nombre de nodules observés après 30 jours de culture est très variable d'une souche à l'autre, de quelques nodules à plus de 30 nodules par plante (fig. 3). Parmi elles, les 3 souches originaires de Tunisie testées induisent moins de 7 nodules par plante. La représentation de la cinétique de la fixation d'azote mesurée par l'ARA montre une courbe en cloche dont la valeur maximale se situe entre 24 et 27 jours après l'apparition des nodules (N'DIAYE, 1996).

En parallèle, nous avons testé 54 souches de rhizobia de diverses provenances (plantes, régions) et de divers groupes taxonomiques pour leur capacité à induire la nodulation d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* (tabl. II). Les souches trouvées capables de noduler *A. tortilis* subsp. *raddiana* sont en majorité des souches isolées à l'origine de plantes des genres *Acacia*, *Prosopis*, *Leucaena* et *Neptunia* et appartenant à *S. terangae* biovar *acaciae*, *M. plurifarium* et une nouvelle espèce (DE LAJUDIE *et al.*, 1998 a). La souche de *Sinorhizobium* sp. NGR 234, à large spectre d'hôte, et la souche de *R. tropici* CFN 299 plus quelques autres souches non classées sont également capables d'induire la nodulation chez *A. tortilis* subsp. *raddiana*. Les souches de *S. terangae* biovar *sesbaniae* sont particulières en ce sens qu'elles sont capables d'induire une nodulation faible et retardée sur *A. tortilis* subsp. *raddiana*.

Les résultats de ce criblage des souches de collection sur plantes indiquaient sept souches qui donnaient le meilleur effet sur la croissance de la plante et son aspect

*Un arbre au désert,
Acacia raddiana*



▽ Fig. 3 (a et b)

Cinétique de nodulation des souches d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* pour une période de 30 jours. Six tubes par traitement et par souche ont été effectués.

a : souches dont le nombre de nodules > au témoin inoculé ORS 1073 ;

b : souches dont le nombre de nodules < au témoin inoculé ORS 1073 (d'après BÂ, 1996).

▽ Tableau II – Nodulation d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*
par des souches de collection.

(D'après N'DIAYE, 1996 ; BÂ, 1996 ; LORTET et al., 1996 ;
de LAJUDIE et al., 1998 a et 1998 b).

Souche	Plante d'isolement	Nodulation de <i>A. tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 17	<i>Alysicarpus ovalifolius</i>	-
ORS 101	<i>Faidherbia albida</i>	-
<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571 ^T	<i>Sesbania rostrata</i>	-
<i>Mesorhizobium loti</i> ORS 652	<i>Lotus divaricatus</i>	-
<i>Rhizobium</i> sp. ORS 507, ORS 615	<i>Sesbania</i> spp.	-
ORS 911, ORS 1019	<i>Acacia</i> spp.	+
<i>Rhizobium tropici</i> CFN 299	<i>Phaseolus vulgaris</i>	+
<i>Sinorhizobium saheli</i> ORS 600, ORS 609 ^T , ORS 611	<i>Sesbania</i> sp.	-
ORS 12	<i>Prosopis juliflora</i>	+
<i>Sinorhizobium terangae</i> bv. <i>sesbaniae</i> ORS 8, ORS 15, ORS 19, ORS 604, ORS 613, ORS 22, ORS 51, ORS 53	<i>Sesbania</i> spp.	±d
<i>Sinorhizobium terangae</i> bv. <i>acaciae</i> ORS 929, ORS 1007, ORS 1009 ^T , ORS 1016, ORS 1025, ORS 1045, ORS 1047, ORS 1057, ORS 1058, ORS 1071, ORS 1072, ORS 1073	<i>Acacia</i> spp.	+
<i>Sinorhizobium</i> sp. NGR 234	<i>Dolichos lablab</i>	+
<i>Mesorhizobium plurifarum</i> ORS 654, ORS 655, ORS 656 ORS 1001, ORS 1002, ORS 1004, ORS 1010, ORS 1014, ORS 1015, ORS 1018, ORS 1020, ORS 1024, ORS 1026, ORS 1029, ORS 1030, ORS 1031, ORS 1032 ^T , ORS 1035, ORS 1036, ORS 1037, ORS 1038, ORS 1040, ORS 1088	<i>Leucaena</i> spp. <i>Acacia</i> spp.	+
<i>Allorhizobium undicola</i> ORS 991, ORS 992 ^T , ORS 995, ORS 996, ORS 997, ORS 998	<i>Neptunia natans</i>	+

Chaque résultat est la moyenne de 6 répétitions.

+ : plus de 50 % des plantes testées nodulées ; - : aucune plante testée nodulée ;
± : entre 10 % et 50 % des plantes nodulées ; d : nodulation retardée.

(couleur verte). Ces souches ont été utilisées pour une seconde expérience dans laquelle on a mesuré l'activité de réduction d'acétylène (ARA), la masse de matière sèche totale et la quantité d'azote total des plantes. Les souches qui donnent les meilleurs résultats de fixation d'azote, ORS 1016, ORS 1072 et ORS 1073, appartiennent à *Sinorhizobium terangae* biovar *acaciae* (N'DIAYE, 1996).

Ces trois souches, une souche isolée de *Neptunia natans* (ORS 998) et une souche de *M. plurifarium* (ORS 655) ont ensuite été utilisées pour des essais en pots, en milieu extérieur et conditions semi-contrôlées. Chaque souche a été inoculée à 6 plantes, et, après six mois la quantité d'azote fixé a été estimée : (1) par mesure de la quantité d'azote total des plantes par la méthode de Kjeldahl (BREMNER, 1965) ; (2) par mesure de leurs masses de matière sèche. L'analyse statistique montre que dans nos conditions, et sur cette période, on n'observe aucune incidence significative de la souche utilisée sur les paramètres mesurés, et même aucune incidence de l'inoculation, les valeurs obtenues pour le témoin non inoculé, lui-même nodulé par la contamination naturelle extérieure, étant au même niveau (tabl. III). Ces résultats indiquent qu'aucune des souches sélectionnées n'est compétitive vis-à-vis des populations naturelles et/ou plus performante que celles-ci.

▽ Tableau III – Dosage d'azote par la méthode de Kjeldahl (BREMNER, 1965) de plants d'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana* cultivés en pots pendant six mois.

	Poids sec (g/plante)			Teneur en azote (%)		Quantité d'azote (g/plante)		
	P. aér.	Racines	Total	P. aér.	Racines	P. aér.	Racines	Total
Témoin	12,45a	8,63a	20,57a	1,20a	1,25a	0,15a	0,10a	0,24a
655	9,86a	6,50a	16,36a	1,32a	1,38a	0,13a	0,09a	0,22a
998	9,89a	5,94a	15,35a	1,41a	1,35a	0,14a	0,08a	0,23a
1016	13,56a	7,56a	21,12a	1,54a	1,32a	0,17a	0,10a	0,27a
1072	13,76a	9,03a	22,79a	1,23a	1,22a	0,17a	0,11a	0,28a
1073	13,38a	7,24a	20,62a	1,27a	1,24a	0,17a	0,09a	0,26a
CV %	30,9	27,4	28,0			32,7	29,2	39,3

Chaque valeur est la moyenne de six répétitions.

Pour chaque expérience, les nombres de la même colonne suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test de Newman-Keuls, 1957).

CV : coefficient de variation ; P. aér. : parties aériennes (d'après N'DIAYE, 1996).

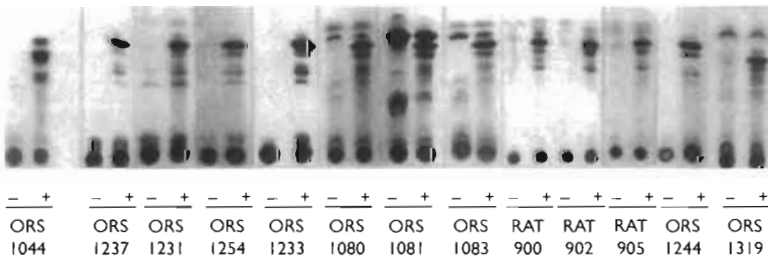
En conclusion de ces études de nodulation, il faut souligner l'existence d'un groupe de nodulation renfermant *A. senegal*, *Prosopis juliflora*, *Leucaena leucocephala* et *A. tortilis* subsp. *raddiana* nodulés par des souches de diverses positions taxonomiques, appartenant à différents genres comme *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*.

Caractérisation des facteurs de nodulation

Les facteurs Nod sont constitués d'un squelette de 3 à 6 résidus N-acétyl-D glucosamine substitué par une chaîne d'acyl au niveau de l'extrémité non réductrice et portant diverses décorations aux deux extrémités de la chaîne oligosaccharidique. La nature de l'acide gras et des autres substitutions varie selon la souche ou l'espèce de rhizobia et joue un rôle déterminant dans la spécificité d'hôte de la bactérie. L'addition dans le milieu de culture d'un précurseur radioactif comme l'acide acétique marqué au carbone 14, qui est incorporé dans la molécule au niveau des groupements N-acétyl du squelette de base, permet de marquer radioactivement ces molécules et de les visualiser après séparation en CCM (chromatographie sur couche mince). La migration des produits s'effectue en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

La plupart des souches sauvages de rhizobia ne produisent pas suffisamment de facteurs Nod pour être détectées en CCM. Il est possible d'augmenter la production de facteurs Nod grâce à l'introduction d'un gène régulateur hétérologue *nodD* cloné dans un plasmide multicopie (LEROUGE *et al.*, 1990 ; PRICE *et al.*, 1992). Dix-huit souches isolées d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* représentant les différents groupes électrophorétiques ont été modifiées par l'introduction du gène *nodD* de *Sinorhizobium* sp. NGR234 cloné sur un plasmide multicopie selon la méthode décrite par LORTET *et al.* (1996).

À l'exception de la souche ORS 1044, toutes les souches surproductrices construites à partir des souches de *A. tortilis* subsp. *raddiana* étudiées présentent des profils chromatographiques très similaires, quelles que soient leur origine géographique et leur position taxonomique (BOVIN *et al.*, 1998). La figure 4 illustre ces résultats. L'homogénéité obtenue est supérieure à celle des profils de souches isolées de diverses espèces d'*Acacia* ou maintenues en laboratoire depuis de nombreuses années. Ces résultats suggèrent que dans des conditions où les bactéries sont en compétition, la plante exerce une pression de sélection en



▽ Fig. 4

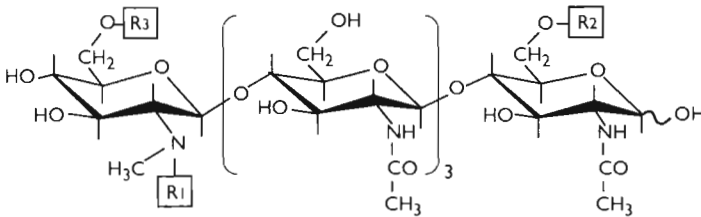
Séparation en chromatographie sur couche mince des facteurs Nod de souches surproductrices d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*.

(+) : induit par un flavonoïde ; (-) : non induit.

La radioactivité est visualisée après 3 à 8 jours d'exposition avec un film Kodak X-OMAT K. (D'après BÂ *et al.*, 2002)

faveur des souches produisant une population de facteurs Nod présentant des particularités structurales bien définies. Ces observations vont dans le même sens que celles de Streeter (résultats non publiés) qui a montré que des souches de *Bradyrhizobium japonicum* conservées plusieurs années au laboratoire présentent des profils de facteurs Nod différents, alors que des souches fraîchement isolées dans l'Ohio (USA) présentent des facteurs Nod similaires.

Les facteurs Nod de souches surproductrices dérivées de 4 souches appartenant à différents groupes taxonomiques ont été purifiés par HPLC (High Liquid Chromatography Pressure). Leur structure a été déterminée par LSIMS (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry), par GC (Chromatographie en phase gazeuse) et par des méthodes relatives à l'identification des sucres et des lipides (fig. 5 et tabl. IV), confirmant les similitudes observées entre les profils chromatographiques. Toutes les souches produisent des molécules pentamériques dont l'extrémité non réductrice porte un groupement N-méthyl, une chaîne d'acyl en C18:0, C18:1 ou C16:0, et un groupement carbamoyl pour la majorité des souches. L'extrémité réductrice peut être sulfatée ou non.



▽ Fig. 5

Structure des facteurs Nod des souches nodulant *A. tortilis* subsp. *raddiana*.
Pour R1, R2 et R3, voir le tableau IV.

▽ Tableau IV – Structure chimique des facteurs Nod prépondérants de quelques souches surproductrices isolées de nodules de *A. tortilis* subsp. *raddiana*.

Souche	Espèce ou groupe SDS Page	Substitutions		
		R1	R2	R3
ORS1244 (pA28)	<i>S. terengae</i> (Sénégal)	C18:1, C18:0, C16:0	SO ₃ H/H	Carbamoyl
ORS1425 (pA28)	<i>S. terengae</i> (Tunisie)	C18:1	SO ₃ H/H	Carbamoyl
ORS1231 (pA28)	Groupe 3	C18:1	SO ₃ H/H	H
ORS1044 (pA28)	Groupe 4	C18:1, C18:0	SO ₃ H/H	Carbamoyl

R1, R2, R3 : voir fig. 5.

Le plasmide pA28 contient le gène nodDI de *Rhizobium* sp. NGR234 cloné sur un plasmide multicopie.

Conclusion

Cette étude constitue une première indication de la forte hétérogénéité taxonomique des souches de rhizobia capables d'induire la formation de nodules sur *A. tortilis* subsp. *raddiana* au Sénégal et en Tunisie, deux pays qui représentent le nord et le sud du Sahara. Toutes les souches de collection isolées de diverses espèces végétales ou récemment isolées qui nodulent *A. tortilis* subsp. *raddiana* sont des rhizobia à croissance rapide, et parmi elles des souches appartenant à *Sinorhizobium* (*S. terangae* biovar *acaciae*, *S. sahari*), *Rhizobium* (*R. tropici*) et *Mesorhizobium* (*M. plurifarium*). L'analyse de 76 nouveaux isolats de nodules d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* de diverses origines a confirmé la diversité taxonomique des micro-symbiotes de *A. tortilis* subsp. *raddiana* dans la nature. Les groupes déterminés par analyse des souches SDS-PAGE sont généralement indépendants de l'origine géographique (nord ou sud du Sahara) de ces souches, des conditions écologiques ou édaphiques locales (sols salés ou non), ainsi que de leur profondeur d'origine. Nos résultats suggèrent que plusieurs groupes mis en évidence parmi les souches d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* pourraient constituer des espèces génomiques non encore décrites. Il est maintenant nécessaire de valider ces groupes par des techniques complémentaires, en particulier phylogénétiques (séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, hybridations ADN/ADN), afin de préciser leur position taxonomique exacte et de proposer d'éventuelles conclusions nomenclaturales.

Par opposition à l'étude taxonomique, l'étude symbiotique a montré une grande homogénéité des caractéristiques symbiotiques des souches isolées d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*. Toutes les souches étudiées présentent le même spectre d'hôte. Parallèlement leurs facteurs Nod, qui jouent un rôle déterminant dans la spécificité de nodulation, ont des structures similaires. Les facteurs Nod produits par les souches d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* sont très proches des molécules produites par *S. terangae* bv *acaciae* (LORQUIN *et al.*, 1997 a) et *Rhizobium tropici* (POUPOT *et al.*, 1993), qui présentent un spectre d'hôte analogue à celui des souches d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*.

Cette convergence de différentes espèces bactériennes vers la nodulation des mêmes plantes via les mêmes facteurs Nod a déjà été observée pour les symbiotes de *Sesbania* (LORQUIN *et al.*, 1997 b) et, dans une moindre mesure, pour ceux du soja (voir DÉNARIÉ *et al.*, 1996). Ces résultats confirment que l'analyse des facteurs Nod pourrait être utilisée pour la caractérisation symbiotique des rhizobia, comme alternative aux tests de nodulation réalisés en laboratoire, ainsi que l'ont proposé LORTET *et al.* (1996). Cela pose par ailleurs la question plus générale de savoir comment ces bactéries ont traversé l'évolution : leurs propriétés de nodulation résultent-elles d'un transfert latéral des mêmes gènes *nod* chez des bactéries différentes ? ou bien de différents processus génétiques parallèles (mutations, délétions, insertions, etc...) qui, alliés à la pression de sélection de la plante pour le(s) facteur(s) Nod efficace(s), ont abouti à la synthèse des facteurs Nod adéquats ? De façon similaire à ce qui a été fait sur des souches

isolées d'*Acacia senegal* et de *Prosopis chilensis* (HAUKKA *et al.*, 1998), l'étude de la séquence des gènes *nod* de ces rhizobia et de leur phylogénie pourrait permettre d'apporter des éléments de réponse à ces questions en mettant en évidence la similarité ou la divergence des gènes de nodulation des différents symbiontes d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*.

Remerciements

Ce travail a été en partie financé par le Bureau des Ressources Génétiques, le programme Microbiologie AIP Inra, et par la CEE (contrats TS3*CT92-0047, TS3-CT93-0232 et TS3*-CT93-0220).

Auteurs

P. de Lajudie, B. Dreyfus, C. Boivin
Laboratoire des symbioses tropicales
et méditerranéennes,
UMR 1063 IRD-CIRAD-INRA-ENSAM,
Campus de Baillarguet,
TA 10/J, 34398 Montpellier Cedex, France

**S. Bâ , A. N'Diaye, J. Lorquin, M. Neyra
C. Detrez**
Laboratoire de microbiologie des sols,
IRD BP 1386,
Dakar, Sénégal

A. Willems, M. Gillis
Laboratorium voor Microbiologie,
Universiteit Gent,
K.-L. Ledeganckstraat, 35,
B-9000 Gent, Belgium

H. Jeder
IRA Gabès, Tunisie

J.-C. Promé
Institut de pharmacologie
et de biologie structurale
CNRS, 205, route de Narbonne,
31077 Toulouse, France

Références bibliographiques

BÂ S.,
1996 – *L'analyse chromatographique
des facteurs Nod comme nouvel outil
de classification symbiotique des rhizobia ;
application à Sinorhizobium saheli,
Rhizobium sp. et Bradyrhizobium sp. isolés
d'acacias.* DEA, univ. Cheikh Anta Diop,
Dakar, 56 p.

**BÂ S., WILLEMS A., LAJUDIE P. DE,
ROCHE P., JEDER H., QUATRINI P., NEYRA M.,
FERRO M., PROMÉ J.-C., GILLIS M.,
BOVIN-MASSON J.-C., LORQUIN J.,**
2002 – Symbiotic and taxonomic diversity
of rhizobia isolated from *Acacia tortilis*
subsp. *raddiana* in Africa.
System. Appl. Microbiol., 25 : 130-145.

- BOIVIN C., LORTET G., LORQUIN J., BÂ S., MEAR N., FERRO M., DE LAJUDIE P., PROMÉ J.-C., DREYFUS B.,** 1998 – « Utilisation des facteurs Nod pour la caractérisation symbiotique des rhizobiums : application aux souches d'*Acacia* et de *Sesbania* du Sénégal ». In Campa C., Grignon C., Gueye M., Hamon S., éd. : *L'acacia au Sénégal*, Paris, IRD, coll. Colloques et séminaires : 377-386.
- BREMNER J. M.,** 1965 – « Total nitrogen ». In Black C.A., ed. : *Methods of soil analysis*, Wisconsin, American Society of Agronomy : 1149-1178.
- CHEN W. X., LI G.S., QI Y. L., WANG E. T., YUAN H. L., LI J. L.,** 1991 – *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41 : 275-280.
- DE LAJUDIE P., WILLEMS A., POT B., DEWETTINCK D., MAESTROJUAN G., NEYRA M., COLLINS M. D., DREYFUS B., KERSTERS K., GILLIS M.,** 1994 – Polyphasic Taxonomy of Rhizobia: Emendation of the Genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 : 715-733.
- DE LAJUDIE P., LAURENT-FULELE E., WILLEMS A., TORCK U., COOPMAN R.G., COLLINS M. D., KERSTERS K., DREYFUS B., GILLIS M.,** 1998 a – *Allorhizobium undicola* gen. nov. sp. nov. for nitrogen-fixing bacteria efficiently nodulating *Neptunia natans* in Senegal *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 : 1277-1290.
- DE LAJUDIE P., WILLEMS A., NICK G., MOREIRA F., MOLOUBA F., HOSTE B., TORCK U., NEYRA M., COLLINS M. D., LINDSTRÖM K., DREYFUS B., GILLIS M.,** 1998 b – Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48 : 369-382.
- DÉNARIÉ J., DEBELLÉ F., PROMÉ J.-C.,** 1996 – Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann Rev. Biochem.*, 65 : 503-535.
- DREYFUS B. L., DOMMERGUES Y.,** 1981 – Nodulation of *Acacia* species by fast- and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 97-99.
- DREYFUS B., GARCIA J. L., GILLIS M.,** 1988 – Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38 : 89-98.
- DUPUY N., WILLEMS A., POT B., DEWETTINCK D., VANDENBRUAENE I., MAESTROJUAN G., DREYFUS B. L., KERSTERS K., COLLINS M. D., GILLIS M.,** 1994 – Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 : 461-473.
- EARDLY B. D., MATERON L. A., SMITH N. H., JOHNSON D.A., RUMBAUGH M. D., SELANDER R. K.,** 1990 – Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 : 187-194.
- GIBSON A. H.,** 1963 – Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* L. plants. *Aust. J. Biol. Sci.*, 16 : 1179-1188.
- HARRIER L.A., WHITTY P.W., SUTHERLAND J. M., SPRENT J. I.,** 1995 – « A comparison of nodulating and non-nodulating African species of *Acacia* using morphological and molecular markers ». In Tikhonovitch I.A., Provorov N.A., Romanov V. I., Newton W. E., eds : *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Dordrecht/Boston/London, Kluwer Academic Publishers : 483.

**HAUKKA K., LINDSTRÖM K.,
YOUNG J. P. W.,**

1998 – Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 : 419-426.

**JARVIS B. D. W., GILLIS M.,
DE LEY J.,**

1986 – Intra- and intergeneric similarities between the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36 : 129-138.

**JARVIS B. D. W., VAN BERKUM P.,
CHEN W. X., NOUR S. M.,
FERNANDEZ M. P., CLEYET-MAREL J.-C.,
GILLIS M.,**

1997 – Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47 : 895-898.

JORDAN D. C.,

1982 – Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32 : 136-139.

**LEROUGE P., ROCHE P.,
FAUCHER C., MAILLET F.,
TRUCHET G., PROMÉ J.-C.,
DÉNARIÉ J.,**

1990 – Symbiotic host specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344 : 781-784.

**LORQUIN J., LORTET G.,
FERRO M., MEAR N., PROMÉ J. C.,
BOIVIN C.,**

1997 a – *Sinorhizobium teranga* bv. *acaciae* and *Rhizobium* sp. ORS1001, two taxonomically distantly related *Acacia*-nodulating strains, produce similar Nod factors that are O-carbamoylated, N-methylated and mainly sulfated. *J. Bacteriol.*, 179 : 3079-3083.

**LORQUIN J., LORTET G., FERRO M.,
MEAR N., DREYFUS B., PROMÉ J.-C.,
BOIVIN C.,**

1997 b. – Nod factors from *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* are both arabinosylated and fucosylated, a structural feature specific to *Sesbania rostrata* symbionts. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 10, 879-890.

**LORTET G., MEAR N., LORQUIN J.,
DREYFUS B., DE LAJUDIE P.,
ROSENBERG C., BOIVIN C.,**

1996 – Nod factor thin-layer chromatography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains: application to *Sinorhizobium saheli*, *S. teranga* and *Rhizobium* sp. strains isolated from *Acacia* and *Sesbania*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 9 : 736-747.

**MARTINEZ-ROMERO E., SEGOVIA L.,
MERCANTE F. M., FRANCO A. A.,
GRAHAM P., PARDO M. A.,**

1991 – *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41 : 417-426.

**MOREIRA F. M. S., GILLIS M., POT B.,
KERSTERS K., FRANCO A. A.,**

1993 – Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical *Leguminosae* by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *System. Appl. Microbiol.*, 16 : 135-146.

N'DIAYE A.,

1996 – *Diversité et fixation d'azote des rhizobiums d'Acacia*. DEA, univ. Cheikh Anta Diop, Dakar, 43 p.

**NICK G., JARVIS B. D. W.,
TIGHE S. W., NIEMI M., DE LAJUDIE P.,
LINDSTRÖM K.,**

1995 – « Taxonomy of rhizobia isolated from the root nodules of leguminous trees in the Sudan ». In Tikhonovitch I. A., Provorov N. A., Romanov V. I., Newton W. E., eds.: *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Dordrecht/Boston/London, Kluwer Academic Publishers : 715.

- NICK G., DE LAJUDIE P.,
EARDLY B. D., SUOMALAINEN S.,
PAULIN L., ZHANG X., GILLIS M.,
LINDSTRÖM K.,**
1999 – *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and
Sinorhizobium kostiense sp. nov., isolated
from leguminous trees in Sudan and Kenya.
Int. J. Syst. Bacteriol., 49 : 1359-1368.
- NOUR S. M.,
FERNANDEZ M. P., NORMAND P.,
CLEYET-MAREL J.-C.,**
1994 – *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting
of strains that nodulate chickpeas
(*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 :
511-522.
- NOUR S. M.,
CLEYET-MAREL J.-C.,
NORMAND P.,
FERNANDEZ M. P.,**
1995 – Genomic heterogeneity of strains
nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and
description of *Rhizobium mediterraneum*, sp.
nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45 : 640-648.
- POUPOT R.,
MARTINEZ-ROMERO E.,
PROMÉ J. C.,**
1993 – Nodulation factors from
Rhizobium tropici are sulfated or nonsulfated
chitopentasaccharides containing an
N-methyl-N-acylglucosaminyl terminus.
Biochemistry, 32 : 10430-10435.
- PRICE N. P. J., RELIC B.,
TALMONT F., LEWIN A., PROMÉ D.,
PUEPPKE S. G., MAILLET F.,
DÉNARIÉ J., PROMÉ J.-C.,
BROUGHTON W. J.,**
1992 – Broad-host-range *Rhizobium* species
strain NGR 234 secretes a family of
carbamoylated and fucosylated nodulation
signals that are O-acetylated or sulphated.
Mol. Microbiol., 6 : 3575-3584.
- RAINEY F. A., WIEGEL J.,**
1996 – 16S ribosomal DNA sequence
analysis confirms the close relationship
between the genera *Xanthobacter*,
Azorhizobium and *Aquabacter* and reveals
a lack of phylogenetic coherence
among *Xanthobacter* species.
Int. J. Syst. Bacteriol., 46 : 607-610.
- RINAUDO G., ORENGA S.,
FERNANDEZ M. P.,
MEUGNIER H.,
BARDIN R.,**
1991 – DNA homologies among
members of the genus *Azorhizobium*
and other stem- and root-nodulating
bacteria isolated from the tropical
legume *Sesbania rostrata*.
Int. J. Syst. Bacteriol., 41 : 114-120.
- SEGOVIA L.,
YOUNG J. P. W.,
MARTINEZ-ROMERO E.,**
1993 – Reclassification of American
Rhizobium leguminosarum biovar *phaseoli*
type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol., 43 : 374-377.
- SPAINK H. P.,**
1996 – Regulation of plant
morphogenesis by lipo-chitin
oligosaccharides.
Crit. Rev. Plant Sci., 15 : 559-582.
- TRINICK M. J.,**
1965 – *Medicago sativa* nodulation
with *Leucaena leucocephala*
root-nodule bacteria.
Aust. J. Sci., 27 : 263-264.
- TRINICK M. J.,**
1968 – Nodulation of tropical legumes.
I Specificity in the *Rhizobium* symbiosis
of *Leucaena leucocephala*.
Exp. Agric., 4 : 243-253.
- TRINICK M. J.,**
1980 – Relationships amongst
the fast-growing rhizobia of *Lablab*
purpureus, *Leucaena leucocephala*,
Mimosa spp., *Acacia farnesiana*
and *Sesbania grandiflora* and
their affinities with
other rhizobial groups.
J. Appl. Bacteriol., 49 : 39-53.
- TRÜPER H. G.,
DE CLARI L.,**
1997 – Taxonomic note: necessary
correction of specific epithets formed
as substantives (nouns) in « apposition ».
Int. J. Syst. Bacteriol., 47 : 908-909.

Un arbre au désert,
Acacia raddiana

**VANDAMME P., POT B.,
GILLIS M., DE VOS P., KERSTERS K.,
SWINGS J.,**
1996 – Polyphasic taxonomy, a consensus
approach to bacterial systematics.
Microbiol. Rev., 60 : 407-438.

WILLEMS A., COLLINS M. D.,
1993.– Phylogenetic analysis of *rhizobia*
and *agrobacteria* based on 16S ribosomal
DNA sequences.
Int. J. Syst. Bacteriol., 43 : 305-313.

**WILLIAMS J. G. K.,
KUBELIC A. R., LIVAK K. J.,
RAFALSKI J. A., TINGEY S. V.,**
1990 – DNA polymorphisms amplified
by arbitrary primers are useful
as genetic markers.
Nucleic Acids Res., 18 : 6531-6535.

**YOUNG J. P. W.,
HAUKKA K. E.,**
1996 – Diversity and phylogeny of *rhizobia*.
New Phytol., 133 : 87-94.