

ETUDE TAXONOMIQUE DES *RHIZOBIUM* SP. D'ACACIA ET DE *SESBANIA*

P. de LAJUDIE*, G. LORTET*, M. NEYRA*, S. BADJI*+,
I. NDOYE*+, C. BOIVIN*, M. GILLIS**, B. DREYFUS*

*Laboratoire de Microbiologie des Sols, ORSTOM, BP 1386, Dakar, Sénégal

**Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent K.L.,
Ledeganckstraat, 35, 9000-Gent, Belgique

+ Direction des Eaux et Forêts, BP 1831, Dakar, Sénégal

+ + Direction des Affaires Scientifiques et Techniques, BP 4025, Dakar, Sénégal

Résumé: La classification des bactéries capables d'induire des nodules sur les Légumineuses a subi de nombreux remaniements ces dernières années. Autrefois basée sur l'aptitude des isolats à infecter certaines plantes, cette classification est maintenant davantage fondée sur l'étude phylogénétique des souches: hybridations ADN/ADN, ADN/ARNr, séquençage d'ARNr, analyse des protéines... Ainsi, on a vu récemment la description de plusieurs nouveaux genres et espèces, et cette classification est en constante évolution. Les *Rhizobium* tropicaux, en particulier ceux isolés des Légumineuses arborées, sont encore mal définis. En collaboration avec l'Université de Gand, nous avons entrepris l'étude d'une centaine de souches de *Rhizobium* isolés d'*Acacia* sp. et de *Sesbania* sp.: analyse des protéines par PAGE-SDS, tests nutritionnels en galeries API, hybridations ADN/ARNr, spectre d'hôtes. Les résultats montrent une grande hétérogénéité parmi ces souches, qui se répartissent en trois groupes principaux: un groupe rassemble des isolats de *Sesbania* sp. et d'*Acacia* sp., un groupe contient des isolats de *Sesbania* sp., et un groupe est composé d'isolats d'*Acacia* sp. Le spectre d'hôte montre que la plupart des isolats des différents groupes est capable d'induire des nodules sur différentes espèces d'*Acacia* et de *Sesbania* et qu'il est impropre de désigner comme des "souches d'*Acacia*" et des "souches de *Sesbania*".

Abstract: The taxonomy of nodule-inducing bacteria of leguminous plants has changed considerably over the last few years. It was first based on plant infection and is now based on DNA/DNA and DNA/rRNA hybridization, rRNA sequencing, protein analysis, etc. Several new genera and species have been proposed recently. Tropical rhizobia are poorly documented, especially those isolated from leguminous trees. In collaboration with the University of Gent, we began a study of close to 100 strains of *Rhizobium* sp. isolated from *Acacia* sp. and *Sesbania* sp., looking at SDS-PAGE protein patterns, API nutritional tests, DNA/DNA and DNA/rRNA hybridizations and host specificity. These strains appeared to be very heterogeneous, and belong to three main groups composed of *Sesbania* and *Acacia* isolates (group 1), *Sesbania* isolates (group 2), and *Acacia* isolates (group 3). Most isolates are capable of nodulating both *Acacia* and *Sesbania* species, thus indicating that they cannot be defined as "*Acacia* strains" or "*Sesbania* strains".

CLASSIFICATION DES RHIZOBIUMS

La classification bactérienne a évolué depuis la formation de groupements subjectifs vers des arrangements généraux plus objectifs généralement basés sur des ressemblances phénotypiques. Celles-ci se sont avérées être trop variables et ne représentent qu'une partie mineure du génôme. Ce sont enfin les classifications basées sur plusieurs aspects de la cellule bactérienne, incluant des parentées génétiques qui sont maintenant adoptées. En particulier, la classification des bactéries capables d'induire la nodulation des racines ou des tiges des

Légumineuses a subi de nombreux remaniements ces dernières années. Autrefois établie sur la base des spectres d'hôtes des bactéries, c'est-à-dire de leur aptitude à noduler certains genres ou groupes de genres de Légumineuses, cette classification peu satisfaisante a été abandonnée au début des années 1980.

De nouvelles approches moléculaires (hybridations ADN/ADN, analyse des protéines, hybridations 16S rARN/ADN total, séquençage de l'ARNr 16S...) ont alors été utilisées pour définir la position taxonomique des rhizobiums et leurs relations phylogénétiques. Ainsi de nouveaux genres et espèces de rhizobiums ont été décrits récemment et actuellement les rhizobiums sont classés en quatre genres (voir Figure 1): *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (Jordan 1982, 1984), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.* 1988) et *Sinorhizobium* (Chen *et al.* 1988). Cependant cette classification reste imparfaite: le groupe des *Bradyrhizobium* est assez homogène quoique on y distingue plusieurs sous-groupes; il est assez proche de *Rhodopseudomonas* et *Azorhizobium* en est apparenté. *Rhizobium* est plus hétérogène, *R. meliloti* et *R. leguminosarum* sont proches d'*Agri. tumefaciens* biovar 2, tandis que *R. loti* est plus proche d'*Agri. tumefaciens* biovar 1 B. Par ailleurs, des sous-groupes, qui n'ont pas encore reçu de nom, ont été identifiés chez *R. meliloti* (Eardly *et al.* 1990), *Azorhizobium* (Rinaudo *et al.* 1991), et parmi les rhizobiums de Légumineuses arborées (Jarvis 1983, Zhang *et al.* 1991). Enfin, cette classification est en constante évolution du fait de nouveaux isollements: seulement 15% des 19700 espèces de Légumineuses ont fait l'objet d'isollements bactériens à ce jour.

Un comité international s'est réuni et a publié récemment des recommandations sur les critères standards minimaux requis pour modifier la taxonomie des rhizobiums, et qui comprennent à la fois des données phylogéniques et phénotypiques (Graham *et al.* 1991, voir Figure 2). Il devenait en effet nécessaire que la taxonomie des rhizobiums réponde aux mêmes critères que ceux retenus pour la taxonomie du monde bactérien (caractéristiques morphologiques et culturelles, homologies ADN/ADN et ADN/ARNr, %G+C, profils électrophorétiques de protéines...), tout en conservant ses critères distinctifs particuliers (performances symbiotiques, sérologie, sensibilité aux phages...) qui sont secondaires pour la taxonomie mais essentielles pour les études pratiques et l'utilisation des souches.

Etude taxonomique des Rhizobium sp. nodulant les Sesbania et les Acacia au Sénégal

Les rhizobiums des Légumineuses arborées sont encore mal connus. Certaines souches sont très spécifiques, tandis que d'autres présentent un spectre d'hôte très large (Trinick 1980, Dreyfus et Dommergues 1981, Dommergues *et al.* 1984, Herrera *et al.* 1985). Beaucoup d'entre elles sont capables d'induire des nodules efficaces sur des Légumineuses herbacées (Trinick 1965, Herrera *et al.* 1985, Martinez-Romero *et al.* 1991). Certaines études portant sur un nombre restreint de souches suggèrent que les bactéries à croissance rapide isolées d'arbres sont proches de *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum* (Trinick 1980, Dommergues *et al.* 1984, Lindström et Lehtomäki 1988).

Par analyse numérique basée sur 115 caractères phénotypiques, Zhang *et al.* (1991) ont montré qu'une centaine de souches isolées d'*Acacia senegal*, de *Prosopis chilensis* au Soudan

ou d'autres Légumineuses d'autres régions, présentent une grande diversité et forment 19 groupes séparés. Cependant leur position taxonomique exacte reste à déterminer.

Au laboratoire de microbiologie des sols de l'ORSTOM à Dakar, en association avec le laboratoire de microbiologie de l'Université de Gand, nous étudions les souches à croissance rapide isolées de différentes espèces d'*Acacia* et de *Sesbania* principalement au Sénégal. Rappelons que les acacias sont nodulés soit par *Bradyrhizobium* (*A. albida*), soit par *Rhizobium* (*A. senegal*, *A. raddiana*) ou indifféremment par l'un ou l'autre (*A. seyal*) (Dreyfus and Dommergues 1981); les *Sesbania* spp. sont nodulés par *Rhizobium* ou *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.* 1988).

Figure 1. Classification actuelle des rhizobiums

Genre	Espèce	Biovar	Plantes nodulées
<i>Bradyrhizobium</i>			
	<i>E. japonicum</i>		<i>Glycine soja</i> , <i>Glycine max</i>
<i>Rhizobium</i>			
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>viciae</i>	<i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i>
		<i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
		<i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
	<i>R. meliloti</i>		<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>
	<i>R. loti</i>		<i>Lotus</i>
	<i>R. galegae</i>		<i>Galega</i>
	<i>R. tropici</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i> L. Beans, <i>Leucaena</i> sp.
	<i>R. huakuii</i>		<i>Astragalus sinicus</i>
<i>Azorhizobium</i>			
	<i>A. caulinodans</i>		<i>Sesbania</i>
<i>Sinorhizobium</i>			
	<i>S. fredii</i>		<i>Glycine soja</i> , <i>Glycine max</i>
	<i>S. xinjiangensis</i>		<i>Glycine soja</i> , <i>Glycine max</i>

Les résultats de l'analyse numérique par ordinateur fondée sur l'étude du profil électrophorétique des protéines cellulaires totales en PAGE-SDS, des hybridations ADN/ADN et ARN/ADN montrent que ces souches (plus d'une centaine) appartiennent toutes au genre *Rhizobium*, présentent une grande hétérogénéité, et forment quatre groupes principaux, distincts des autres *Rhizobium* décrits (voir Figure 3): le groupe I, proche de *R. meliloti*, comprenant des isolats d'*Acacia* spp. et de *Sesbania* spp.; le groupe II, proche de *R. meliloti*,

ne comprenant que des isolats de *Sesbania* spp.; le groupe III, proche de *R. loti*, ne comprenant que des isolats d'*Acacia* spp. et un groupe atypique.

Figure 2. Etudes utiles pour la définition de nouveaux genres et espèces de rhizobiums (selon Graham et al. 1991)

- caractéristiques morphologiques et culturelles (taux de croissance, type de colonies sur YM, utilisation de différentes sources de Carbone...),
- G+C % *Rhizobium* 59-64 mol %
Azorhizobium 66-68 %
Bradyrhizobium 61-65 %,
- homologies ADN/ADN (> 70%, avec $\Delta T_m < 5^\circ\text{C}$ à l'intérieur d'une espèce),
- hybridations 16S rARN ADN total,
- profils électrophorétiques des protéines solubles totales en SDS-PAGE,
- mobilité électrophorétique des enzymes du métabolisme,
- séquence du 16S rARN,
- RFLP de l'ADN total (hybridations avec sondes spécifiques nif, nod, ISRm1, ...) ou de sections amplifiées par PCR.
- lipopolysaccharides cellulaires,
- performances symbiotiques avec les hôtes végétaux,
- groupe sérologique
- sensibilité aux bactériophages,
- et toute autre caractéristique utile.

N.B. La définition de nouvelles espèces nécessite la convergence du maximum de ces informations dont certaines sont indispensables (notamment les pourcentages d'homologie ADN/ADN).

Les résultats auxanographiques (API 50CH, API 50AO et API 50AA) sont en accord avec ces groupements. Par ailleurs, le contenu plasmidique des souches semble corrélé avec le groupe auquel elles appartiennent. Enfin, nous avons étudié les caractéristiques symbiotiques des souches de ces différents groupes taxonomiques en mesurant leur pouvoir de nodulation et leur potentiel fixateur d'azote sur différentes espèces de *Sesbania* et d'*Acacia*.

La figure 4 montre que le spectre d'hôte de ces souches est très varié, et fait apparaître que la plupart des isolats des différents groupes sont capables d'induire des nodules (plus ou moins efficaces) à la fois sur *Acacia* et sur *Sesbania*, suggérant qu'il est impropre de distinguer des "rhizobium d'*Acacia*" et des "rhizobium de *Sesbania*". A l'intérieur d'un groupe, il n'est pas possible de dégager clairement une logique de nodulation des souches qui le composent. Il en est de même des souches des différents groupes. Ainsi les spectres d'hôtes établis à partir des différentes espèces de *Sesbania* et d'*Acacia* ne sont pas caractéristiques des groupes taxonomiques précédemment définis. Ceci étaye le fait, déjà signalé plus haut, que les propriétés symbiotiques des rhizobiums ne reflètent pas leur proximité taxonomique.

Figure 3. Dendrogramme des souches isolées d'Acacia et de *Sesbania* au Sénégal (obtenu par analyse numérique des profils de protéines en SDS-PAGE).



Figure 4. Spectre d'hôte de quelques représentants des quatre groupes de *Rhizobium* isolés de *Sesbania* et d'*Acacia* sur différentes espèces d'*Acacia* et de *Sesbania*

	GROUPE I					GROUPE II					GROUPE III			GROUPE ATYPIQUE	
Souches	1009	1007	25	929	606	51	22	609	611	Pj12	1004	1010	1014	507	20MB
Plantes-hôtes d'origine	<i>Acacia laeta</i>			<i>Acacia</i> sp.	<i>Sesbania cannabina</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	<i>Sesbania cannabina</i>	<i>Sesbania grandiflora</i>	<i>Prosopis juliflora</i>	<i>Acacia senegal</i>	<i>Acacia senegal</i>	<i>Acacia senegal</i>	<i>Sesbania pachycarpa</i>	<i>Acacia senegal</i>	
Plantes-hôtes testées															
<i>A. seyal</i>	e	E	E	e	e	e	O	I	e	I	I	E	e	I	I
<i>A. raddiana</i>	I	e	e	O	I	I	O	O	O	e	I	I	I	O	I
<i>A. senegal</i>	e	e	E	O	O	O	O	O	O	e	e	e	e	O	I
<i>A. albida</i>	I	O	I	O	O	I	O	O	O	I	I	I	I	O	I
<i>S. rostrata</i>	I	I	O	E	e	E	E	E	e	e	O	O	O	I	O
<i>S. grandiflora</i>	I	I	O	O	e	E	I	e	E	I	O	O	O	I	O
<i>S. pubescens</i>	O	I	e	E	E	E	I	e	E	O	O	I	I	I	O

O: pas de nodulation; I: nodulation ineffective; e: nodulation peu effective; E: nodulation effective

PERSPECTIVES

Nous allons poursuivre l'étude de ces groupes de souches en choisissant plusieurs voies d'approche: caractères phénotypiques (tests nutritionnels en galeries API 150, étude des flagelles, température maximale de croissance...), spectre d'hôte sur d'autres genres végétaux, analyse en RFLP de fragments PCR de la zone intergénique entre les ARNr 16S et 23S (en collaboration avec l'Université de Lyon I), séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S, localisation des gènes symbiotiques sur des plasmides ou sur le chromosome, étude des signaux bactériens ayant un rôle dans la nodulation (en collaboration avec le centre INRA de Castanet-Tolosan), construction de sondes spécifiques pouvant servir de marqueurs de ces groupes, moyen indispensable pour les études sur le terrain...

Ainsi, nous désirons accumuler le maximum d'informations sur le partenaire bactérien, sa compétitivité dans le sol en fonction de différentes conditions écologiques, dans la perspective d'améliorer la fixation d'azote, augmenter la croissance des plantes, contribuer à l'amélioration de la fertilité des sols sahéliens et à la réhabilitation des terres dégradées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chen W.X., Yan G.H. and Li J.L. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium gen. nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 392-397.
- Chen W.X., Li G.S., Qi Y.L., Wang E.T., Yuan H.L. and Li J.L. (1991). *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (2): 275-280.
- Dommergues Y.R., Diem H.G., Gauthier D.L., Dreyfus B.L. and Cornet F. (1984). Nitrogen-fixing trees in the tropics: potentialities and limitations. In: *Advances in nitrogen fixation research*. C. Veeger and W.E. Newton, Ed. Proceedings of the 5th International Symposium on Nitrogen Fixation. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Wageningen, The Netherlands. pp. 7-8.
- Dreyfus B.L. and Dommergues Y.R. (1981). Nodulation of *Acacia* species by fast- and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 41(1): 97-99.
- Dreyfus B.L., Garcia J.L. and 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.* 27: 222-240.
- Eardly B.D., Materon L.A., Smith N.H., Johnson D.A., Rumbaugh M.D. and Selander R.K. (1990). Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 187-194.
- Graham P.H., Sadowsky M.J., Keyser H.H., Barnett Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., de Ley D.J., Jarvis B.D.W., Roslycky E.B., Strijdom B.W. and Young J.P.W. (1991). Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (4): 582-587.
- Herrera A.M., Bedmar E.J. and Olivares J. (1985). Host specificity of *Rhizobium* strains isolated from nitrogen-fixing trees and nitrogenase activities of strain GRH2 in symbiosis with *Prosopis chilensis*. *Plant Sci.* 42: 177-182.
- Jarvis B.D.W. (1983). Genetic diversity of *Rhizobium* strains which nodulate *Leucaena leucocephala*. *Current Microbiology* 8: 153-158.
- 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.
- Jordan D.C. (1984). Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.1. N.R. Kreig and J.G. Holt, Ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp. 234-254.

- Lindström K. et Lehtomäki S. (1988). Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (Galega) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 50: 277-287.
- Martinez-Romero E., Segovia L., Mercante F.M., Franco A.A., Graham P. and Pardo M.A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41(3): 417-426.
- Rinaudo G., Orenge S., Fernandez M.P., Meugnier H. and 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(1): 114-120.
- Trinick M.J. (1965). *Medicago sativa* nodulation with *Leucaena leucocephala* root-nodule bacteria. *Aust. J. Sci.* 27: 263-264.
- 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 rhizobia groups. *J. Appl. Bacteriol.* 49: 39-53.
- Zhang X., Harper R., Karsisto M., Lindström K. (1991). Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of Leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (1): 104-113.

**INTERACTIONS PLANTES
MICROORGANISMES**

**SENEGAL
FEBRUARY 1992**

ifs

Fondation Internationale pour la Science

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

INTERACTIONS BETWEEN PLANTS AND MICROORGANISMS

**Compte rendu du séminaire régional organisé par
la Fondation Internationale pour la Science (IFS)
et l'Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)**

**Dakar, Sénégal
17-22 février 1992**

Organisateurs:

Fondation Internationale pour la Science (IFS)
Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)

Co-financé par:

Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)
Islamic Educational, Scientific and Cultural Organization (ISESCO)
Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA)

Publié par:

Fondation Internationale pour la Science (IFS)
Grev Turegatan 19, 114 38 Stockholm, Sweden

Rédaction:

Judith N. Wolf

Les communications qui figurent dans cette publication ont été reproduites telles que soumises et n'ont pas été revues par des pairs, ni révisées du point de vue scientifique par la Fondation Internationale pour la Science (IFS). Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs et pas la Fondation Internationale pour la Science (IFS).

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les "copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective" et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, "toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droits ou ayants cause, est illicite" (alinéa 1er de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal.

ISBN: 91 85798 31 2