

## Caractérisation phénotypique et génotypique des rhizobia associés aux *Crotalaria* spp. du Sénégal

Ramatoulaye Thiaba Samba\*, Phillipe de Lajudie\*\*,  
Monique Gillis\*\*\*, Marc Neyra\*, Marie-Madeleine Spencer Barreto\*\*\*\*,  
Bernard Dreyfus\*\*

Les *Crotalaria* spp. sont des légumineuses tropicales annuelles, de la famille des Papilionacées, caractérisées par leurs gousses ballonnées. Ces espèces sont rencontrées au Sénégal, couramment sur les sols en jachère, souvent avec d'autres légumineuses des genres *Indigofera*, *Tephrosia* et *Alysicarpus*. Dans de nombreux pays, les crotalaires sont largement utilisées dans l'agriculture et dans l'alimentation humaine ou animale. Au Sénégal, leur utilisation est peu développée. Pourtant, ces espèces sont très prometteuses pour la restitution de la fertilité des sols. Cette potentialité des crotalaires pourrait être exploitée pour une restauration rapide des sols en jachère, notamment par l'inoculation avec des rhizobiums sélectionnés. Pour cela, la caractérisation des rhizobiums naturellement associés aux crotalaires est nécessaire.

L'objectif de ce travail est donc de constituer une collection de rhizobiums de crotalaires du Sénégal et de le caractériser par une approche polyphasique.

### Matériels et méthodes

#### Isolement des souches

Les souches ont été isolées de nodules frais récoltés *in natura* dans différents sites géographiques du nord au sud du Sénégal. Les nodules frais ont été stérilisés en surface avec du chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) à 0,1 p. cent suivi de plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile, puis ont été écrasés dans une goutte d'eau stérile. Une anse de platine du broyat a été étalée en stries serrées sur une boîte contenant du milieu *yeast mannitol agar* (YMA) [Vincent, 1970] qui a été ensuite incubée à trente degrés Celsius. Après plusieurs repiquages successifs, les isolats ont été testés à nouveau pour leur aptitude à noduler la plante d'origine. Les

\* Laboratoire de microbiologie des sols, Institut de recherche pour le développement (I.R.D., ex-Orstom). Bel-Air, B.P. 1386, Dakar (Sénégal).

\*\* Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes, détaché au Laboratoire de microbiologie de Gand (Belgique), Cirad-Forêt-Institut de recherche pour le développement (I.R.D., ex-Orstom) - Ensam-Institut national de recherche agronomique (Inra), Montpellier (France).

\*\*\* Laboratoire de microbiologie, université de Gand, 35 K.L. Ledeganckstraat, 9000 Gand (Belgique).

\*\*\*\* Département de biologie végétale, Université Cheikh-Anta-Diop (Ucad). Dakar (Sénégal).

souches qui sont effectives ont été ensuite mises en collection à moins quatre-vingts degrés Celsius dans du glycérol à soixante pour cent.

### Mesure de la croissance bactérienne

La mesure de la croissance des souches de *Crotalaria* a été faite sur cinq souches prises au hasard parmi les isolats. Les bactéries ont été cultivées sur milieu *yeast mannitol* (YM) liquide. Un millilitre de cette culture a servi àensemencer cinquante millilitres de *yeast mannitol* en culture continue. À intervalle régulier de deux heures, une aliquote a été prélevée et l'absorbance à six cents nanomètres a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS Beckman DU 40.

### Test d'infectivité et d'effectivité

La capacité des isolats à fixer l'azote en symbiose (effectivité) a été estimée par l'activité réductrice de l'acétylène (ARA) en éthylène (Hardy *et al.*, 1973) qui est une méthode indirecte de mesure de l'activité de la nitrogénase.

Les racines portant des nodules ont été mises dans des tubes à essais (18 cm) fermés hermétiquement. Après injection de dix pour cent (v/v) d'acétylène, les tubes ont été incubés à température ambiante. Des échantillons gazeux de 0,5 millilitre ont été prélevés après trente minutes et un heure et injectés dans un chromatographe en phase gazeuse (Varian Aerograph série 1400 sur colonne en acier inoxydable de 120 cm × 0,2 mm remplie de sphérosil XOB 075). La quantité d'éthylène produite a été estimée par la conversion des hauteurs de pics enregistrés par référence à un étalon standard constitué d'éthylène. L'activité réductrice de l'acétylène est exprimée en nanomoles d'éthylène (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) produit par heure et par plante.

### Électrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines bactériennes totales (SDS-page)

Les rhizobiums ont été cultivés sur un milieu *tryptone yeast extract* (TY) tamponné contenant par litre : cinq grammes de tryptone (Oxoid); 0,454 gramme de phosphate de potassium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); 2,388 grammes de phosphate de sodium (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O); un gramme de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) et vingt grammes d'agar (Lab M). Le protocole d'extraction et d'électrophorèse est fondé sur des techniques décrites par Laemmler (1970), Jackman (1985) et modifiées par Kiredjan *et al.* (1986). L'analyse numérique a été faite à l'aide du programme Gelcompar (Vauterin & Vauterin, 1992) qui permet de présenter les résultats sous forme de dendrogramme. La similarité des bandes a été calculée grâce au coefficient de corrélation de Pearson (r) converti en pourcentage.

L'étude taxonomique par SDS-page des rhizobiums isolés des *Crotalaria* spp. a été faite sur cent dix-sept souches isolées de dix espèces de *Crotalaria* provenant de différents sites au Sénégal. Ces profils ont été comparés avec ceux de quarante-cinq souches de référence choisies parmi les espèces de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Agrobacterium* de la banque de données du Laboratoire de microbiologie de Gand (Belgique). Des souches représentatives des groupes décrits par Moreira *et al.* (1993) et Dupuy *et al.* (1994) ont été incluses.

### Amplification et analyse du polymorphisme des fragments de restriction de l'IGS (PCR/RFLP)

La région étudiée est l'espace intergénique (IGS) situé entre les gènes codant pour les ARN 16S et 23S de l'opéron ribosomal. Les amorces utilisées pour la réaction d'amplifica-

tion sont des séquences nucléotidiques de régions conservées de l'ARNr 16S (FGPS1490-72) et 23S (FGPL132'-38) situées de part et d'autre de l'espace intergénique (Normand *et al.*, 1992). L'ADN a été extrait selon la méthode décrite par Boucher *et al.* (1987). L'amplification a été effectuée selon le protocole de Laguerre *et al.* (1994) avec quelques modifications. Le mélange réactionnel contient 0,5 microgramme d'ADN génomique; du tampon (10 mM Tris pH 8; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl; 0,01 p. cent gélatine) 20 micromoles de désoxyadenosine triphosphate, 20 micromoles de désoxythymidine triphosphate, 20 micromoles de désoxyguanosine triphosphate, 20 micromoles de désoxycytidine triphosphate, 0,1 micromole pour chaque amorce et une unité de Taq polymérase (Appligène). L'amplification se fait avec un amplificateur type GeneAmp PCR System (Perkin Elmer) (35 cycles d'amplification; un cycle = dénaturation 5 min à 94 °C, hybridation 30 s à 904 °C, 30 s à 55 °C, 30 s à 72 °C, élongation 7 min 72 °C). Les produits d'amplification ont été digérés avec six enzymes : Cfo I (Hha I), Dde I, Msp I, Rsa I, Alu I, Hinf I selon les recommandations des producteurs (Pharmacia, Boehringer, Amherstham). Les produits de digestion ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose Nusieve à 2,5 p. cent (40 à 50 volts dans du tampon Tris-borate). Un marqueur de poids moléculaire déposé sur les extrémités a permis de mesurer la distance des bandes. Après coloration dans une solution de bromure d'éthidium à un milligramme par millilitre pendant trente minutes, les gels ont été photographiés (Polaroid 667 sans négatif) sur un transilluminateur ultra-violet à 302 nm. L'analyse des profils de restriction a été faite avec le programme Gelcompar. Les fragments de restriction de taille inférieure ou égale à 100 pb n'ont pas été considérés dans l'analyse car mal révélés. Les résultats sont présentés sous forme de dendrogramme.

### Extraction et visualisation des facteurs de nodulation

Les facteurs Nod ont été extraits selon la méthode de Spaink *et al.*, (1992). Les bactéries ont été cultivées dans un milieu minimum Vincent Succinate-Glutamate (Vincent, 1970) contenant par litre : deux grammes de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; deux grammes de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; deux grammes de succinate de sodium; un gramme de glutamate de sodium, additionné de un millilitre de biotine (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>); un millilitre de cocktail de vitamines (50 mg panthothénate Ca; 5 g myoinositol; 50 mg acide nicotinique; 50 mg pyridoxine; 50 mg thiamine; 50 ml H<sub>2</sub>O); dix millilitre de VA (MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O, 25 g.l<sup>-1</sup>); dix millilitre de VB (FeCl<sub>3</sub>, 0,16 ml/100 ml; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O, 6,71 g.l<sup>-1</sup>). 2 µM de génistéine (Extrasynthèse, France) ont été ajouté comme inducteur et cent µl d'acétate radioactif (1-<sup>14</sup>C acétate sodium, 56mCi/µmole, 10 µCi, Amersham) comme précurseur de la synthèse des facteurs Nod.

La visualisation des profils de facteurs Nod a été faite par chromatographie sur couche mince (CCM) avec des plaques de silice C18. Les composés ont été élués par un solvant acétonitrile-eau (v/v). Après une heure de migration, les plaques ont été séchées par un souffle d'air chaud et exposées à l'obscurité dans une cassette en présence de films Kodak X-OMAT K. Après une semaine, les plaques ont été révélées avec un révélateur Kodak XL 24 et un fixateur Kodak AL 4.

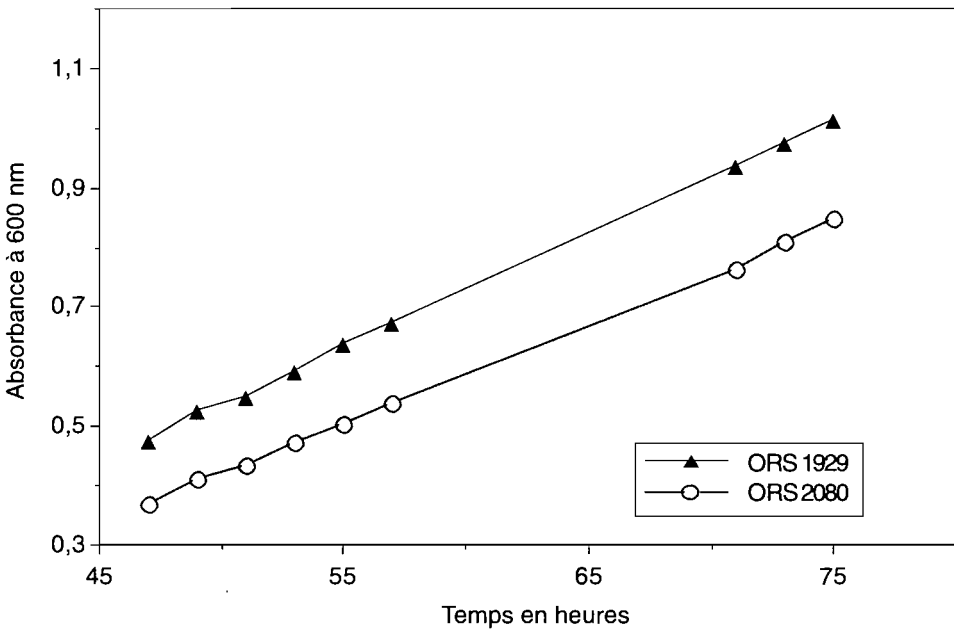
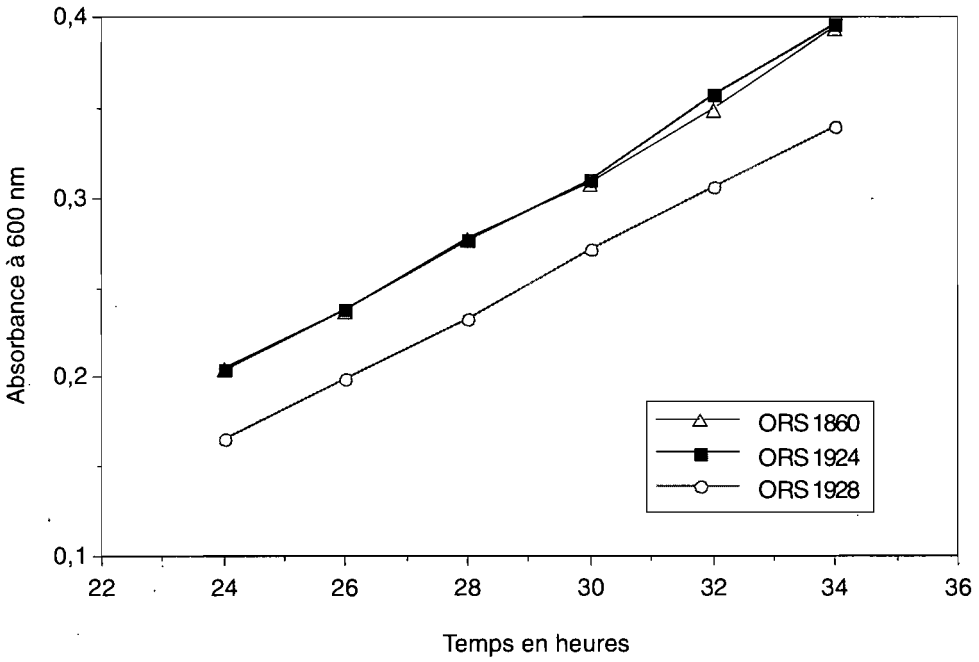
### Résultats

Une collection de cent vingt-huit souches de rhizobiums (Tableau I) a été constituée à partir des nodules de racines de neuf espèces de *Crotalaria*, récoltés en huit sites géographiques au Sénégal.

Selon Jordan (1984), si le temps de génération est supérieur à six heures, les rhizobiums sont à croissance lente; si le temps de génération est inférieur à six heures, les rhizobiums sont à croissance rapide. Ainsi tous les isolats de *Crotalaria* sont à croissance lente. Cepen-

**Tableau I.** Liste des souches isolées de *Crotalaria*.

Souches	Croissance sur YMA	Plante d'isolement	Origine géographique
ORS 1860, ORS 1917, ORS 1933, ORS 1937, ORS 1938, ORS 1954, ORS 1955, ORS 1970, ORS 1991, ORS 1992, ORS 2057, ORS 2058, ORS 2059, ORS 2060, ORS 2061, ORS 2062, ORS 2063, ORS 2064, ORS 2065, ORS 2066, ORS 2067, ORS 2068, ORS 2069, ORS 2070, ORS 2071, ORS 2073, ORS 2102, ORS 2103	lente	<i>Crotalaria podocarpa</i>	Bel Air
ORS 1923, ORS 1924, ORS 1925	lente	<i>Crotalaria perrottetii</i>	Ferlo sud
ORS 1926, ORS 1939	lente	<i>Crotalaria perrottetii</i>	Kolda 1
ORS 1927, ORS 1928, ORS 2029, ORS 2030, ORS 2032, ORS 2038, ORS 2039, ORS 2040, ORS 2041, ORS 2042, ORS 2043, ORS 2044, ORS 2098, ORS 2099, 2110	lente	<i>Crotalaria perrottetii</i>	Kaparan
ORS 2031, ORS 2033, ORS 2035, ORS 2036, ORS 2037, ORS 2092, ORS 2093, ORS 2094, ORS 2095, ORS 2096, ORS 2097	lente	<i>Crotalaria perrottetii</i>	Djilor
ORS 1936	lente	<i>Crotalaria glaucoïdes</i>	Bel Air
ORS 2023, ORS 2024, ORS 2076	lente	<i>Crotalaria glaucoïdes</i>	Kaparan
ORS 2025, ORS 2026, ORS 2027, ORS 2028, ORS 2045, ORS 2046, ORS 2047, ORS 2048, ORS 2049, ORS 2050, ORS 2051, ORS 2052, ORS 2053, ORS 2054, ORS 2055, ORS 2056, ORS 2072, ORS 2100, ORS 2101	lente	<i>Crotalaria glaucoïdes</i>	Djilor
ORS 1801, ORS 1862, ORS 2034, ORS 2074, ORS 2075, ORS 2089, ORS 2090, ORS 2091	très lente	<i>Crotalaria goreensis</i>	Kaparan
ORS 1811	très lente	<i>Crotalaria goreensis</i>	Kabrousse
ORS 2088	très lente	<i>Crotalaria goreensis</i>	Djilor
ORS 1935	très lente	<i>Crotalaria goreensis</i>	Kolda
ORS 1810	très lente	<i>Crotalaria lathyroides</i>	Kabrousse
ORS 1869, ORS 2108	très lente	<i>Crotalaria lathyroides</i>	Kaparan
ORS 1813	très lente	<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	Kabrousse
ORS 1814, ORS 1815, ORS 1816	très lente	<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	Fanghote
ORS 1863, ORS 1864, ORS 1865, ORS 1866, ORS 1867, ORS 1868, ORS 1929, ORS 2104, ORS 2105, ORS 2106, ORS 2107, ORS 2109	très lente	<i>Crotalaria comosa</i>	Kaparan
ORS 1819	très lente	<i>Crotalaria retusa</i>	Kabrousse
ORS 1969, ORS 1971	très lente	<i>Crotalaria retusa</i>	Kolda
ORS 2021, ORS 2022, ORS 2077, ORS 2078, ORS 2079, ORS 2080, ORS 2081, ORS 2082, ORS 2083, ORS 2084, ORS 2085, ORS 2086, ORS 2087	très lente	<i>Crotalaria retusa</i>	Grand-Yoff (Dakar)



**Figure 1.** Représentation graphique de la croissance des rhizobiums de *Crotalaria* spp. ; 1-a. - Courbe de croissance des rhizobiums à croissance lente (ORS 1860, ORS 1924, ORS 1928); 1-b. - Courbe de croissance des rhizobiums à croissance très lente.

dant, deux groupes apparaissent selon leur vitesse de croissance (Figure 1) : les isolats avec un temps de génération de neuf à dix heures sont dits souches à croissance lente et les isolats avec un temps de génération de plus de vingt-quatre heures sont dits à croissance très lente. Les souches à croissance lente sont des isolats de *C. glaucoïdes*, *C. perrottetii* et *C. podocarpa* tandis que les souches à croissance très lente sont de *C. comosa*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca* et *C. retusa*.

L'étude du spectre d'hôte a montré que les isolats et leurs hôtes peuvent se subdiviser en deux groupes de spécificité d'hôte différents (Tableau II).

Le groupe I comprend *C. glaucoïdes*, *C. perrottetii* et *C. podocarpa* qui ne sont nodulées effectivement que par les souches à croissance lente.

Le groupe II comprend *C. comosa*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca* et *C. retusa* qui sont nodulées effectivement par les souches à croissance très lente. *Acacia albida* et *Indigofera microcarpa* appartiennent à ce groupe de nodulation.

Les rhizobies de *Crotalaria* sont très spécifiques : les souches à croissance lente ne nodulent effectivement que leurs plantes d'isolement (les *Crotalaria* sp. du groupe I). Les souches à croissance très lente ne nodulent que les *Crotalaria* du groupe II dont elles ont été isolées. En revanche, elles nodulent d'autres légumineuses tropicales telles que *Acacia albida* (arbre) et *Indigofera microcarpa* (herbacée). Aucune nodulation effective n'est observée chez *Sesbania rostrata* et *Acacia raddiana* qui sont généralement nodulées par les rhizobies à croissance rapide des genres *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Sinorhizobium*.

L'analyse des protéines totales par SDS-PAGE montre (Figure 2) que ces rhizobies sont répartis dans cinq groupes électrophorétiques à un niveau de similarité de quatre-vingt-dix pour cent. Les groupes SDS1 et SDS2 sont constitués de souches à croissance très lente et de la souche type de *B. japonicum* (LMG 6138). Les groupes SDS3, SDS4, SDS5, constitués uniquement de souches à croissance lente, ne contiennent aucune souche de référence. Les deux types de souches sont très éloignés.

L'analyse chromatographique des facteurs Nod obtenus après induction des rhizobies de *Crotalaria* avec la génistéine montre que les souches à croissance très lente présentent le même profil qu'une souche de *Bradyrhizobium japonicum* tandis que les souches à croissance lente présentent des profils différents (Figure 3).

L'étude du polymorphisme des fragments de restriction d'ADN des rhizobies de *Crotalaria* spp. a été faite sur vingt et un souches de *Crotalaria* comparées avec trente-six souches de référence appartenant aux genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Agrobacterium*.

L'analyse électrophorétique des produits d'amplification de l'IGS montre (Figure 4) que toutes les souches étudiées produisent une seule bande dont la taille est variable selon qu'elles soient à croissance très lente (environ 900 pb) ou à croissance lente (environ 800 pb).

Le dendrogramme (Figure 5) obtenu après l'analyse numérique des profils de restriction montre que parmi les souches de *Crotalaria* analysées, on distingue quatre groupes génétiques à un coefficient de similarité de soixante-neuf pour cent, valeur à laquelle les souches de référence se distinguent. Les groupes IGS1, IGS2 et IGS3 sont composés uniquement de souches à croissance très lente contenant des souches déjà décrites par De Lajudie *et al.* (1995) comme appartenant à *Bradyrhizobium japonicum*. Le groupe IGS4 est constitué uniquement de souches à croissance lente. Les souches ORS1935, ORS1819, ORS1816, ORS1815, ORS1954, ORS1992, ORS1923 occupent des positions séparées. Les souches de *Crotalaria* occupent une position très éloignée par rapport aux souches de référence et se séparent avec elles au niveau générique.

**Tableau II.** Spécificité d'hôtes des rhizobias de *Crotalaria* spp.

	Souches lentes															Souches très lentes					
	1955	1860	1917	1933	1924	1925	1926	1928	1936	1937	1938	1939	1954	1927	1935	1816	1810	1929	1811	1815	1814
Plantes d'isolement	Cpodo	Cpodo	Cpodo	Cpodo	Cperrot	Cperrot	Cperrot	Cglauc	Cglauc	Cpodo	Cpodo	Cperrot	Cpodo	Cperrot	Cgoreen	Chyso	Clathyr	Ccomo	Cgoreen	Chyso	Chyso
Origine	BelAir	BelAir	BelAir	BelAir	FerloS	FerloS	Koldal	Kaparan	BelAir	BelAir	BelAir	Koldal	BelAir	Kaparan	Koldal	Fangh	Kabrou	Kaparan	Kabrou	Fangh	Fangh
Plantes-hôtes																					
GROUPE I																					
<i>C. podocarpa</i>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>I</b>	e	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	e	o	o	o	o	o	o	o
<i>C. glaucoides</i>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	e	e	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	o	o	o	o	o	o	o
<i>C. perrotteti</i>	e	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>HE</b>	e	e	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	e	<b>E</b>	e	e	o	o	o	o	o	o	o
GROUPE II																					
<i>C. goreensis</i>	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	<b>I</b>	<b>I</b>	o	e	e	e	e	o	o	o
<i>C. comosa</i>	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	<b>HE</b>	<b>HE</b>	e	e	e	e	o
<i>C. hyssopifolia</i>	o	o	o	<b>I</b>	<b>I</b>	o	o	o	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	o	<b>I</b>	o	<b>E</b>	e	<b>HE</b>	<b>HE</b>	e	e	<b>HE</b>
<i>C. lathyroides</i>	o	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>E</b>	<b>HE</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>HE</b>	e
<i>C. ochroleuca</i>	<b>I</b>	o	o	o	o	o	o	<b>I</b>	o	<b>I</b>	o	o	<b>I</b>	<b>I</b>	e	<b>E</b>	e	<b>HE</b>	e	<b>E</b>	e
<i>C. retusa</i>	<b>I</b>	o	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	o	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	o	o	o	<b>I</b>	<b>I</b>	e	<b>E</b>	<b>HE</b>	<b>HE</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	e
<i>A. albida</i>	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	<b>E</b>	e	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	e
<i>I. microcarpa</i>	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	<b>HE</b>	e	<b>HE</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	e
<i>A. raddiana</i>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	o	ps	ps	ps	ps	o
<i>S. rostrata</i>	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	<b>I</b>	o	<b>I</b>	<b>I</b>	o	o	o

Efficience (en nmoles de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> produit/h/plante) : **HE** = Très effective > 600 nmoles ; **E** = effective : 350-600nmoles ; e = peu effective : 100-350 nmoles ; **I** = ineffective < 100 nmoles ; o = pas de nodulation ; ps = pseudonodules.

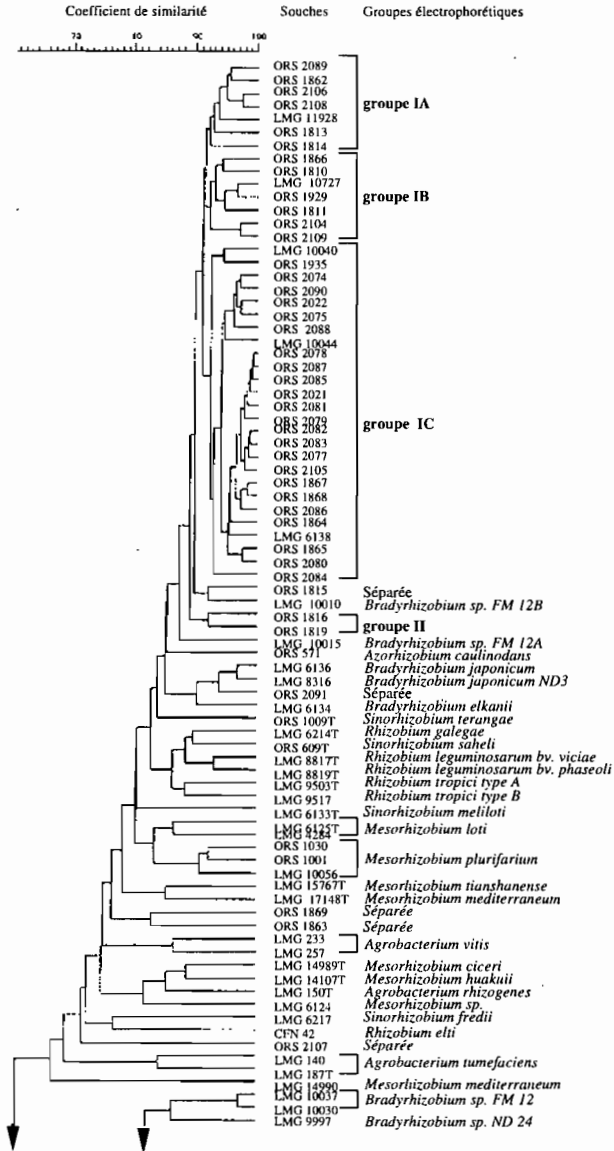


Figure 2a. Dendrogramme construit sur la base de la similarité des profils protéiques des rhizobiums de *Crotalaria* et d'espèces de référence.

## Discussion

L'utilisation des rhizobiums dans les systèmes agricoles nécessite la connaissance de leurs caractéristiques. Les rhizobiums isolés d'espèces de *Crotalaria* ont été caractérisés par une approche polyphasique intégrant l'étude de la vitesse de croissance, du spectre d'hôtes, des protéines, des facteurs de nodulation et de l'IGS.



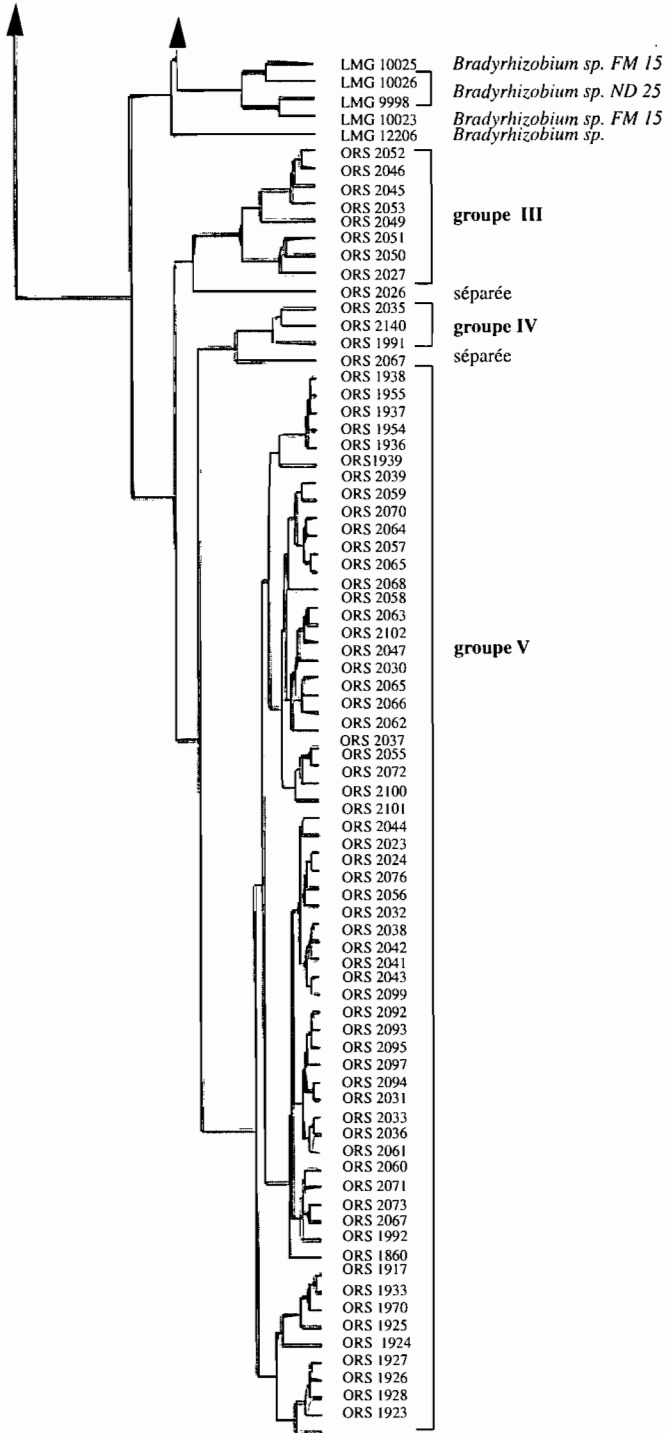


Figure 2b. Profils de Facteurs Nod produits par les rhizobium de *Crotalaria* spp.

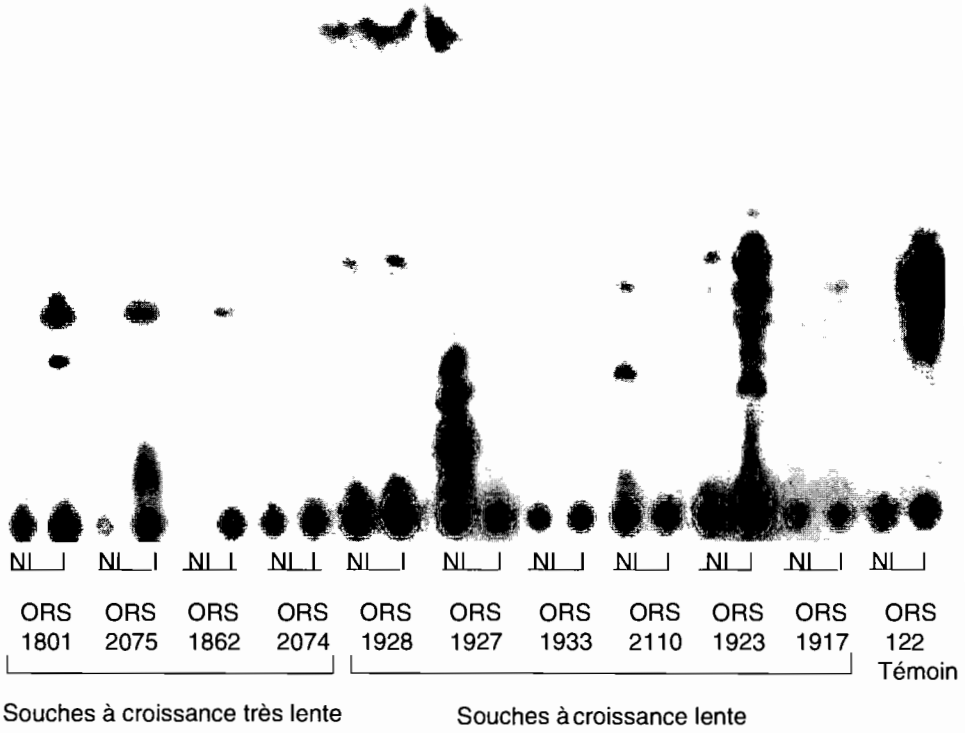


Figure 3. Profils des facteurs de nodulation produits par les rhizobiums de *Crotalaria*.

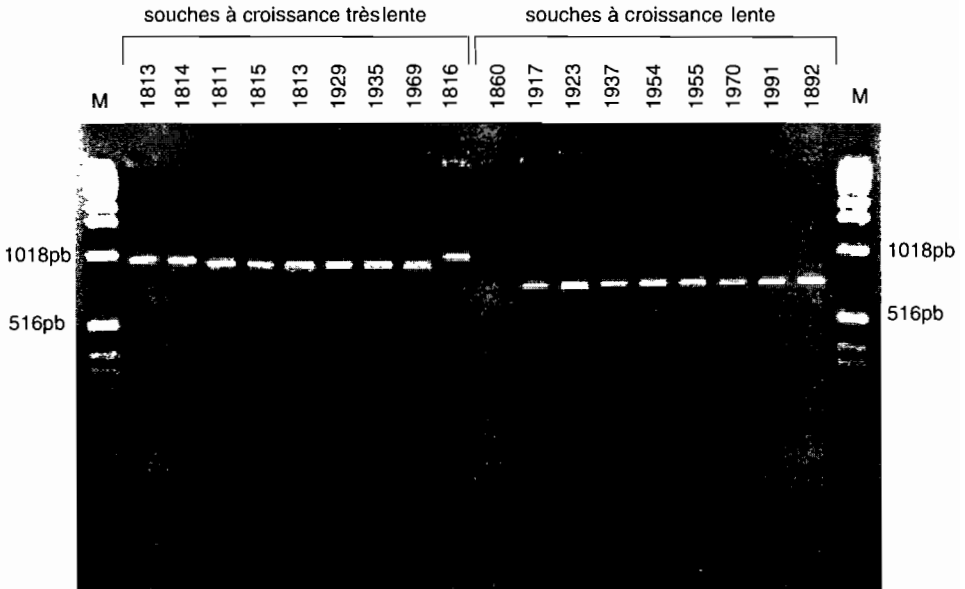


Figure 4. Taille de l'IGS des rhizobiums de *Crotalaria* spp.

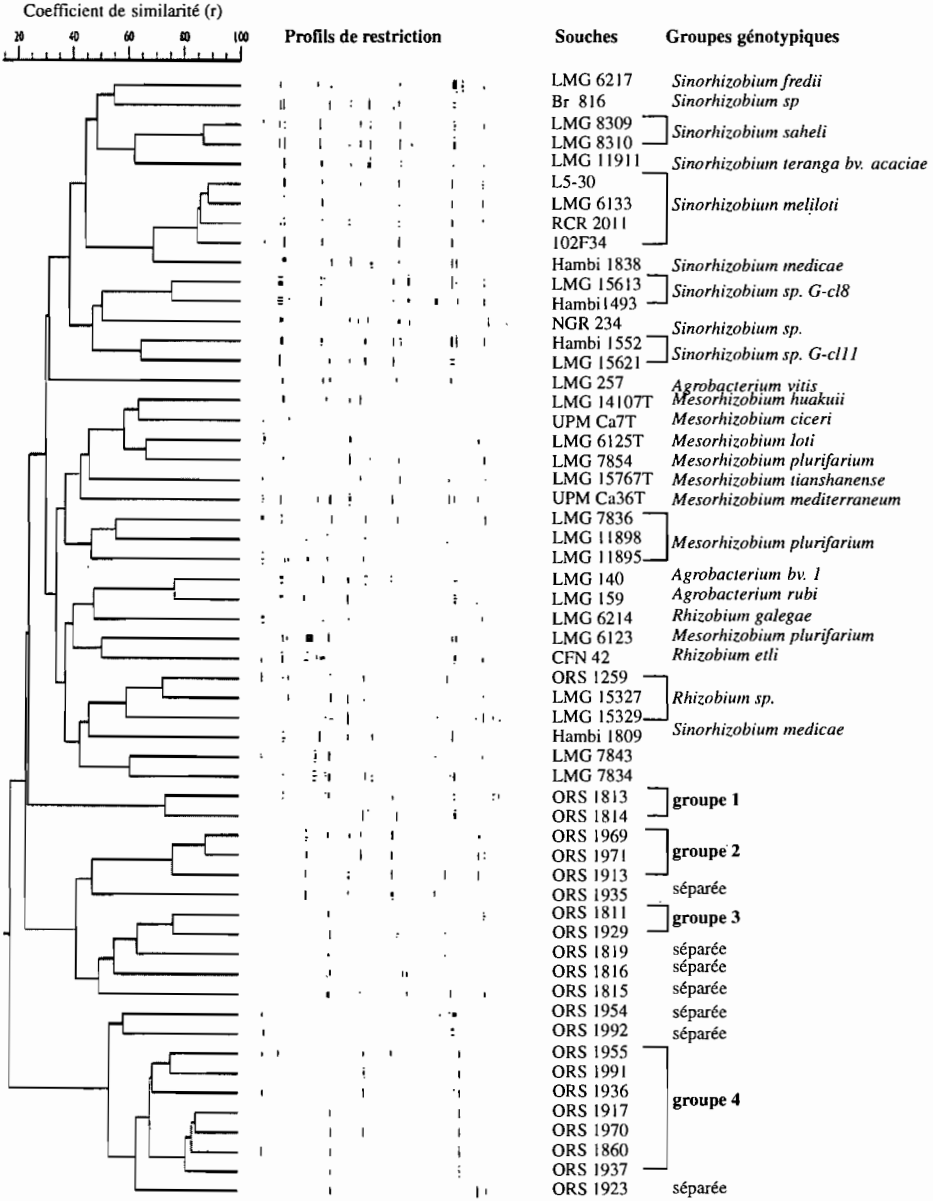


Figure 5. Dendrogramme basé sur la similarité des fragments de restriction de l'IGS des rhizobiums de *Crotalaria* spp.

Les rhizobia de *Crotalaria* sont constitués de deux types de souches selon leur croissance : les souches à croissance lente et les souches à croissance très lente. Selon le spectre d'hôtes ces deux types de rhizobia se distinguent également en deux groupes de spécificité d'hôtes. Cette spécificité de nodulation est observée pour la première fois chez les *Crotalaria* spp. et leurs rhizobia associés, ces espèces étant présentées dans la littérature comme non spécifi-

ques du point de vue de la nodulation (Date, 1976). Des études similaires ont permis de décrire trois groupes de spécificité de nodulation chez les *Acacia* (Dreyfus & Dommergues, 1981) et deux groupes chez les *Leucaena* (Mullen *et al.*, 1998).

L'analyse des protéines par SDS-PAGE confirme l'analyse de la vitesse de croissance et du spectre d'hôtes. Deux grands groupes taxonomiques apparaissent : les rhizobiums à croissance très lente appartenant au genre *Bradyrhizobium* et les rhizobiums à croissance lente n'appartenant à aucune espèce connue. Des études taxonomiques faites par Gao *et al.*, (1994) et Van Rossum *et al.*, (1995) ont généralement montré que des rhizobiums de *Crotalaria* appartenant taxonomiquement à *Bradyrhizobium japonicum*. Il faut noter que les rhizobia citées dans ces études sont des isolats de *C. juncea*, *C. canagroides*, *C. chinensis*, *C. hainanensis*, *C. mucronata*, *C. linifolia* (Gao *et al.*, 1994) et *C. paulina* (Van Rossum *et al.*, 1995), qui sont des espèces différentes de celles que nous avons étudiées. L'existence d'un nouveau groupe de rhizobiums associés à *Crotalaria* est pour la première fois décrite. Selon leur position taxonomique, les souches à croissance lente constituent un nouveau groupe qui pourrait être une nouvelle espèce voire un nouveau genre.

Cette distinction en deux groupes observés chez les rhizobia de *Crotalaria* a été confirmée par l'analyse des profils de facteurs Nod et par la PCR/RFLP de l'IGS. L'analyse numérique des fragments de restriction de l'IGS montre également une séparation des souches à croissance lente. Ces résultats montrent que les souches à croissance lente de *Crotalaria* sont génétiquement très éloignées des autres espèces de rhizobiums connues.

La diversité des rhizobiums de *Crotalaria* mise en évidence dans cette étude (vitesse de croissance, protéines totales, facteurs Nod, PCR/RFLP de l'IGS) n'est pas corrélée à l'origine géographique des souches. La position taxonomique des souches à croissance lente qui appartiennent vraisemblablement à une espèce non encore décrite, sera précisée par l'hybridation ADN-ADN et le séquençage de l'ADNr 16S.

## Références

- Boucher C., Van Gijsegem F., Barberis P. A., Arlat M., Zischek C. (1987). « *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered », *J. of Bact.*, n° 169 : pp. 5626-5632.
- Date R.A. (1976). « Inoculation of tropical pasture legumes », *Exploiting the Legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*, Proceedings of a workshop held at Kahului, Maui, Hawaii : pp. 293-311.
- De Lajudie Ph., Sy A., Ndoye I., Sylla S., Ndiaye A., Jeder H., Yattara I., Neyra M., Dreyfus B., Lindstöm K. Gillis M. (1995). « Characterization by comparative SDS-PAGE profiles of 300 rhizobia isolated from nodules of 40 tropical *Leguminosae* species of arid region of Africa », *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen fixation*, 28 mai-3 juin, Saint-Petersbourg-Pushkin (Russie).
- Dreyfus B., Dommergues Y.R. (1981). « Nodulation of *Acacia* species by fast- and slow-growing tropical strains of Rhizobium », *Appl. Environ. Microbiol.*, n° 41 : pp. 97-99.
- Dupuy N., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Vandebroune I., Maestrojuan G., Dreyfus B., Kersters K., Collins M.D., Gillis M. (1994). « Phenotypic and Genotypic Characterization of Bradyrhizobia Nodulating the Leguminous Tree *Acacia alba* », *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, n° 44 : pp. 461-473.
- Gao J.L., Sun J.G., Li Y., Wang E.T., Chen W.X. (1994). « Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan Province, China », *Int. J. Syst. Bacteriol.*, n° 44 : pp. 151-158.
- Hardy R.W.R., Burns R.C., Holsten R.D. (1973). « Application of acetylene-ethylene assay for measurement of N<sub>2</sub> fixation », *Soil Biol. Biochem.*, n° 5 : pp. 47-81.
- Jackman P.J.H. (1985). « Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns », in Goodfellow & Minnikin (éd., 1985) : pp. 115-128.

- Jordan D.C. (1984). « *Rhizobiaceae* » in Krieg & Holt (éd., 1984) : pp. 234-245.
- Kiredjan M., Holmes B., Kersters K., Guilvout J., de Ley J. (1986). « *Alcalinogenes piechaudii*, a new species from human clinical specimens and the environment », *Int. J. Syst. Bacteriol.*, n° 36 : pp. 282-287.
- Kuykendhall L.D., Roy M.A., O'neill J.J., Devine T.E. (1988). « Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum* », *Int. J. Syst. Bacteriol.*, n° 38 : pp. 358-361.
- Laemmli U.K. (1970). « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 », *Nature*, n° 227 : pp. 680-685.
- Laguerre G., Allard M.R., Revoy F., Amarger N. (1994). « Rapid identification of rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA Genes », *Appl. Environ. Microbiol.*, n° 60 : pp. 56-63.
- 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 Protein », *System Appl. Microbiol.*, n° 16 : pp. 135-146.
- Mullen B. F., Frank V.E., Date R.A. (1998). « Specificity of rhizobial strains for effective N<sub>2</sub> fixation in the genus *Leucaena* », *Tropical Grasslands*, n° 32 : pp. 110-117.
- Normand P., Cournoyer B., Simonet P., Nazaret S. (1992). « Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia* », *Gene*, n° 111 : pp. 119-124.
- Spaink H.P., Aarts A., Stacey G., Bloemberg V.G., Lugtenberg B.J.J., Kennedy P.E. (1992). « Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer-chromatography », *Mol. Plant-Microbe Interact.*, n° 5 : pp. 72-80.
- Van Rossum D., Schuurmans F.P., Gillis M., Muyotcha A., Van Verseveld H.W., Stouthamer A.H., Boogerd F.C. (1995). « Genetic and phenetic analysis of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogea* L.) roots », *Appl. Environ. Microbiol.*, n° 61 : pp. 1599-1609.
- Vauterin L., Vauterin P. (1992). « Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms », *Eur. Microbiol.*, n° 1 : pp. 37-41.
- Vincent J.M. (1970). « A manual for the practical study of root-nodule bacteria », *International biological programme handbook n° 15*, Oxford, Blackwell Scientific Publications : pp. 73-97.

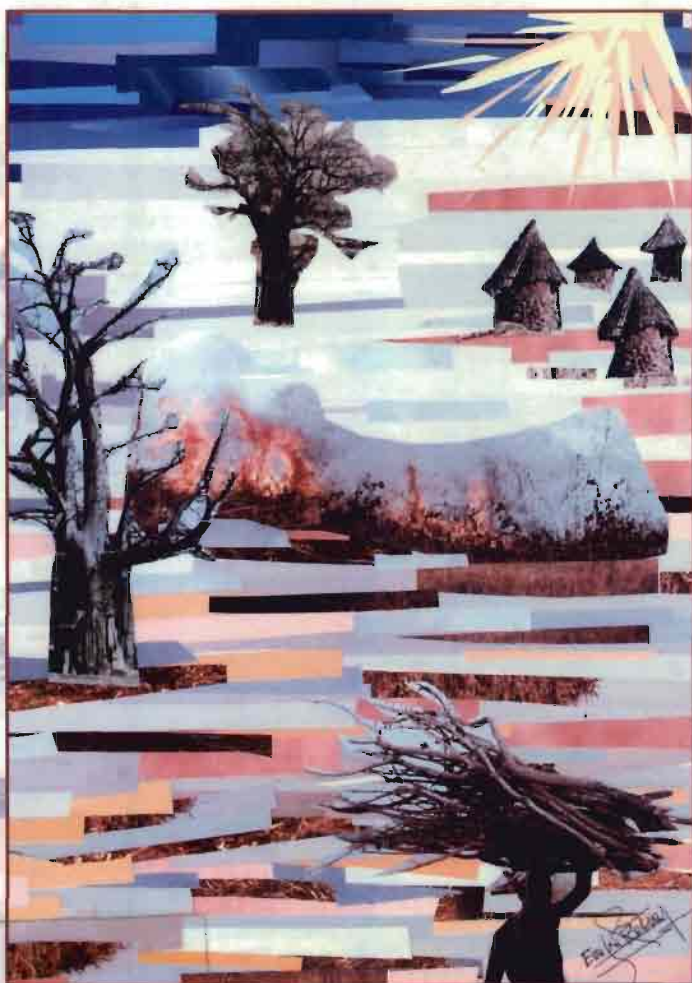
# La jachère en Afrique tropicale

*Rôles, Aménagement, Alternatives*

*Ch. Floret et R. Pontanier*

Volume 1

Actes du Séminaire international, Dakar, 13-16 avril 1999



**La jachère en Afrique tropicale.  
Rôles, aménagement, alternatives**

*Fallows in tropical Africa.  
Roles, Management, Alternatives*

Volume I

Actes du Séminaire international

Dakar, 13-16 avril 1999

*Proceedings of the International Seminary*

*Dakar, Avril 13-16, 1999*

Édité par

Ch. Floret et R. Pontanier



ISBN : 2-7099-1442-5

ISBN : 2-7420-0301-0

**Éditions John Libbey Eurotext**

127, avenue de la République, 92120 Montrouge, France

Tél : (1) 46.73.06.60

e-mail: [contact@john-libbey.eurotext.fr](mailto:contact@john-libbey.eurotext.fr)

[http : www.john-Libbey.eurotext.fr](http://www.john-Libbey.eurotext.fr)

**John Libbey and Company Ltd**

163-169 Brompton Road,

Knightsbridge,

London SW3 1PY England

Tel : 44(0) 23 80 65 02 08

**John Libbey CIC**

CIC Edizioni Internazionali

Corso Trieste 42

00198 Roma, Italia

Tel. : 39 06 841 26 73

© John Libbey Eurotext, 2000, Paris