

Diversité génétique et transferts horizontaux chez *Sinorhizobium* sp. partenaire symbiotique de *Medicago* sp.

Xavier BAILLY^(1,2), Stéphane DE MITA⁽³⁾, Isabelle OLIVIERI^{(2)*},
Jean-Marie PROSPERI⁽³⁾, Gilles BÉNA⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes, UMR 113 IRD-Cirad-ENSAM-UM2, Campus de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

⁽²⁾ Institut des Sciences de l'Évolution, UMR 5554 CNRS-UM2, cc 065, bât 22
Université Montpellier 2, place Eugène Bataillon,
34095 Montpellier Cedex 5, France

⁽³⁾ INRA, Station de Génétique et Amélioration des Plantes,
Domaine de Melgueil, 34130 Mauguio, France

Abstract: Genetic diversity and lateral gene transfer in *Sinorhizobium* sp., symbiotic partner of *Medicago* sp. The mutualism between species of the genus *Medicago* (Fabaceae) and nitrogen-fixing bacteria of the genus *Sinorhizobium* is among the most studied ones. In the present paper, we describe an experiment aimed at pointing out those factors that determine the genetic diversity of *Sinorhizobium* at a local scale. A bacterial population was allowed to nodulate and fix nitrogen with three different plant communities: (i) 20 plants each belonging to a unique *Medicago* species, (ii) 20 plants produced from 20 inbred lines, each produced from one of 20 populations of *Medicago truncatula*, and (iii) 20 plants of a same inbred line *M. truncatula*. Sixty bacterial strains were isolated from nodules and characterized by multilocus sequencing on six loci, among which three were on the chromosome, two on pSymB plasmid, and one on pSymA plasmid. Each strain thus isolated was found to belong to either *Sinorhizobium meliloti* or *Sinorhizobium medicae*. Linkage disequilibrium provided evidence for horizontal transfer at the level of each species of *Sinorhizobium*. No relationship was found between the bacterial diversity and that of host-plants. We discuss the evolutionary consequences of these results, as well as those for practical sampling of rhizobium genetic diversity.

symbiosis / *Sinorhizobium* / *Medicago* / adaptation / horizontal transfers / genetic structure

* Correspondance et tirés à part : olivieri@isem.univ-montp2.fr

Résumé : Le mutualisme entre les Fabaceae du genre *Medicago* et les bactéries fixatrices d'azote du genre *Sinorhizobium* est l'une des symbioses les plus étudiées. Dans ce cadre, un piégeage visant à mettre en évidence les facteurs structurant la diversité génétique des *Sinorhizobium* à l'échelle locale a été développé. Un sol prélevé et contenant une population bactérienne naturelle a été mis en contact avec 60 plantes : (i) 20 plantes appartenant à 20 espèces du genre *Medicago*, (ii) 20 plantes issues de 20 lignées de *Medicago truncatula*, et (iii) 20 plantes d'une même lignée de *M. truncatula*. Soixante souches bactériennes ont été isolées par piégeages puis caractérisées par séquençage sur six locus, dont trois situés sur le chromosome, deux sur le plasmide pSymB, et un sur le plasmide pSymA. L'ensemble des bactéries piégées appartient aux espèces *Sinorhizobium meliloti* et *Sinorhizobium medicae*. L'étude des déséquilibres de liaison permet de mettre en évidence l'existence de transferts horizontaux de matériel génétique à l'échelle intraspécifique. Aucune relation entre la diversité des bactéries symbiotiques et celle des plantes-hôtes n'a pu être mise en évidence. Les implications évolutives de ces résultats sont discutées, ainsi que leurs conséquences en terme d'échantillonnage pratique de la diversité génétique des rhizobiums.

symbiose / *Sinorhizobium* / *Medicago* / adaptation / transferts horizontaux / structure génétique

1. INTRODUCTION

La symbiose entre les bactéries fixatrice d'azote et les plantes de la famille des Fabacées est l'un des mutualismes les plus étudiés. L'interaction se manifeste par la mise en place d'organes racinaires ou caulinaires spécialisés, appelés nodosités, dont les cellules sont colonisées par les bactéries symbiotes. Au sein de ces organes, les bactéries se différencient puis réalisent la réduction du diazote atmosphérique en ammonium, directement assimilable par les végétaux. La mise en place de cette symbiose est liée à un dialogue moléculaire complexe entre les deux partenaires qui interviennent à différents niveaux. Les gènes de Fabaceae qui sont alloués aux fonctions symbiotiques sont encore peu caractérisés. Inversement, de nombreux gènes bactériens liés à cette symbiose ont été identifiés et caractérisés par des études physiologiques et génétiques. Lors de la colonisation du partenaire végétal, des molécules interviennent dans la reconnaissance par l'hôte, la mise en place des nodosités et la colonisation des cellules végétales [24]. Ces molécules sont les produits de voies métaboliques complexes. Parmi elles, les facteurs Nod, des lipo-chito-oligosaccharides, jouent un rôle primordial [18]. Leur conformation dépend de la présence de différents gènes *nod*, qui sont

groupés dans un îlot symbiotique et sont régulés par la présence de flavonoïdes spécifiques sécrétés par la plante hôte [18]. Les polysaccharides de surface ont également un rôle important dans la détermination du spectre d'interaction [24]. Enfin, dans le cadre de l'activité fixatrice d'azote, les gènes *nif* et *fix*, responsables du métabolisme azoté chez le symbiote procaryote, jouent un rôle dans la spécificité symbiotique *via* leur régulation. Ainsi, la spécificité observée est sous déterminisme multigénique [25].

Le couple *Medicago/Sinorhizobium* constitue un modèle d'intérêt particulier. Il existe plus de 80 espèces de *Medicago* présentant des traits d'histoire de vie très divers, en terme de régime de reproduction ou de distribution géographique [3]. Le genre comprend la luzerne cultivée *Medicago sativa*, ainsi que *Medicago truncatula*, l'espèce modèle des études sur la biologie des Fabaceae [7]. Les bactéries fixatrices d'azote associées au genre *Medicago* appartiennent pour l'essentiel au genre *Sinorhizobium*, à l'exception du couple *M. ruthenica/Rhizobium mongolense*. Des études moléculaires ont montré que deux espèces de *Sinorhizobium* pouvaient leur être associées, *Sinorhizobium meliloti* et *Sinorhizobium medicae* [20], [21]. Enfin, la mise en évidence de la structure tripartite du génome des espèces *S. meliloti* [5] et *S. medicae* [22], comprenant un chromosome et deux mégaplasmides (appelés pSymA et pSymB), puis le séquençage complet du génome d'une souche de *S. meliloti* [2], [4], [10], [11] facilitent le développement d'outils moléculaires sur les populations symbiotiques. En particulier, il est envisageable de caractériser les souches bactériennes par séquençage multilocus (MLST) [15].

Dans cet article, nous tentons de répondre aux deux questions suivantes. D'une part, la diversité génétique des plantes-hôtes utilisées dans les piègeages bactériens du sol influe-t-elle sur la diversité des symbiotes associés recouverts ? D'autre part, les différentes unités de réplication des *Sinorhizobium* associés aux espèces du genre *Medicago* évoluent-elles de manière indépendante grâce aux transferts horizontaux de matériel génétique entre souches ?

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Matériel biologique

Afin de savoir s'il existait une relation entre la diversité des plantes-hôtes et la diversité des symbiotes associés recouverts, trois communautés végétales

de richesse génétique décroissante ont été mises en contact avec un sol contenant une population naturelle de *Sinorhizobium* capable de s'associer à différentes espèces du genre *Medicago*. Les trois communautés végétales ont été définies comme suit (voir tabl. I). Pour la première, 20 espèces différentes du genre *Medicago*, choisies de manière à représenter un maximum de la diversité phylogénétique du genre, ont été utilisées, à raison d'un individu par espèce. Pour la deuxième communauté, 20 lignées fixées différentes de l'espèce modèle *M. truncatula*, choisies afin de représenter au mieux la diversité de cette espèce, ont été utilisées, à raison d'un individu par lignée. Ces lignées ont été choisies de manière à représenter l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce (J. M. Proserpi, données non publiées). Enfin, la seule lignée fixée A17 dérivée du cultivar Jemalong de *M. truncatula* a été choisie pour former une troisième communauté végétale de 20 individus ne présentant pas de diversité génétique. Les semences proviennent de l'équipe Gestion, Évolution et Valorisation de la variabilité génétique (UMR Diversité et Génome des plantes cultivées, Montpellier).

L'échantillon de sol a été prélevé en octobre 2001 à Sainte-Colombe de la Commanderie (Pyrénées orientales). Environ un litre de sol a été récupéré puis homogénéisé à partir de plusieurs prélèvements effectués au niveau d'une communauté végétale composée notamment de plusieurs espèces du genre *Medicago*, de manière à obtenir une population de bactéries représentative de la diversité locale. L'extrait de sol est alors conservé à 4 °C pendant un mois, jusqu'à la mise en place du dispositif expérimental.

Tableau I : Profils alléliques obtenus par séquençage de six locus à partir de 60 souches de *Sinorhizobium meliloti* et de *Sinorhizobium medicae* obtenues après piégeage sur 60 plantes du genre *Medicago*. Les individus de *S. meliloti* apparaissent en gras, ceux de *S. medicae* en gris, les allèles spécifiques de *S. meliloti* sont en gras, ceux spécifiques de *S. medicae* en gris ; les cases vides sont des données manquantes. Voir le matériel et méthode pour la définition des locus et des communautés végétales.

Souches bactériennes (les noms correspondent aux plantes-hôtes dont elles sont isolées)		Locus					
		FUM	HSS	RKP	THU	EXO	NOD
Communauté végétale 3	<i>Medicago truncatula</i> Jemalong A17-1	A	A	A	A	B	D
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-2	E	G	C			F
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-3	A	A	A		B	A
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-4	C	B	B	D	A	B
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-5	A	A	A		B	C
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-6	C	B	B	A	B	D
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-7	A	A	A	A	B	B
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-8	E	C	C		G	F
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-9	E	C	C		C	F

Diversité génétique de *Sinorhizobium* sp.

Communauté végétale 3	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-10	E	D	C		G	
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-11	A	A	A	A	B	
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-12	E	D	C		F	
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-13	E	C	C	C	F	
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-14	E	C	C		F	
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-15	E	C	C		G	
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-16	C	B	B	C	C	
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-17		D	C	D	F	
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-18	E	D	C		F	
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-19	E	C	C	C	F	
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-20	A	A	A	A	D	
	<i>M. truncatula</i> Jemalong A17-21	A	A		E	B	B
Communauté végétale 2	<i>M. truncatula</i> Salses-42B	E	F	C	C	F	
	<i>M. truncatula</i> Salses-06A	E	C	C	C	F	
	<i>M. truncatula</i> F83.005-9	E	C	C		G	
	<i>M. truncatula</i> F83.005-5		D	C		F	
	<i>M. truncatula</i> F20.089-B		C			F	
	<i>M. truncatula</i> F20.061-A	E	E	C	D	G	
	<i>M. truncatula</i> F20.047-A	E	D	C		F	
	<i>M. truncatula</i> F11.005-E	E	C	C		F	
	<i>M. truncatula</i> ESP.171-F	E	C	C		G	
	<i>M. truncatula</i> ESP.158-A	E	D			I	
	<i>M. truncatula</i> ESP.105-L	A	A		B	B	
	<i>M. truncatula</i> GRC.064-B	A	B	B	B	A	
	<i>M. truncatula</i> GRC.043-1	E	D	C	B	F	
	<i>M. truncatula</i> GRC.020-B	E	C	C		F	
	<i>M. truncatula</i> CRE.007-J	E	C	C		F	
	<i>M. truncatula</i> DZA.327-7	C	B	B	A		
	<i>M. truncatula</i> DZA.315-16	A	A	A	C	B	B
	<i>M. truncatula</i> DZA.220-H	E	C	C		F	
	<i>M. truncatula</i> DZA.055-H	D	B	B	F	E	
	Communauté végétale 1	<i>Medicago truncatula</i> A17-22	E	C	C	E	G
<i>Medicago monspeliaca</i>		A	A	A	C	B	A
<i>Medicago laciniata</i>		A	A	A		B	B
<i>Medicago orbicularis</i>		E	D	C	G	F	H
<i>Medicago ciliaris</i>		A	A	A		A	
<i>Medicago temoreana</i>		E	D	C		D	
<i>Medicago lupulina</i>		E	C	C			
<i>Medicago shepardii</i>		E	D	C	G		F
<i>Medicago rotata</i>		E	C	C		E	F
<i>Medicago polymorpha</i>		E	C	C	H	D	G
<i>Medicago murex</i>		E	D	C	G		
<i>Medicago noeana</i>		E	C	C	G	C	F
<i>Medicago rigiduloides</i>		E	D	C	G		F
<i>Medicago rigidula</i>		A		A	A	B	A
<i>Medicago doliata</i>		C	B	B	C	A	B
<i>Medicago littoralis</i>			A	A	A	B	B
<i>Medicago tornata</i>		C	B	B		B	
<i>Medicago beyniana</i>		B	A	A		B	B
<i>Medicago sativa</i>	C	A	A	A	B	B	
<i>Medicago radiata</i>	C	B	B	C	B	A	

2.2. Méthodes

2.2.1. Piégeage

Afin d'isoler des souches bactériennes associées aux taxons du genre *Medicago*, une expérience de piégeage bactérien sur nodosités a été réalisée. L'ADN bactérien a été extrait à partir de la mise en culture des bactéries ainsi piégées (voir [23]).

2.2.2. Développement des marqueurs et caractérisation des souches

Des régions du génome portant des opérons ayant potentiellement un rôle dans la mise en place de la symbiose ont été recherchées sur chacun des trois réplicons. Le groupe de gènes chromosomiques **rkp** (codant les enzymes d'une voie métabolique de synthèse de succinoglycane impliquées dans la nodulation [14], et plasmidiques **nod** (pSymA) (dont les produits permettent la synthèse des facteurs Nod, [8]) et **exo** (pSymB) (codant des protéines de la voie de biosynthèse d'exopolysaccharides de surface, [6]), ont été choisis. Trois autres régions non impliquées dans la nodulation ont permis d'obtenir un balisage du génome assez dense et régulier. Ainsi, les régions des gènes chromosomiques **fumC** et **hss**, ainsi que celle du gène **thuR** sur pSymB ont été choisies. Pour chaque région du génome observée, des zones de micro-synténie entre le génome de *S. meliloti* et celui de différentes bactéries phylogénétiquement proches pour lesquelles des données de séquençage total ont été publiées, ont permis de définir des amorces dans des zones très conservées. Ainsi, au sein de chaque structure synténique, les séquences codantes flanquant les espaces intergénomiques (IGS) de plus de 300 paires de bases ont été analysées afin de définir des jeux d'amorces spécifiques pour effectuer des amplifications puis du séquençage. Six paires d'amorces ont ainsi été développées (voir tabl. II).

2.2.3. Analyses statistiques

On a considéré comme un nouvel allèle chaque séquence divergeant d'un nucléotide ou plus par rapport à celles déjà obtenues. Un indice de diversité génétique, l'hétérozygotie théorique, a ainsi été calculé pour chaque locus, et comparé entre communautés végétales à l'aide d'un test de permutations. La différenciation génétique entre les trois communautés a été testée à l'aide de tests exacts effectués avec le logiciel Genepop [19]. Afin de mettre en évidence des phénomènes de parasexualité, l'absence de

déséquilibre de liaison a été testée grâce à ce même logiciel, en suivant le protocole prévu pour les données haploïdes [19].

Tableau II : Amorces utilisées pour l'amplification des différents locus étudiés. Les deux amorces *pSymB* ont été définies indépendamment pour *S. meliloti* (mlt) et *S. medicae* (mdc). Les conditions d'amplifications sont identiques pour toutes les paires d'amorces : 3' à 95°C, puis 10 x (30'' à 95°C, 30'' 60°C avec décroissance de 1°C à chaque cycle, 1'30'' à 72°C) puis 20 x (30'' à 95°C, 30'' 50°C, 1'30'' à 72°C).

Locus	Localisation	Sens	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce 5' - 3'
<i>rkp</i>	chromosome	For	<i>rkpA</i>	AGGCATGCACGCCCTATGA
		Rev	<i>rkpU</i>	GCCATCGACATCTACAATATCAA
<i>hss</i>	chromosome	For	<i>hss-1354f</i>	TACACCGACTGGACACCGC
		Rev	<i>omp-125r</i>	GATGCCGTTCCGGATCGACCC
<i>fum</i>	chromosome	For	F-Y00150	CGTGACAATCGCTGCCGA
		Rev	FumC-71r	CGCTGCGCCTG(GC)GCGCCCC
<i>nod</i>	<i>pSymA</i>	For	<i>nodE</i>	CAGTTCTGGCATTCAAGC
		Rev	<i>nodG</i>	CCCCTCCTATGGCTCCTGAT
<i>gab</i>	<i>pSymA</i>	For	<i>gabS2-1965</i>	CATGACCAAAGACCGCTTCC
		Rev	<i>gabS2-1307</i>	GCATGATCGGCCTCAACAC
<i>thu</i> -(mlt)	<i>pSymB</i>	For	<i>thumltf1</i>	ACCAGGCGCACGGCGTTGAT
		Rev	<i>thumltr1</i>	AATTCGGCGGCGGCAGCAAG
<i>thu</i> -(mdc)	<i>pSymB</i>	For	<i>thumdcf1</i>	GCACCGCGTTGATATTCG
		Rev	<i>thumdcr1</i>	GACGATAGCGGCACAGGA
<i>exo</i> -(mlt)	<i>pSymB</i>	For	<i>exomltf1</i>	CAACAAGACGGATATGAACGAA
		Rev	<i>exomltr1</i>	GTGGTGGAAGGATTGACTGC
<i>exo</i> -(mdc)	<i>pSymB</i>	For	<i>exomdcf2</i>	CATGAACGAGCTGGGCAAAT

3. RÉSULTATS

3.1. Piégeages

Des nodosités ont été récoltées sur toutes les plantes utilisées lors de cette étude. Par la suite, une souche bactérienne a été isolée à partir d'une des nodosités choisies aléatoirement de chacune des 60 plantes utilisées. Un total de 60 souches a donc été isolé. Après typage moléculaire, 288 séquences effectuées sur un seul brin ont été acquises sur les 6 locus envisagés. Chaque souche a ainsi été caractérisée pour au moins 3 des 6 locus utilisés.

3.2. Influence de la communauté végétale sur la diversité génétique (tabl. I)

La comparaison des séquences obtenues avec les séquences de référence du génome de *S. meliloti* met en évidence la présence pour ces isolats de deux groupes bactériens largement différenciés correspondant aux deux espèces *S. meliloti* et *S. medicae*. La position taxonomique des souches vis-à-vis de ces deux groupes est conservée d'un locus à l'autre. Sur la base des fréquences alléliques, ces deux groupes sont très différenciés ($F_{st} = 0,55$, $P < 0,001$). La diversité de *S. meliloti* semble supérieure à celle de *S. medicae* mais ces résultats préliminaires doivent être confirmés.

Aucune différence significative de diversité génétique (hétérozygotie) n'a pu être mise en évidence entre les populations bactériennes isolées à partir des trois communautés végétales de richesse croissante ($P > 0,1$). De même, aucune différenciation génétique significative n'est observée entre ces trois communautés, que l'on considère chacune des deux espèces bactériennes séparément ou l'ensemble des individus (le F_{st} estimé entre communautés varie de 0,006 à 0,033, $P > 0,10$ quelque soit le jeu de données considéré).

3.3. Déséquilibres de liaison

L'ensemble des tests de déséquilibre de liaison entre paires de locus effectués sur l'ensemble des individus permet de rejeter l'hypothèse nulle d'équilibre de liaison ($P < 0,001$ pour chacun des tests, valeurs inférieures aux P-values corrigées par un test séquentiel de Bonferroni). Cependant, au sein du seul groupe qui inclut les souches de *S. meliloti*, seuls les locus portés par une même unité de réplication sont statistiquement liés. Ainsi, les déséquilibres observés entre paires de locus chromosomiques (*rkp*, *bss* et *fumC*) sont significativement différents de zéro au seuil de 0,1 % et le test effectué entre les deux locus portés par le mégaplasmide pSymB rejette marginalement l'hypothèse nulle au seuil de 7,4 %. Toutes les autres P-values sont supérieures à 20 %. L'étude du déséquilibre de liaison chez les individus du second groupe (*S. medicae*) ne peut être effectuée de manière correcte à cause du faible polymorphisme de séquence dans ce groupe.

4. DISCUSSION

Le fait que toutes les souches isolées appartiennent aux espèces *S. meliloti* et *S. medicae* confirme les résultats précédemment obtenus [13] alors que la diversité des rhizobium s'est récemment étendue à de nouveaux groupes taxonomiques [16]. Ceci souligne le degré de spécificité important de l'interaction *Medicago* sp./*Sinorhizobium* sp. Au sein des souches étudiées, la différenciation génétique entre les individus des espèces *S. meliloti* et *S. medicae* est mise en évidence conformément aux données taxonomiques et génétiques existantes [9], [12], [21]. Ceci est confirmé par les tests de déséquilibre de liaison sur paires de locus.

Inversement, les tests de déséquilibre de liaison effectués chez *S. meliloti* montrent que les paires de locus appartenant à des unités de réplication différentes, que ce soit le chromosome, le mégaplasmide pSymA ou le mégaplasmide pSymB, sont en équilibre de liaison. Ceci indique une activité de conjugaison importante chez cette espèce. Il pourrait donc exister chez les bactéries du genre *Sinorhizobium* associées au genre *Medicago* des phénomènes de conjugaison intraspécifique fréquents en population naturelle concernant les mégaplasmides, notamment chez *S. meliloti* alors que de tels transferts n'ont jamais pu, à notre connaissance, être mis en évidence *in vitro*. Cette constatation amène de nombreuses questions sur l'existence de ces systèmes de transfert génétique en relation avec nos connaissances sur les pressions dirigeant l'évolution et la spéciation des bactéries symbiotiques.

La symbiose a un impact considérable sur la dynamique des populations bactériennes [17]. Ainsi, le niveau de diversité de la communauté végétale en interaction avec les bactéries mutualistes est susceptible d'avoir un effet majeur sur la diversité de ces dernières. Cependant, les tests visant à révéler une différence de diversité entre les souches bactériennes isolées à partir des différentes communautés végétales n'ont pas mis en évidence un impact de la diversité des plantes-hôtes sur la diversité des bactéries symbiotiques associées dans les nodosités. Ainsi, à l'échelle locale, aucune corrélation entre les niveaux de diversité rencontrés chez les deux partenaires n'a été mise en évidence. Néanmoins, ces résultats sont à confirmer car, d'une part, le dispositif expérimental ne permet pas de détecter des différences quantitatives d'association symbiotique entre les différents taxons

observés, que cela soit sur les niveaux d'efficacité de fixation azotée ou les fréquences d'association intra-plante. Le piégeage réalisé au sein de la communauté 3 (unique lignée de *M. truncatula*) et qui équivaut à l'analyse de 20 nodosités sur une seule plante montre ainsi une diversité intra-individuelle très importante, et on ne peut exclure des variations inter-lignées ou inter spécifiques au sein de nos trois communautés. D'autre part, l'utilisation d'un échantillon provenant d'une population bactérienne unique limite la diversité des partenaires symbiotiques mis en contact avec les plantes dans notre expérience. Une seconde expérimentation mettant en contact un sol contenant potentiellement une diversité bactérienne symbiotique plus importante serait intéressante à réaliser.

Enfin, les résultats obtenus soulèvent le problème lié à la différenciation et la coexistence des espèces *S. meliloti* et *S. medicae*. En effet, ces deux taxons semblent occuper des niches écologiques comparables et devraient faire l'objet d'exclusion compétitive. L'existence d'espèces du genre *Medicago* ne pouvant interagir de manière efficace qu'avec *S. medicae* et l'hétérogénéité spatiale de l'habitat de ces rhizobium pourraient expliquer la coexistence des deux taxons. Les mécanismes de maintien de la diversité au sein de chacune de ces espèces pourraient être du même ordre.

5. CONCLUSION

La présente étude a permis de mettre en évidence des transferts horizontaux de matériel génétique chez les bactéries du genre *Sinorhizobium* associées aux plantes-hôtes du genre *Medicago*. Notamment, nos résultats montrent que les unités de réplifications de *S. meliloti* évoluent de manière indépendante, probablement grâce à des mécanismes de transfert de type conjugatif. Le polymorphisme mis en évidence lors de cette étude nous a permis de suggérer qu'à l'échelle locale, les unités de réplification caractérisées de manière adéquate peuvent présenter des patrons de structuration génétique différents. Ceci pourrait éventuellement être mis en relation avec des phénomènes sélectifs importants dans le cadre de l'évolution des populations de rhizobium. Par ailleurs, à l'échelle locale, il n'existe pas de corrélation entre la diversité des plantes-hôtes et celle des bactéries symbiotiques associées. Ainsi, la mise en place de la structure génétique des bactéries

observée ne semble pas être due à un balayage sélectif à l'échelle du génome lié aux plantes-hôtes avec lesquelles elles interagissent.

Dans le cadre de la gestion des ressources génétiques procaryotes, ces résultats laissent supposer que les populations bactériennes symbiotiques associées au genre *Medicago* peuvent s'adapter de manière indépendante à leur hôte et à différents facteurs abiotiques (intérêt pour l'adaptation locale). Ils indiquent par ailleurs que la caractérisation des populations de bactéries mutualistes peut se faire par piégeage à l'aide d'un nombre restreint de génotypes de plantes-hôtes, sous réserve de choisir ces génotypes judicieusement.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Joëlle RONFORT, Jean-Marie PROSPÉRI et Thomas BATAILLON pour les discussions ayant présidé à la mise en place des expériences décrites dans cet article. L'ensemble du matériel végétal utilisé provient du Laboratoire de Jean-Marie PROSPÉRI (INRA Montpellier). Lucette MAURE (INRA) a apporté une aide technique précieuse pour l'isolement des souches bactériennes. Cette recherche a été financée par le programme « Recherches méthodologiques pour l'amélioration des processus de gestion et de conservation des ressources génétiques animales, végétales et microbiennes » du Bureau des Ressources Génétiques, grâce à un contrat attribué à Isabelle OLIVIERI et Gilles BÉNA. Xavier BAILLY bénéficie d'une bourse de doctorat du Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche.

RÉFÉRENCES

- [1] Bailly X., Structuration de la diversité chez *Sinorhizobium* sp., partenaire symbiotique de *Medicago* sp., DEA Ressources phytogénétiques et interactions biologiques, UM2-Ensam, 2002.
- [2] Barnett M.J., Fisher R.F., Jones T., Komp C., Abola A.P., Barloy-Hubler F., Bowser L., Capela D., Galibert F., Gouzy J., Gurjal M., Hong A., Huizar L., Hyman R.W., Kahn D., Kahn M.L., Kalman S., Keating D.H., Palm C., Peck M.C., Surzycki R., Wells D.H., Yeh K.C., Davis R.W., Federspiel N.A., Long S.R., Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 9883-9888.

- [3] Bena G., Lejeune B., Prosperi J.M., Olivieri I., Molecular phylogenetic approach for studying life-history evolution: the ambiguous example of the genus *Medicago* L., Proc. R. Soc. Lond. Biol. 265 (1998) 1141-1151.
- [4] Capela D., Barloy-Hubler F., Gouzy J., Bothe G., Ampe F., Batut J., Boistard P., Becker A., Boutry M., Cadieu E., Dreano S., Gloux S., Godrie T., Goffeau A., Kahn D., Kiss E., Lelaure V., Masuy D., Pohl T., Portetelle D., Puhler A., Purnelle B., Ramsperger U., Renard C., Thebault P., Vandenbol M., Weidner S., Galibert F., Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 9877-9882.
- [5] Casse F., Boucher C., Julliot J.S., Michel M., Denarie J., Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis, J. Gen. Microbiol. 113 (1979) 229-242.
- [6] Cheng H.P., Walker G.C., Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*, J. Bacteriol. 180 (1998) 5183-91.
- [7] Cook D.R., *Medicago truncatula* - a model in the making! Curr. Opin. Plant. Biol. 2 (1999) 301-304.
- [8] Demont N., Debelle F., Aurelle H., Denarie J., Prome J.C., Role of the *Rhizobium meliloti* nodF and nodE genes in the biosynthesis of lipooligosaccharidic nodulation factors, J Biol Chem 268, 1993, 20134-20142.
- [9] Eardly B.D., Materon L.A., Smith N.H., Johnson D.A., Rumbaugh M.D., Selander R.K., Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*, Appl. Environ. Microbiol. 56 (1990) 187-94.
- [10] Finan T.M., Weidner S., Wong K., Buhrmester J., Chain P., Vorholter F.J., Hernandez-Lucas I., Becker A., Cowie A., Gouzy J., Golding B., Puhler A., The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 2001, 9889-9894.
- [11] Galibert F., Finan T.M., Long S.R., Puhler A., Abola P., Ampe F., Barloy-Hubler F., Barnett M.J., Becker A., Boistard P., Bothe G., Boutry M., Bowser L., Buhrmester J., Cadieu E., Capela D., Chain P., Cowie A., Davis R.W., Dreano S., Federspiel N.A., Fisher R.F., Gloux S., Godrie T., Goffeau A., Golding B., Gouzy J., Gurjal M., Hernandez-Lucas I., Hong A., Huizar L., Hyman R.W., Jones T., Kahn D., Kahn M.L., Kalman S., Keating D.H., Kiss E., Komp C., Lelaure V., Masuy D., Palm C., Peck M.C., Pohl T.M., Portetelle D., Purnelle B., Ramsperger U., Surzycki R., Thebault P., Vandenbol M., Vorholter F.J., Weidner S., Wells D.H., Wong K., Yeh K.C., Batut J., The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*, Science 293 (2001) 668-672.
- [12] Gordon D.M., Wexler M., Reardon T.B., Murphy P.J., The genetic structure of *Rhizobium* populations, Soil. Biol. Biochem. 27 (1995) 491-99.

- [13] Jebara M., Mhamdi R., Aouani M. E., Ghrir R., Mars M., Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisian soils, *Can. J. Microbiol.* 47 (2001) 139-147.
- [14] Kereszt A., Kiss E., Reuhs B.L., Carlson R.W., Kondorosi A., Putnoky P., Novel rkp gene clusters of *Sinorhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and invasion of the symbiotic nodule: the rkpK gene encodes a UDP-glucose dehydrogenase, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 5426-31.
- [15] Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G., Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 3140-3145.
- [16] Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C., Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria, *Nature* 411 (2001) 948-50.
- [17] Parker M.A., Mutualism as a constrain on invasion success for legumes and rhizobia, *Div. Distrib.* 7 (2001) 125-136.
- [18] Perret X., Staehelin C., Broughton W.J., Molecular basis of symbiotic promiscuity, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2000) 180-201.
- [19] Raymond M., Rousset F., GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and eucumenisim, *Heredity* 86 (1995) 248-249.
- [20] Rome S., Brunel B., Normand P., Fernandez M., Cleyet-Marel J.C., Evidence that two genomic species of *Rhizobium* are associated with *Medicago truncatula*, *Arch. Microbiol.* 165 (1996a.) 285-288.
- [21] Rome S., Fernandez M.P., Brunel B., Normand P., Cleyet-Marel J.C., *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 (1996b.) 972-80.
- [22] Roumiantseva M.L., Yakutkina V.V., Damman-Kalinowski T., Sharypova L.A., Keller M., Simarov B.V., Comparative analysis of structural organization of the genome in alfalfa nodule bacteria *Sinorhizobium medicae* and *Sinorhizobium meliloti*, *Russian Journal of Genetics* 35 (1999) 128-135.
- [23] Somasegaran P., Hoben H.J., Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. Springer-Verlag New York, Inc, 1994.
- [24] Spaink H.P., Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* 54 (2000) 257-88.
- [25] Spaink H.P., Plant-microbe interactions: a receptor in symbiotic dialogue, *Nature* 417 (2002) 910-1.

Bailly Xavier, Mita S. de, Olivieri I., Prospero J.M., Béna Gilles
Diversité génétique et transferts horizontaux chez
Sinorhizobium sp. partenaire symbiotique de Medicago sp.

In : Un dialogue pour la diversité génétique. Paris : BRG, 2005,
p. 321-333

(Les Actes du BRG ; 5). ISBN 2-908-447-33-9 Colloque
National du BRG : Un Dialogue pour la Diversité Génétique, 5.