

# Certaines légumineuses du genre *Crotalaria* sont spécifiquement nodulées par une nouvelle espèce de *Methylobacterium*

Abdoulaye Sy, Éric Giraud, Ramatoulaye Samba, Philippe de Lajudie, Monique Gillis et Bernard Dreyfus

**Résumé :** Nous avons isolé 126 souches de rhizobiums à partir de huit espèces de *Crotalaria* (*C. comosa*, *C. glaucoïdes*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. perrottetii*, *C. podocarpa* et *C. retusa*) poussant au Sénégal (Afrique de l'Ouest). L'étude de la nodulation et de la fixation d'azote sur neuf espèces de *Crotalaria* a montré qu'il existait deux groupes de spécificité bien distincts dans le genre *Crotalaria*. Le groupe I est nodulé uniquement par des souches à croissance rapide très spécifiques, alors que le groupe II non spécifique est nodulé par des souches à croissance lente ainsi que par des *Bradyrhizobium* typiques isolés d'autres légumineuses tropicales. La comparaison des profils protéiques par SDS-PAGE montre que les souches à croissance lente se regroupent avec les *Bradyrhizobium*, alors que les souches à croissance rapide constituent un groupe homogène différent des autres rhizobia connus. Une analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADNr 16S (« amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA ») de 10 souches représentant ce groupe ne donne qu'un seul type de profil par enzyme, confirmant sa forte homogénéité. Le séquençage de l'ADNr 16S a révélé que ce groupe appartient au genre *Methylobacterium* constituant ainsi une nouvelle branche de bactéries nodulantes.

**Mots clés :** *Crotalaria*, *Methylobacterium*, rhizobium, symbiose.

**Abstract:** We studied a collection of 126 rhizobial isolates from eight species of *Crotalaria* (*C. comosa*, *C. glaucoïdes*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. perrottetii*, *C. podocarpa*, and *C. retusa*) growing in Senegal. Nodulation and nitrogen-fixation tests on nine *Crotalaria* species revealed two specificity groups within the genus *Crotalaria*. Group I consists of plants solely nodulated by very specific fast-growing strains. Group II plants are nodulated by slow-growing strains similar to promiscuous *Bradyrhizobium* spp. strains already reported to nodulate many tropical legumes. SDS-PAGE studies showed that slow-growing strains grouped with *Bradyrhizobium* while fast-growing strains constituted a homogeneous group distinct from all known rhizobia. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) of 10 representative strains of this group using four restriction enzymes showed a single pattern for each enzyme confirming the high homogeneity of group I. The 16S rDNA sequence analysis revealed that this specific group belonged to the genus *Methylobacterium*, thus constituting a new branch of nodulating bacteria.

**Key words:** *Crotalaria*, *Methylobacterium*, rhizobium, symbiosis.



010025925

Fonds Documentaire IRD

Cote : 6\*25925 Ex : 1

## Introduction

Dans les zones tropicales, les légumineuses spontanées jouent un rôle important dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols, mais elles restent cependant insuffisamment exploitées. Parmi elles, on compte les plantes du genre *Crotalaria* (Papilionoideae, Crotalariaeae) qui constituent le plus vaste genre de légumineuses en Afrique avec plus de 500 espèces réparties dans diverses zones climati-

ques, allant des zones semi-désertiques aux forêts tropicales humides (Polhill 1982). Les *Crotalaria* sont présentes en Afrique de l'Ouest notamment au Sénégal où 33 espèces ont été répertoriées (Berhaut 1976). Les *Crotalaria* sont des herbacées pérennes ou annuelles, parfois des arbustes dont plusieurs espèces sont utilisées pour leur intérêt agronomique, pour leurs qualités fourragères et pour de nombreux autres usages. En effet grâce à leur potentiel fixateur d'azote, de nombreuses espèces de *Crotalaria* peuvent être utilisées

Reçu le 1 août 2000. Accepté le 7 décembre 2000. Publié sur le site WEB des Presses du CNRC le 28 mai 2001.

A. Sy, É. Giraud, P. de Lajudie et B. Dreyfus<sup>1</sup>. Unité mixte de recherche 113, Institute de recherche pour le développement, Institut national de la recherche agronomique, Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier, Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Baillarguet, 34398 Montpellier CEDEX 5, France.

R. Samba. Laboratoire de microbiologie des sols, Institute de recherche pour le développement, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Institute sénégalaise de recherches agricoles, Bel-Air, B. P. 1386, Dakar, Sénégal.

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

<sup>1</sup>Auteur correspondant (courriel : Bernard.Dreyfus@mpl.ird.fr).

comme engrais vert ou comme plantes de couverture (Sandanam et al. 1976; Mwambazi et al. 1998; Becker et Johnson 1999; Fisher et al. 1999). Les propriétés nématicides de certaines espèces constituent également un usage agronomique important des *Crotalaria*. En effet, des espèces comme *C. pallida*, *C. juncea*, *C. retusa* et *C. spectabilis* permettent de réduire considérablement les populations de nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne*, *Pratylenchus* ou *Rotylenchulus* (Silva et al. 1989a, 1989b; Sundararaj et Mehta 1990). Les *Crotalaria* peuvent également être utilisées comme fourrage, mais de nombreuses espèces sont toxiques pour le bétail, leur ingestion conduisant à une maladie appelée le crotalisme (Watt et Breyer-Brandwijk 1962; Polhill 1982). Cette toxicité est liée à la présence d'alcaloïdes de type pyrrolizidine.

Si les *Crotalaria* ont surtout été étudiées pour leur intérêt agronomique et leurs propriétés toxiques, très peu d'études ont porté sur leurs partenaires symbiotiques, et on considèrerait jusqu'à présent que les *Crotalaria* étaient toutes nodulées par des rhizobiums non spécifiques (Wilson 1939; Burton 1952) et qu'elles appartenaient donc au vaste groupe des légumineuses tropicales de type « cowpea ».

Dans ce travail, nous avons étudié les propriétés symbiotiques (fixation de l'azote et spécificité d'hôtes) d'une collection de souches de différentes espèces de *Crotalaria* poussant au Sénégal. La position taxonomique de toutes les souches a été définie par une approche phénotypique (SDS-PAGE) et génotypique (« amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA » séquençage de l'ADNr 16S), et nous avons ainsi montré pour la première fois l'existence d'une nouvelle branche de bactéries symbiotiques nodulant les légumineuses et appartenant au genre *Methylobacterium*.

## Matériel et méthodes

### Milieux et conditions de culture

Les souches de rhizobia ont été cultivées sur milieu YMA (de Lajudie et al. 1994) et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans le même milieu contenant 20 % v/v de glycérol.

### Isolement des souches

Les souches ont été isolées directement à partir de nodules frais de *Crotalaria* récoltés sur le terrain ou obtenus in vitro par piégeage sur de jeunes plants de *Crotalaria* (*C. comosa*, *C. glaucoïdes*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. perrottetii*, *C. podocarpa* et *C. retusa*) inoculées avec des broyats de nodules secs préalablement désinfectés de ces mêmes espèces. Les nodules frais ont été stérilisés avec du chlorure mercurique ( $\text{HgCl}_2$ ) à 0,1 % pendant 5 min puis rincés plusieurs fois (six à huit fois) avec de l'eau distillée stérile. Ils ont ensuite été écrasés dans une goutte d'eau stérile, étalés sur boîtes de Pétri contenant du milieu YMA et incubés à  $30^{\circ}\text{C}$ . Après plusieurs repiquages successifs, nous nous sommes assurés de la pureté des différents isolats et nous avons testé à nouveau leur aptitude à former des nodules sur la plante d'origine avant la mise en collection.

### Tests de nodulation

Les graines des différentes espèces à tester ont été désinfectées et scarifiées à l'acide sulfurique concentré. Le temps de traitement des graines dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  est : *C. comosa*, 15 min; *C. glaucoïdes*, 20 min; *C. goreensis*, 40 min; *C. hyssopifolia*, 10 min; *C. lathyroides*, 10 min; *C. perrottetii*, 30 min; *C. podocarpa*, 35 min; *C. ochroleuca*, 25 min; et *C. retusa*, 35 min. Les graines ont ensuite été

abondamment rincées à l'eau stérile, imbibées pendant une nuit dans de l'eau stérile, puis mises à germer sur de la gélose molle à  $30^{\circ}\text{C}$  à l'obscurité pendant 1 à 2 jours. Les plantules ont ensuite été transférées dans des tubes contenant du milieu nutritif Jensen (Vincent 1970) en gélose inclinée. L'inoculation des plantes a été faite 48 h après la mise en tube avec 1 mL de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. Les plantes ont été cultivées en lumière continue ( $20 \text{ W/m}^2$ ), à  $28^{\circ}\text{C}$ .

### Fixation d'azote

Le potentiel fixateur d'azote a été estimé par des observations visuelles (vigueur et couleur de la plante) et par la mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) selon la méthode de Hardy et al. (1973) effectuée sur des plantes âgées de 6 semaines.

### Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodecyl sulphate

Les souches bactériennes ont été cultivées à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 48 h pour les souches à croissance rapide, et 72 h pour les souches à croissance lente, dans des fioles de Roux contenant du milieu TY dont la composition est en g/L : tryptone (Oxoid, Hampshire, England), 5; yeast extract (Oxoid), 0,75;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,454;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2,388;  $\text{CaCl}_2$ , 1; agar (Lab M, Bury, England), 20; pH 6,8–7). L'extraction des protéines totales et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ont été réalisées suivant la technique de Laemmli (1970) modifiée par de Lajudie et al. (1994). Les profils protéiques ont été analysés par le logiciel Gel-Compar 4.2 (Vauterin et Vauterin 1992). Le pourcentage de similarité est exprimé par le coefficient de Pearson converti en pourcentage (Pot et al. 1994).

### Analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction et séquençage de l'ADNr 16S

Les amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de l'ADNr 16S sont présentées dans le tableau 1. L'ADNr 16S a été amplifié en utilisant les amorces universelles FGPS6 et FGPS1509 (Normand et al. 1992) à l'aide d'un thermocycler Perkin-Elmer, modèle 2400 en conditions standard, à une température d'hybridation de  $60^{\circ}\text{C}$ . Le produit d'amplification de l'ADNr 16S a été digéré par les enzymes de restriction, *Sau96I*, *HinfI*, *MspI* et *HaeIII*. Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose horizontal (Métaphore, FMC Bioproducts, Hellerup, Denmark) et les produits ont été analysés visuellement.

Les réactions de séquence ont été réalisées avec le kit de séquençage ABI Prism BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, Calif. U.S.A.) et analysées par un séquenceur Applied Biosystem, modèle A310. L'alignement des séquences a été fait en utilisant le programme PILEUP (Devereux et al. 1984) et les arbres phylogénétiques ont été construits par la méthode Neighbor-Joining (Saitou et Nei 1987).

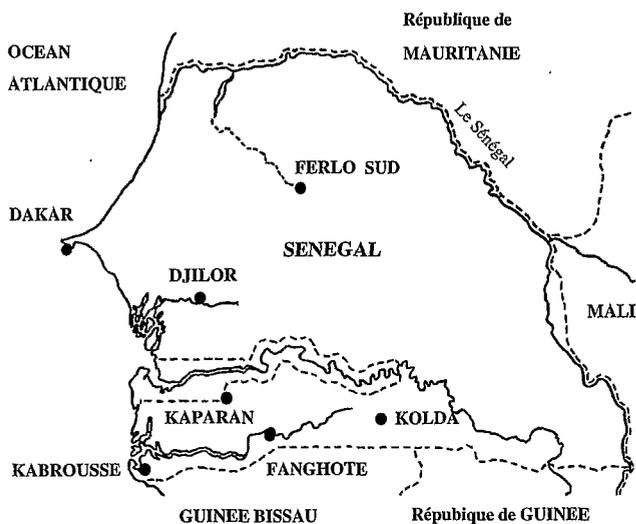
## Résultats et discussions

### Spécificité de nodulation des rhizobiums de *Crotalaria*

Une collection de 126 souches de rhizobiums de *Crotalaria* a été constituée. Ces souches de rhizobiums ont été isolées à partir de huit espèces de *Crotalaria* (*C. comosa*, *C. glaucoïdes*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. perrottetii*, *C. podocarpa* et *C. retusa*) poussant dans huit sites géographiques différents du Sénégal (fig. 1). En prenant pour critère leur vitesse de croissance sur le milieu de culture YMA, nous avons pu dans un premier temps répartir les souches en deux groupes distincts. Un premier groupe de 81 souches à croissance rapide, dont les colonies apparaissent après 48 h de culture, et un second groupe de 45 souches à

**Tableau 1.** Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de l'ADNr 16S.

Noms	Séquences	Références
FGPS6	5'-GGA-GAG-TTA-GAT-CTT-GGC-TCA-G-3'	Normand et al. 1992
FGPS1509	5'-AAG-GAG-GGG-ATC-CAG-CCG-CA-3'	Normand et al. 1992
16S-370f	5'-CCT-GGG-GAG-TAC-GGT-CGC-AAG-3'	Ce travail
16S-1080r	5'-GGG-ACT-TAA-CCC-AAC-ATC-T-3'	Ce travail
16S-870f	5'-CCT-GGG-GAG-TAC-GGT-CGC-AAG-3'	Ce travail
16S-1924r	5'-GGC-ACG-AAG-TTA-GCC-GGG-GC-3'	Ce travail

**Fig. 1.** Localisation des différents sites de prélèvement des nodules de *Crotalaria*.

croissance lente pour lesquelles les colonies n'apparaissent qu'au bout de 72 h de culture.

Les souches ont ensuite été testées pour leur capacité à former des nodules sur les racines des neuf espèces de *Crotalaria* (*C. comosa*, *C. glaucoides*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca*, *C. perrottetii*, *C. podocarpa* et *C. retusa*) et la fixation d'azote des nodules formés a été estimée par la mesure de l'ARA. On a observé la répartition des souches de *Crotalaria* en deux groupes de spécificité de nodulation différents correspondant aux deux groupes précédemment observés pour la vitesse de croissance (tableau 2). Le groupe I comprend les souches à croissance rapide qui nodulent et fixent l'azote exclusivement avec les trois espèces *C. podocarpa*, *C. perrottetii* et *C. glaucoides*. Le groupe II, qui comprend toutes les souches à croissance lente, nodule efficacement les six autres espèces *C. comosa*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca* et *C. retusa*. Alors que les souches à croissance rapide ne nodulent spécifiquement que les trois espèces de *Crotalaria* testées, les souches à croissance lente, nodulent non seulement les six espèces de *Crotalaria* testées mais aussi d'autres légumineuses tropicales comme *Macroptilium atropurpureum* ou *Acacia albida* qui appartiennent au groupe « cowpea » à large spectre d'hôtes. Ces souches à croissance lente non spécifiques présentent donc un spectre d'hôtes typique des *Bradyrhizobium*. Aucune des souches appartenant aux deux groupes de *Crotalaria* ne nodulent *Acacia radiana* et *Sesbania rostrata*, deux espèces spécifiquement nodulées par des souches appartenant respectivement aux

genres *Mesorhizobium* et *Sinorhizobium* pour l'*Acacia* et *Azorhizobium* et *Sinorhizobium* pour le *Sesbania* (Dreyfus et al. 1988; de Lajudie et al. 1994, 1998a).

#### Analyse de profils protéiques sur gel de polyacrylamide

Les profils protéiques exploitables de 116 souches de *Crotalaria* ont été numérisés et analysés en même temps que ceux de 45 souches de référence représentant les différentes espèces de rhizobiums existant ainsi que les représentants des groupes de *Bradyrhizobium* sp. décrits par Moreira et al. (1993, 1998) et Dupuy et al. (1994). Le dendrogramme de la figure 2 montre la répartition des groupes électrophorétiques. Les souches à croissance lente se regroupent avec *Bradyrhizobium japonicum* (LMG 6138) ainsi que plusieurs souches de *Bradyrhizobium* sp. confirmant ainsi leur appartenance au genre *Bradyrhizobium*. Les souches à croissance rapide forment par contre un groupe à part, très éloigné des autres espèces des genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium* et *Mesorhizobium*. La nette distinction entre ce groupe de souches et les autres espèces de rhizobiums semble indiquer que les souches spécifiques de *Crotalaria* constituent au moins une nouvelle espèce de rhizobium. En effet de nombreuses études antérieures ont montré que cette méthode est fiable pour regrouper les souches à croissance rapide au niveau de l'espèce. Plusieurs espèces comme *Sinorhizobium saheli* et *S. teranga* (de Lajudie et al. 1994); *S. kostiense* et *S. arboris* (Nick et al. 1999) ainsi que *Allorhizobium unidicola* (de Lajudie et al. 1998b) ont tous d'abord été reconnues par SDS-PAGE puis confirmées par les techniques de la taxonomie polyphasique.

#### Analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADNr 16S et analyse phylogénétique

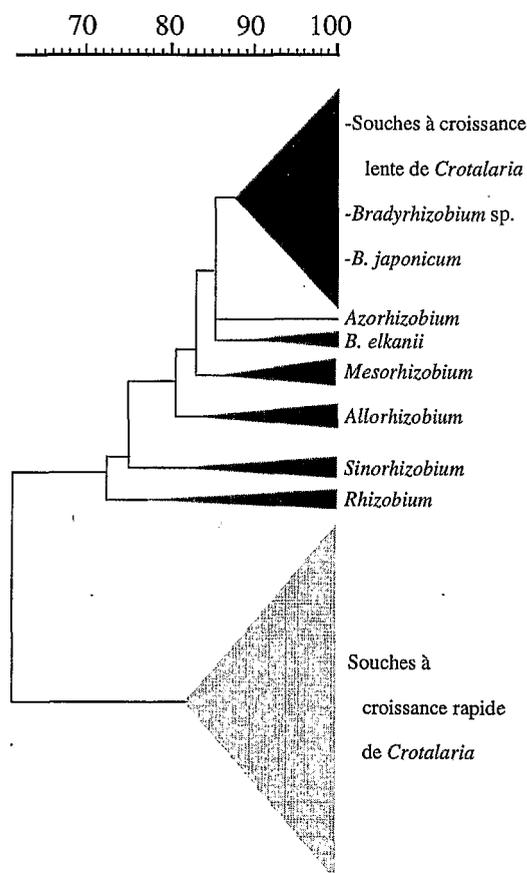
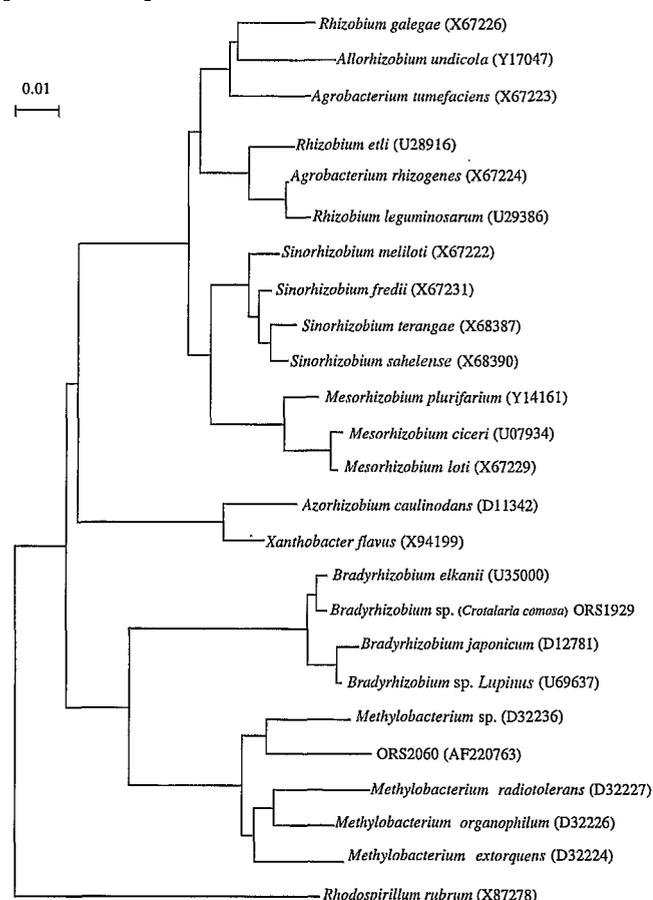
Pour définir le statut taxonomique de ce nouveau groupe de rhizobiums que constituent les souches à croissance rapide de crotalaires, nous avons étudié le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADNr 16S (ARDRA) de 10 souches représentatives, isolées de plantes et de localités différentes. La digestion des produits d'amplification de 1500 pb de l'ADNr 16S avec quatre enzymes de restriction *Sau96I*, *HinfI*, *MspI* et *HaeIII* donne des profils identiques pour toutes les souches. Aucun polymorphisme des fragments de restriction n'a pu être mis en évidence montrant ainsi l'homogénéité génétique de ce groupe.

Le séquençage de l'ADNr 16S de deux souches, ORS 1924 isolée de *C. perrottetii* et ORS 2060 isolée de *C. podocarpa*, donne deux séquences identiques (numéros d'accession dans Genbank : AF220762 et AF220763) confirmant l'homogénéité du groupe. L'analyse phylogénétique des séquences révèle que ce groupe de souches est distinct

**Tableau 2.** Spécificité de nodulation et de fixation d'azote chez les espèces de *Crotalaria*.

Espèces	Souches à croissance rapide				Souches à croissance lente			
	2060	1917	1924	1937	1816	1929	1935	1810
<i>C. podocarpa</i>	E	E	E	E	0	0	0	0
<i>C. glaucoides</i>	E	E	E	E	0	0	0	0
<i>C. perrottetii</i>	E	E	E	E	0	0	0	0
<i>C. hyssopifolia</i>	0	0	I	I	e	E	E	E
<i>C. lathyroides</i>	I	I	I	I	E	E	E	E
<i>C. ochroleuca</i>	0	0	0	I	E	E	e	E
<i>C. retusa</i>	0	I	I	0	E	E	e	E
<i>C. comosa</i>	0	0	0	0	E	e	E	e
<i>C. goreensis</i>	0	0	0	0	e	e	e	e
<i>Acacia albida</i>	0	0	0	0	e	E	E	E

Nota : Les numéros des souches correspondent à ceux de la collection ORS. 0, pas de nodules; I, nodules ineffectifs ou  $<100 \text{ nmol C}_2\text{H}_4\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{plante}^{-1}$ ; e, nodules effectifs ou 100 à  $500 \text{ nmol C}_2\text{H}_4\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{plante}^{-1}$ ; E, nodules très effectifs ou  $>500 \text{ nmol C}_2\text{H}_4\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{plante}^{-1}$ .

**Fig. 2.** Dendrogramme basé sur la valeur du coefficient de similarité  $r$ , construit après analyse numérique des profils protéiques des souches isolées de *Crotalaria* et des souches de référence.**Fig. 3.** Arbre phylogénétique des rhizobias basé sur la comparaison des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, obtenu par la méthode Neighbor-Joining, les nombres entre parenthèses représentent les numéros d'accèsion dans Genbank.

des principales branches phylogénétiques renfermant les différentes espèces de rhizobiums. À notre grande surprise, ces souches appartiennent au genre *Methylobacterium*, constituant ainsi une nouvelle branche phylogénétique de rhizobiums (fig. 3). Les pourcentages de similarité de cette séquence avec celles des différentes espèces de *Methylobacterium* varient entre 93,6 % avec *M. radiotolerans* et 94,2 % avec *M. extorquens*. Ces valeurs sont comparables à celles

trouvées entre les différentes espèces de *Methylobacterium* confirmant ainsi l'appartenance des souches spécifiques de *Crotalaria* au genre *Methylobacterium*. Les *Methylobacterium* sont des bactéries méthylophiles, Gram négatif, aérobies et qui peuvent utiliser les composés monocarbonés comme seule source de carbone et d'énergie (Whittenbury et Dalton 1981; Anthony 1991). Elles oxydent le méthanol en

formaldéhyde par l'intermédiaire d'une enzyme, la méthanol deshydrogénase (MDH), qui appartient à la famille des quinoprotéines (Anthony 1986; Anthony et al. 1994). Nous avons pu vérifier que la souche ORS 2060 possède également la capacité à pousser sur méthanol et d'autres substrats monocarbonés (données non publiées).

### Conclusion

Jusqu'à présent les *Crotalaria* étaient considérées comme des légumineuses non spécifiques, qui forment une association symbiotique avec les *Bradyrhizobium* du groupe « cowpea » (Wilson 1939, 1944). Nos résultats montrent que certaines espèces de *Crotalaria* ont une forte spécificité de nodulation, et ne forment pas de symbiose avec les *Bradyrhizobium*. Ces espèces, représentées par *C. glaucoïdes*, *C. perrottetii* et *C. podocarpa* s'associent efficacement avec un groupe très homogène de souches qui appartiennent à une nouvelle branche phylogénétique des  $\alpha$ -protéobactéries. La mise en évidence d'une nouvelle branche phylogénétique constituée par les bactéries du genre *Methylobacterium* confirme et élargit le statut polyphylétique des rhizobiums (Young et Haukka 1996).

Les membres du genre *Methylobacterium* sont largement répartis dans la nature, partout où les composés à un carbone sont abondants. Ils vivent souvent en association avec les plantes, sur les surfaces foliaires et comme contaminants des cultures cellulaires (Corpe et Basile 1982; Holland et Polacco 1994; Holland 1997). Bien que la présence de nitrogénase ait été mise en évidence chez certaines bactéries méthylotrophes, aucune espèce de *Methylobacterium* n'avait jusqu'à présent été décrite comme bactéries nodulantes et fixant l'azote en association symbiotique avec des légumineuses. Les souches spécifiques de *Crotalaria* constituent donc la première espèce de *Methylobacterium* symbiotique des légumineuses.

Les bactéries méthylotrophes sont connues pour leur capacité à métaboliser divers composés à groupements toxiques et par conséquent jouent un rôle important dans la dégradation des polluants tels que les hydrocarbures aux bords des grands axes routiers (Lidstrom et Stirling 1990). La découverte de la symbiose *Crotalaria*-*Methylobacterium* ouvre ainsi de nouvelles perspectives dans l'utilisation des *Crotalaria* à des fins écologiques.

Nous avons montré que la symbiose avec les légumineuses n'est pas restreinte aux trois branches phylogénétiques reconnues jusqu'à présent (Young et Haukka 1996) et que d'autres bactéries ont la capacité d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec les légumineuses. Les premiers rhizobiums ont été isolés il y a plus de 100 ans, mais seules les bactéries symbiotiques d'environ une centaine des 750 genres de légumineuses ont été jusqu'à présent caractérisées. Il est donc fort probable que la caractérisation progressive des symbiotes de la grande et diverse famille des légumineuses pourrait révéler une diversité jusque là insoupçonnée des bactéries capables de fixer l'azote dans les nodules des légumineuses.

### Bibliographie

Anthony, C. 1986. Bacterial oxidation of methane and methanol. *Adv. Microbiol. Physiol.* **27** : 113-210.

- Anthony, C. 1991. Assimilation of carbon in methylotrophs. *Dans* *Biology of methylotrophs*. Éditeurs : I. Goldberg et J.S. Rokem. Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass. pp. 79-109.
- Anthony, C., Ghosh, M., et Blake, C.C.F. 1994. The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrroloquinoline quinone. *Biochem. J.* **304** : 665-674.
- Becker, M., et Johnson, D.E. 1999. The role of legume fallows in intensified upland rice-based systems of West Africa. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* **53** : 71-81.
- Berhaut, J. 1976. Flore illustrée du Sénégal. Dicotylédones. Tome V. Légumineuses, Papilionacées. Claireafrique, Dakar, Sénégal.
- Burton, J.C. 1952. Host specificities among certain plants in the cowpea cross-inoculation group. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **16** : 356-358.
- Corpe, W.A., et Basile, D.V. 1982. Methanol utilizing bacteria associated with green plants. *Dev. Ind. Microbiol.* **23** : 483-493.
- De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M.T., Dreyfus, B., Kersters, K., et Gillis, M. 1994. Polyphasic taxonomy of Rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov. *Sinorhizobium sahelii* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44** : 715-733.
- De Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., Torck, U., Neyra, M., Collins, M.T., Lindstrom, K., Dreyfus, B., et Gillis, M. 1998a. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48** : 369-382.
- De Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M.D., Kersters, K., Dreyfus, B., et Gillis, M. 1998b. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48** : 1277-1290.
- Devereux, J., Haeberli, P., et Smithies, O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12** : 387-395.
- Dreyfus, B., Garcia, J.L., et 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., Kersters, K., Collins, M.D., et Gillis, M. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44** : 461-473.
- Fisher, M., Wortmann, C.S., et Feil, B. 1999. *Crotalaria* (*C. ochroleuca* G. Don) as a green manure in maize-bean cropping systems in Uganda. *Field Crops Res.* **61** : 97-107.
- Hardy, B.W.R., Burn, B.C., et Holsten, B.D. 1973. Application of acetylene-ethylene assay for measurement of  $N_2$  fixation. *Soil Biol. Biochem.* **5** : 47-81.
- Holland, M.A. 1997. *Methylobacterium* and plants. *Recent Res. Dev. Plant Physiol.* **1** : 207-213.
- Holland, M.A., et Polacco, J.C. 1994. PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45** : 197-209.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227** : 680-685.
- Lidstrom, M.E., et Stirling, D.I. 1990. Methylotrophs: genetics and commercial applications. *Annu. Rev. Microbiol.* **44** : 27-58.
- Moreira, F.M.S., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K., et Franco, A.A. 1993. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacry-

- lamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst. Appl. Microbiol.* **16** : 135–146.
- Moreira, F.M.S., Haukka, K., et Young, J.P.W. 1998. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Mol. Ecol.* **7** : 889–895.
- Mwambazi, T.N., Mwakalombe, B., Aune, J.B., et Berland, T.A. 1998. Turnover of green manure and effect on bean yield in Northern Zambia. *Adv. Geocol.* **31** : 1247–1254.
- Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B.D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M., et Lindstrom, 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.
- Normand, P., Cournoyer, B., Simonet, P., et Nazaret, S. 1992. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene (Amsterdam)*, **111** : 119–124.
- Polhill, R.M. 1982. *Crotalaria* in Africa and Madagascar. *Dans* Royal Botanic Gardens, Kew. A.A. Balkema, Rotterdam.
- Pot, B., Vandamme, P., et Kersters, K. 1994. Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprints. *Dans* Chemical methods in prokaryotic systematics. *Éditeurs* : M. Goodfellow et T. O'Donnell. John Wiley & Sons, Chichester, R.U.
- Saitou, N., et Nei, M. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4** : 484–486.
- Sandanam, S., Jayasooriya, S.G., et Somaratne, A. 1976. Effect of soil reconditioning on organic matter and nutrient status of tea soils and yield of planted tea. *J. Plant. Crops*, **4** : 60–67.
- Silva, G.S.D., Ferraz, S., et Santos, J.M.D. 1989a. Resistance of *Crotalaria* species to *Pratylenchus brachyurus* and *P. zaei*. *Nematol. Bras.* **13** : 81–86.
- Silva, G.S.D., Ferraz, S., et Santos, J.M.D. 1989b. Attraction, penetration and development of *Meloidogyne javanica* larvae in *Crotalaria* roots. *Nematol. Bras.* **13** : 151–163.
- Sundararaj, P., et Mehta, U.K. 1990. Host status of some economic crops to *Pratylenchus zaei* and their influence on subsequent sugarcane crops. *Indian J. Nematol.* **20** : 165–169.
- Vauterin, L., et Vauterin, P. 1992. Computer aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* **1** : 37–41.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme Handbook no. 15. Blackwell Scientific Publication, Ltd., Oxford.
- Watt, J.M., et Breyer-Brandwijk, M.G. 1962. The medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa. 2<sup>e</sup> éd. Livingstone, Édinbourg, Écosse.
- Whittenbury, R., et Dalton, H. 1981. The methylotrophic bacteria. *Dans* The prokaryotes. *Éditeurs* : M.P. Starr, H. Stolph, H.G. Trüper, A. Balows et H.G. Schlegel. Springer-Verlag KG, Berlin. pp. 894–902.
- Wilson, J.K. 1939. Leguminous plants and their associated organisms. Cornell University Agriculture Experimental Station Memoir 221.
- Wilson, J.K. 1944. The nodulating performance of three species of legumes. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **9** : 95–97.
- Young, J.P.W., et Haukka, K.E. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* **133** : 87–94.