

# Diversité génétique et fixation biologique de l'azote chez les acacias

**Mamadou GUEYE,**  
Microbiologiste

**Ibrahima NDOYE,**  
Microbiologiste

## Introduction

Fondamentalement, tous les arbres jouent les mêmes rôles dans la gestion conservatoire des sols : prévention de la désertification, atténuation de l'érosion et durabilité de la fertilité des sols. La spécificité des arbres fixateurs d'azote réside dans le fait qu'ils sont capables de se développer dans des sols pauvres, dont ils améliorent la fertilité par un transfert d'azote aux cultures (généralement céréales) associées. Cette contribution dépend en grande partie de la quantité d'azote fixé par voie symbiotique. Or, de nombreuses données, accumulées ces dernières années, montrent une grande diversité chez les arbres, particulièrement chez *Acacia*, dans leur aptitude à fixer l'azote (Sanginga *et al.*, 1990; Ndoye *et al.*, 1995; Gueye *et al.*, 1997).

L'objectif de cette communication est de montrer, par des exemples précis, la variabilité intra- et interspécifique, chez *Acacia*, de la fixation biologique de l'azote.

## ■ Nodulation des acacias

La formation des nodules est la première étape de la fixation biologique de l'azote chez les légumineuses. La plupart des espèces d'*Acacia* forment des nodules avec les rhizobiums du groupe cowpea (Date, 1977). Cependant, Dreyfus et Dommergues (1981) ont décrit une diversité dans l'affinité des acacias à former des nodules avec des rhizobiums à croissance lente ou rapide. Ils distinguent ainsi trois groupes d'espèces d'*Acacia* :

(i) les espèces dont la nodulation est induite par des souches de *Bradyrhizobium* à croissance lente (*Faidherbia albida* (syn. *Acacia albida*), *A. holosericea*, *A. melanoxyton*, *A. mearnsii*);

(ii) les espèces dont la nodulation est induite par des souches de *Rhizobium* à croissance rapide (*A. nilotica*, *A. constricta*, *A. rad-diana*, *A. senegal*);

(iii) les espèces qui peuvent être nodulées indifféremment par l'un ou l'autre type de rhizobium (*A. cyanophylla*, *A. seyal*, *A. tumida*). Très récemment, Gueye (1992) a montré que *F. albida* peut également être nodulé par des souches de *Bradyrhizobium* à croissance rapide.

Par ailleurs, une différence génétique très significative a été observée au Sénégal dans l'aptitude de *A. senegal* et *A. laeta*, deux espèces productrices de gomme, à former des nodules. En effet, inoculée avec la même souche de *Rhizobium*, la seconde espèce produit 50 % de biomasse nodulaire de plus que la première (Badji *et al.*, 1988).

## ■ Variabilité génétique dans la fixation biologique de l'azote chez les acacias

Des expériences en pots et quelques rares expériences au champ ont mis en évidence des différences génétiques très significatives entre

les espèces et à l'intérieur d'une même espèce d'arbres fixateurs d'azote. Les expériences en pot révèlent le potentiel fixateur d'azote tel qu'il a été défini par Dommergues (1987). Ainsi, chez les acacias, il est possible de distinguer ceux qui ont un potentiel fixateur élevé tel qu'*A. mangium* qui peut fixer 100 à 300 kg N.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup>) de ceux qui ont un potentiel faible comme *F. albida*, *A. senegal* ou *A. pellita* qui fixent moins de 20 kg N.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup>) (Langkamp *et al.*, 1979).

Cette différence génétique chez les acacias a été décrite par Schulze *et al.* (1991) dans les conditions arides de Namibie. Ces auteurs ont calculé, à partir de l'abondance isotopique naturelle en azote-15, que la proportion d'azote dérivé de la fixation (% Ndfa) représente 2 %, 49 % et 71 % de l'azote total pour respectivement *A. albida*, *A. hereorensis* et *A. melifera*.

La variabilité génétique dans l'aptitude des acacias à fixer l'azote a également été mise en évidence au Sénégal (Ndoye *et al.*, 1995; Gueye *et al.*, 1997). En effet, dans des expériences en pots, et en utilisant la méthode de dilution isotopique de l'azote-15 pour estimer le potentiel fixateur, ces auteurs ont remarqué que *F. albida*, *A. raddiana*, *A. senegal* et *A. seyal* ont des potentiels fixateurs d'azote différents. Les valeurs de % Ndfa d'*A. seyal* (63 %) et d'*A. raddiana* (62 %) sont deux fois plus élevées que celles d'*A. senegal* (34 %) et de *F. albida* (37 %). Les premiers peuvent être considérés comme des acacias à haut potentiel fixateur d'azote alors que les seconds doivent être rangés parmi ceux à faible potentiel.

La variabilité intraspécifique des acacias à fixer l'azote a été mise en évidence dans le cas de *F. albida* (Gueye *et al.*, 1997). En évaluant le potentiel fixateur d'azote de *F. albida*, ces auteurs ont remarqué des différences significatives entre sept provenances : Dem et Gomblora du Burkina Faso, Merina, Dangalma, Ndiogolor, Pire et Kabrousse du Sénégal. Bien que les masses nodulaires soient plus élevées chez les provenances de Merina et Dangalma (respectivement 460 et 420 mg.plante<sup>-1</sup>), ces provenances ne fixent pas d'azote. La provenance de Kabrousse, avec 290 mg de nodules par plante, a le potentiel fixateur le plus élevé (%Ndfa = 38,2) (tabl. 1). Ces résultats confirment ceux déjà rapportés par Sanginga *et al.* (1990) pour des provenances de *F. albida* originaires de 12 pays d'Afrique (tabl. 2).

Provenances de <i>F. albida</i>	Ndfa (%)	N <sub>2</sub> fixé (mg pl. <sup>-1</sup> )
Merina (S)	0,0	0,000
Dangalma (S)	0,0	0,000
Ndiongolor (S)	26,0	0,026
Pire (S)	25,5	0,024
Kabrousse (S)	38,2	0,440
Gombolora (BF)	13,1	0,100
Dem (BF)	19,2	0,160

■ Tableau 1

Fixation d'azote par sept provenances de *F. albida*.  
 Les plantes sont cultivées dans des pots contenant 20 kg  
 de sol non stérile (Gueye *et al.*, 1997). % Ndfa : proportion  
 de l'azote total provenant de la fixation. (S) : Sénégal ;  
 (BF) : Burkina Faso.

Provenances de <i>F. albida</i>	Ndfa (%)	N <sub>2</sub> fixé (mg pl. <sup>-1</sup> )
Afrique du Sud	21	5
Ethiopie	17	3
Burundi	16	3
Mali	14	3
Zimbabwe	6	5
Malawi	13	3
Sénégal	20	3
Burkina Faso	27	7
Zambia	21	7
Kenya	16	4
Niger	37	9
Cameroun	27	5

■ Tableau 2

Fixation d'azote par des provenances de *F. albida* originaires  
 de 12 pays africains. (Sanginga *et al.*, 1990).  
 Ndfa : proportion de l'azote total provenant de la fixation.

## Conclusion

La diversité des aptitudes des espèces et des provenances d'acacias à fixer l'azote traduit probablement l'existence d'une réserve de variabilité génétique. Cette réserve est susceptible d'être exploitée pour faciliter la restauration de la fertilité des sols. Les résultats décrits ci-dessus peuvent guider dans le choix des espèces (par exemple *A. seyal*) ou des provenances (par exemple la provenance Kabrousse de *F. albida*) les plus fixatrices.

## Bibliographie

- BADJI (S.), DUCOUSSO (M.), GUEYE (M.), et COLONNA (J. P.), 1988 - Fixation biologique de l'azote et possibilité de nodulation croisée chez les deux acacias producteurs de gomme dure : *Acacia senegal* L. Willd et *Acacia laeta* R. Br. C. R. Acad. Sci. Paris, (série III) 307 (11) : 663-668.
- DOMMERGUES (Y. R.), 1987 - "The role of biological nitrogen fixation in agroforestry." In Stepler HA and Nair PKR (Eds) Agroforestry, a decade of development. (H. A.) HA Stepler, (P. K. R.) Nair eds Eds, ICRAF, Nairobi, 245-271.
- GUEYE (M.), 1992 - *Acacia albida* : nodulation by fast- and slow- growing rhizobia. In RJ Vandebeldt Ed, *Faidherbia albida* in the west african semi-arid tropics, RJ Vandebeldt Ed., ICRISAT and ICRAF, Niamey, 149-150.
- GUEYE (M.), NDOYE (I.), DIANDA (M.), DANSO (S. K. A.), and DREYFUS (B.), 1997 - Active N<sub>2</sub> fixation in several *Faidherbia albida* provenances. *Arid Soil Res. and Rehab.*, 11 : 63-70.
- LANGKAMP (P. J.), SWINDEN (L. B.), and DALLING (M.J.), 1979 - Nitrogen fixation (acetylene reduction) by *Acacia pellita* on areas restored after mining at groote Eylandt, Northern Territory. *Austr. J. Bot.*, 27 : 353-361.
- NDOYE (I.), GUEYE (M.), DANSO (S. K. A.), and DREYFUS (B.), 1995 - Nitrogen fixation in *Faidherbia albida*, *Acacia raddiana*, *Acacia senegal* and *Acacia seyal* estimated using the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. *Plant Soil*, 172 : 175-180.
- SANGINGA (N.), BOWEN (G. D.), and Danso (S. K. A.), 1990 - Assessment of genetic variability for N<sub>2</sub> fixation between and within provenances of *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* estimated by using <sup>15</sup>N labelling techniques. *Plant and Soil*, 127 : 169-178.
- SCHULZE (E. D.), GEBAUER (G.), ZIEGLER (H.), and LANGE (O. L.), 1991 - Estimates of nitrogen fixation by trees on an aridity gradient in Namibia. *Oecologia*, 88 : 451-459.



Organismes  
associés aux acacias

---

partie 6







# Acacia : nodulation et rhizobiums associés

**Philippe de LAJUDIE,**  
Taxonomie microbienne

**Nicolas DUPUY,**  
Microbiologiste

**Amadou NDIAYE,**  
Microbiologiste

**Marc NEYRA,**  
Microbiologiste

**Catherine BOIVIN,**  
Microbiologiste

**Moniek GILLIS,**  
Microbiologiste

**Bernard DREYFUS,**  
Microbiologiste

## Introduction

La symbiose légumineuse-rhizobium est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. Après les mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes, la bactérie induit chez la plante la formation d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique. L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires.

Les légumineuses constituent la troisième super-famille par ordre d'importance chez les angiospermes. Parmi les 17 à 19000 espèces de légumineuses décrites, seulement 2800 ont été examinées pour la nodulation racinaire. Cependant, la nodulation d'un nombre de plus en plus grand d'espèces est peu à peu découverte (Moreira *et al.*, 1992; Jeder *et al.*, 1996). Les légumineuses se répartissent en trois familles : les *Caesalpinioideae*, les *Fabaceae* et les *Mimosoideae*. Parmi les *Caesalpinioideae*, la nodulation est rare sauf dans la tribu des *Caesalpinieae* et le genre *Chamaecrista* (*Cassiae*). Toutes les

tribus des *Fabaceae* sont nodulées sauf les *Dipterygeae*. La nodulation est générale chez les *Mimosoideae*, à l'exception de quatre groupes de la tribu des *Mimoseae* et de quelques espèces d'*Acacia*.

Le genre *Acacia* comprend plus de 1200 espèces, dont 140 sont natives d'Afrique (Harrier *et al.*, 1995) : la plupart de celles-ci sont capables de former des nodules fixateurs d'azote, mais 17 espèces sont jusqu'à présent considérées comme incapables de noduler. Il est possible de distinguer ces dernières par analyse de 31 caractères morphologiques et aussi par des techniques moléculaires comme les RAPD\*. Il semble en outre que plusieurs de ces *Acacia* possèdent des gènes impliqués dans la nodulation mais qui ne s'expriment pas (Harrier *et al.*, 1995). Dupuy (1993), Lortet *et al.* (1996a, b), Ba (1996) et Boivin *et al.* (ce volume) ont étudié différents aspects de l'établissement de la symbiose chez les acacias sahéliens, en particulier l'organogénèse du nodule et l'identification des signaux symbiotiques.

Cette présentation est une revue bibliographique sur la diversité des rhizobiums associés aux acacias, et développe plus en détail les études menées au Sénégal.

## Effet de la nodulation des acacias sur la croissance

Les informations concernant l'effet de la nodulation sur la croissance de l'arbre sont peu nombreuses et peu généralisables. La quantification de l'effet de la nodulation se heurte à un problème méthodologique. De plus, le facteur rhizobium n'est souvent pas maîtrisé, en particulier par faute d'une caractérisation suffisante des souches. Cependant, il est communément reconnu que l'inoculation des acacias avec des souches efficaces a un effet positif sur la croissance des arbres au cours des stades jeunes (plantes en tubes ou en pépinières), et sur le taux de survie des jeunes plants après transplantation. Cet effet est pourtant très controversé après la pre-

\* Voir liste des abréviations en fin d'article.

mière année sur le terrain. La variabilité génétique intraspécifique de la plante semble être très importante en ce qui concerne le potentiel fixateur d'azote : les différences constatées entre individus sont d'un facteur 2 à 3 dans le cas de *Faidherbia albida* (Sanginga *et al.*, 1990). NDoye *et al.* (1995) ont pu, par des méthodes isotopiques, quantifier l'azote fixé par les *Acacia* et montrer, qu'excepté *A. seyal*, les acacias comme *A. raddiana*, *A. senegal* ou *Faidherbia albida* (syn. *Acacia albida*) présentent un faible potentiel fixateur d'azote.

Turk et Keyser (1992) ont étudié la spécificité des rhizobiums pour la nodulation et la fixation d'azote chez les arbres, dont plusieurs espèces d'*Acacia*. D'autres essais concernant des *Acacias* d'Australie ont été réalisés par le Cirad-forêt en Côte d'Ivoire, au Bénin et dans les îles Cook (Prin *et al.*, 1993). Sutherland *et al.* (1995) ont par ailleurs rapporté des essais d'inoculation de divers *Acacia* au Kenya. Plusieurs essais d'inoculation en milieu paysan ont été effectués au Sénégal par le MIRCEN.

Les études portant sur la quantification des effets de la nodulation sur la croissance et les essais d'inoculation se sont heurtés le plus souvent au manque de données sur les microsymbiontes. Les souches de rhizobium utilisées sont souvent mal caractérisées, et l'inoculum mal contrôlé dans son devenir, faute de moyens d'identification fiable. Ce sont là certaines des raisons pour lesquelles plusieurs équipes dans le monde se sont intéressées ces dernières années à la caractérisation et à la taxonomie des rhizobiums.

## ■ Taxonomie et diversité des rhizobiums d'acacia

La taxonomie des *Rhizobiaceae* a connu de profonds remaniements au cours des dix dernières années, du fait de l'abandon du spectre d'hôte comme important critère pris en compte pour la définition des espèces et de l'adoption des critères généralement retenus pour la classification bactérienne (Vandamme *et al.*, 1996). L'étude des

gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S a démontré la proximité phylogénétique entre les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* d'une part, et entre *Bradyrhizobium*, *Rhodospseudomonas* et *Nitrobacter* d'autre part (Jarvis *et al.*, 1986; Willems et Collins, 1992; Willems et Collins, 1993; Yanagi et Yamasato, 1993; Sawada *et al.*, 1993; de Lajudie *et al.*, 1994; Van Berkum *et al.*, 1996). Ces relations phylogénétiques ont été confirmées par d'autres techniques de taxonomie complémentaires, permettant de caractériser les bactéries à différents niveaux de la cellule (taxonomie dite "polyphasique"), ce qui a permis d'aboutir à une classification plus précise (Young et Haukka, 1996). Puisque certaines branches d'*Agrobacterium* se trouvent mêlées avec des *Rhizobium*, on obtient une classification nouvelle dans les genres *Agrobacterium* et *Rhizobium* pour laquelle une nomenclature s'impose. Ainsi, on dénombre actuellement quatre genres parmi les bactéries symbiotiques des légumineuses, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, et une vingtaine d'espèces (tabl. 1); un cinquième genre est reconnu, pour lequel le nom de *Mesorhizobium* a été proposé (Lindström *et al.*, 1995; Jarvis *et al.*, 1997).

Il est maintenant établi qu'une même plante peut être nodulée par des symbiontes taxonomiquement différents (de Lajudie *et al.*, 1994; Nour *et al.*, 1994; Nour *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1995; Van Berkum *et al.*, 1996; Boivin *et al.*, 1997). C'est le cas par exemple de *Leucaena*, *Phaseolus*, *Glycine*, *Sesbania*, *Acacia*, *Cicer*, *Medicago* etc. (tabl. 1).

Les premiers isollements de rhizobiums sur des arbres ont été effectués il y a plus d'un siècle, mais ce sont Allen et Allen (1936; 1939) qui ont rapporté les premiers travaux majeurs. Ils isolent une grande collection de souches, toutes à croissance lente, à partir de 72 espèces d'arbres et arbustes à Hawaï, et les classent dans des groupes d'inoculation croisée sur la base de leur infectivité (capacité à induire la formation de nodules) et de leur effectivité (capacité à fixer l'azote atmosphérique). Ainsi, jusqu'en 1964, on pensait que les arbres n'étaient nodulés que par des rhizobiums à croissance lente (Graham et Parker, 1964); plus tard, Trinick *et al.* (1965; 1968; 1980) montrent cependant que des souches à croissance rapide sont capables de noduler certains arbres appartenant aux genres *Leucaena*, *Mimosa*, *Acacia* et *Sesbania*. Dreyfus et Dommergues (1981) montrent ensuite que les espèces d'*Acacia* se répartissent en trois groupes selon

Genres	Espèces	Plantes hôtes	Références
<b>Rhizobium</b> (Jordan, 1984)	<i>R. leguminosarum</i>		Jordan, 1984
	biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens</i>	Jordan, 1984
	biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>	Jordan 1984
	biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Jordan 1984
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i>	Lindström <i>et al.</i> , 1989
	<i>R. tropici</i>	<i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
	<i>R. elti</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Segovia <i>et al.</i> , 1992
	<i>R. hainanensis</i>	Plus. esp. de regions arides	Chen <i>et al.</i> , 1994
<b>(Meso) rhizobium</b> (croissance rapide)	[ <i>R.</i> ] <i>loti</i>	<i>Lotus</i>	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
	[ <i>R.</i> ] <i>huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus, Acacia</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991
	[ <i>R.</i> ] <i>ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994
	[ <i>R.</i> ] <i>tianshanense</i>	13 espèces tropicales.	Chen <i>et al.</i> , 1995
	[ <i>R.</i> ] <i>mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995
	Cluster U (a, b, c)	<i>Acacia, Prosopis</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	[ <i>R.</i> ] genosp. 3 & 4	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995
<b>Sinorhizobium</b> (de Lajudie <i>et al.</i> , 1994)	<i>S. melloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>	Jordan, 1984 ; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	<i>S. fredii</i>	<i>Glycine max</i>	Chen <i>et al.</i> , 1988 ; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i> sp.	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	<i>S. teranga</i>	<i>Sesbania, Acacia</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i>	Rome <i>et al.</i> , 1996
	<i>S. sp.</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> , en préparation
<b>Azorhizobium</b> (Dreyfus <i>et al.</i> , 1988)	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
	<i>A. sp.</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Rinaudo <i>et al.</i> , 1991
<b>Bradyrhizobium</b> (Jordan, 1982)	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, G. soja</i>	Jordan, 1982
	<i>B. sp.</i>	<i>Vigna, Lupinus, Mimosa</i>	Jordan, 1982
		<i>Acacia</i>	Dupuy <i>et al.</i> , 1984
		<i>Aeschynomene</i>	Alazard, 1985 ; Young, 1991
		<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>B. liaoningensis</i>	<i>Glycine max, G. soja</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995

I Tableau 1

Classification des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote de la famille des *Rhizobiaceae*.

qu'elles sont nodulées par *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ou indifféremment par les deux espèces. A l'intérieur de ces 3 groupes, la spécificité de nodulation est variable selon les souches.

Depuis, plusieurs études, dans différentes régions du monde, ont été consacrées à l'inventaire des arbres capables de noduler (en particulier en ce qui concerne le genre *Acacia*) et à la caractérisation de la diversité naturelle des microsymbiotes associés. Au Brésil, Magalhaes *et al.* (1986), de Faria *et al.* (1984; 1987), Moreira *et al.* (1992; 1993) ont inventorié les légumineuses nodulées de la forêt amazonienne, et Moreira *et al.* (1993) ont mis en évidence la grande diversité des rhizobiums associés à ces plantes (une vingtaine de groupes différents). Les isolats de nodules d'*Acacia* sont retrouvés principalement dans le grand groupe des *Bradyrhizobium*.

Zhang *et al.* (1991) ont étudié 60 isolats de nodules d'*A. senegal* et de *Prosopis juliflora* du Soudan et ont montré qu'ils se répartissent en 12 groupes sur la base de l'analyse de 115 caractères phénotypiques. Ces souches sont caractérisées par une température maximum de croissance élevée (38-44 °C) et une grande résistance au sel (3 %). L'analyse de ces souches par des techniques moléculaires a confirmé ces résultats phénotypiques, justifiant la création d'au moins deux nouvelles espèces de *Sinorhizobium* (Zhang *et al.*, 1992; Zahran *et al.*, 1994; Lindström et Zahran, 1993; Haukka *et al.*, 1994; Nick *et al.*, 1995; Nick *et al.*, 1996).

En Chine, l'analyse taxonomique de 63 isolats correspondant à 21 espèces de légumineuses d'une région tropicale, dont certaines espèces d'*Acacia*, montre également une grande diversité avec 3 groupes de *Bradyrhizobium* et 3 groupes de souches à croissance rapide (Gao *et al.*, 1994).

Au Maghreb (Maroc, Tunisie, Lybie), les isolats d'*Acacia* forment plusieurs groupes de rhizobiums proches de *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et de *Mesorhizobium* (Khbaya *et al.*, 1995).

Des collaborations se sont établies entre les équipes qui travaillent sur la diversité des souches d'*Acacia*, notamment en Afrique, pour essayer de relier taxonomiquement les divers nouveaux groupes de rhizobiums identifiés indépendamment.

Au Sénégal, une grande diversité de souches a été mise en évidence parmi les rhizobiums d'*Acacia* et de nombreux groupes taxono-

miques ont été identifiés. Une approche polyphasique a été utilisée pour caractériser et étudier les relations taxonomiques de nouveaux isolats (à croissance rapide) d'*Acacia* et de *Sesbania* au Sénégal (de Lajudie *et al.*, 1994). Deux méthodes fines (au niveau de l'espèce) ont d'abord été employées simultanément, la technique SDS-PAGE pour analyser les protéines cellulaires totales et le système miniaturisé API 50 (BioMérieux) qui permet de tester l'utilisation de 147 composés organiques comme seule source de carbone. Les deux approches faisaient apparaître le même groupage des souches, et plusieurs caractères discriminants permettaient de distinguer les trois groupes entre eux et aussi des autres espèces de rhizobiums. Le premier groupe (T) rassemble 10 souches d'*Acacia* et 13 souches de *Sesbania*; le second groupe (S) comprend 5 souches de *Sesbania*; le troisième groupe (U) est constitué de 24 souches d'*Acacia*. Les hybridations ADN : ARN et le séquençage de l'ADNr 16S ont été employées pour déterminer les relations phylogénétiques, et les hybridations ADN : ADN ont permis d'établir le statut d'espèces de ces groupes. Les résultats des différentes techniques employées dans cette approche de taxonomie polyphasique étaient parfaitement en accord pour conclure que les deux groupes T et S représentaient 2 nouvelles espèces, phénotypiquement distinctes, pour lesquelles nous avons proposé les noms de *teranga* et *saheli*. Un autre résultat de cette étude polyphasique a été de proposer une première étape dans la révision des genres *Agrobacterium* et *Rhizobium*, déjà préconisée par plusieurs auteurs, qui consiste à renommer cette branche. La règle de priorité prévalant en matière de nomenclature, le nom de *Sinorhizobium* a été retenu, le genre a été révisé, et *Rhizobium meliloti* a été reclassé comme *Sinorhizobium meliloti*.

Par contre, le troisième groupe (U), formé exclusivement d'isolats d'*Acacia*, montrait une hétérogénéité génétique considérable par hybridation ADN : ADN, et aucun niveau d'hybridation significatif avec son plus proche voisin phylogénétique *R. loti*. L'analyse d'une quinzaine de souches par rep-PCR confirme cette hétérogénéité. Par contre, les résultats obtenus sur une vingtaine de souches du groupe U par la technique ARDRA montrent la grande homogénéité phylogénétique de ces souches, confirmée par la séquence de l'ADN 16S trouvée identique chez 4 représentants du groupe.

En conclusion, ces souches pourraient donc être distinguées par phénotypie, SDS-PAGE, hybridations ADN : ADN, rep-PCR, mais

présentent une même séquence d'ARN 16S. En outre, des résultats préliminaires de séquençage 23S suggèrent d'importantes différences à ce niveau (Neyra, en préparation). Ces résultats suggèrent en théorie (Vandamme *et al.*, 1996) de proposer la création de trois nouvelles espèces pour classer les souches du groupe U ; cependant, considérant le fait que les souches du groupe U restent néanmoins très proches par les différentes techniques, possèdent la même séquence d'ARN 16S et présentent parfois des valeurs d'hybridation ADN : ADN à la limite du significatif, nous ne proposerons probablement qu'une seule espèce.

## Localisation des rhizobiums dans le sol et nodulation des acacias dans la nature

D'une façon générale, il est difficile d'observer la nodulation des arbres dans la nature. Les nodules sont souvent très petits (quelques millimètres), parfois difficiles à distinguer d'une racine, et il est fréquemment délicat d'apporter la preuve qu'une racine nodulée trouvée dans le sol à proximité d'un arbre appartient de fait à cet arbre. Par ailleurs, les nodules sont parfois absents, comme dans les forêts en équilibre où l'azote n'est généralement pas le premier facteur limitant (de Faria *et al.*, 1984). Une situation analogue pourrait exister dans la région du Ferlo au Sénégal où, dans une zone précise comprise entre 14 et 22 m de profondeur, le sol présente des fortes teneurs en nitrate allant jusqu'à 180 mg.l<sup>-1</sup> (Deans *et al.*, 1994). Dans cette zone, aucune population de rhizobiums n'a pu être décelée. En outre, l'humidité du sol semble être un facteur important pour la nodulation et la fixation d'azote chez les *Acacia* (Danso *et al.* 1992 ; Rouspard, ce volume). Dupuy (1993) a pu mettre en évidence des centaines de petits nodules roses sur *Faidherbia albida* au cours de la saison sèche dans un sol humide de rizière en Casamance (Sénégal), alors qu'il n'a jamais pu trouver de nodule sur des racines de *F. albida* en zone sèche quelle que soit la saison.



Par ailleurs, Dione et Neyra (non publié) ont pu déterrer des arbres avec leurs racines, et mettre en évidence de nombreux petits nodules (0,5-2 mm) sur les racines secondaires d'*A. raddiana* et d'*A. senegal* au cours de la saison d'hivernage dans la région du Ferlo (zone sèche). Ces nodules étaient rouges à l'intérieur et présentaient une forte activité réductrice d'acétylène (ARA). Cette difficulté de trouver des nodules d'arbres dans la nature oblige à trouver un biais pour isoler des rhizobiums : la plupart des souches d'arbres sont isolées au laboratoire par piégeage sur une plante-hôte cultivée en tube en présence d'échantillons de sols prélevés dans la nature, généralement sous l'arbre d'intérêt.

A partir d'échantillons de sols prélevés en surface ou à divers niveaux de profondeur (jusqu'à 34 m) dans différentes régions et écotypes du Sénégal, Dupuy *et al.* (1991 ; 1994) ont isolé 84 souches à croissance lente capables de noduler *Faidherbia albida* (syn. *Acacia albida*). L'analyse des protéines totales de ces souches comparées aux souches de référence par électrophorèse (SDS-PAGE) montre que la plupart (90 %) des souches de *Faidherbia albida* se répartissent dans 6 groupes dont 3 contiennent des souches de *Bradyrhizobium* de référence (*B. japonicum*, *B. elkanii*, *Bradyrhizobium* sp.) et 3 ne sont constitués que d'isolats de *Faidherbia albida* du Sénégal.

Le séquençage de l'ADN codant pour l'ARN 16S de représentants de 5 de ces groupes confirme leur appartenance à la branche ARN de *Bradyrhizobium-Rhodopseudomonas*, et montre que 4 des nouveaux groupes constituent une branche séparée aussi distante de *B. japonicum* que des genres *Afipia*, *Blastobacter* et *Rhodopseudomonas* (Dupuy *et al.*, 1994). Il n'existe pas de relation entre groupement électrophorétique et profondeur ; par contre, il existe une relation entre groupement électrophorétique et origine géographique (Dupuy et Dreyfus, 1992).

Neyra *et al.* (1996) ont également mis en évidence des souches à croissance rapide en profondeur (jusqu'à 32 m) capables d'induire la nodulation sur *A. tortilis* et *A. senegal*. NDiaye (1996) n'a trouvé aucune relation entre le groupement électrophorétique de 60 souches d'*A. tortilis* par SDS-PAGE et leur origine géographique.

NDiaye (1996) a par ailleurs étudié la diversité d'une collection de 62 isolats de nodules d'*Acacia tortilis raddiana* de diverses provenances du Nord Sénégal et de Tunisie, incluant quatre souches

d'origine de la Mauritanie et du Burundi. Toutes ces souches sont des rhizobiums à croissance rapide. Leur analyse par la technique SDS-PAGE fait apparaître une grande hétérogénéité de profils. Les résultats montrent que vingt et une des souches étudiées se regroupent avec *S. teranga*, *S. fredii*, *R. tropici*, *M. huakuii* et *M. plurifarrium*, suggérant que ces souches appartiennent à ces espèces. Les quarante et une autres souches sont séparées des espèces décrites et forment plusieurs groupes nouveaux ; il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques complémentaires pour préciser leur place taxonomique. Aucune relation n'a pu être établie entre l'origine géographique et écologique et le groupe électrophorétique. Les souches tunisiennes, mauritaniennes et sénégalaises se groupent en mélange dans *S. teranga* et dans deux des nouveaux groupes. Des souches provenant de zones salées (Diama) sont groupées avec des souches d'autres provenances. A l'intérieur du "groupe U" (de Lajudie *et al.*, 1994) sont retrouvées des souches de diverses profondeurs (0-15 cm, 50-100 cm, 31-32 m), suggérant l'identité des populations de rhizobium en surface et en profondeur, de façon analogue à ce qui avait été montré dans le cas de *Bradyrhizobium* par Dupuy *et al.* (1994).

## Conclusion

Une grande diversité des rhizobiums a été mise en évidence ces dernières années sur les 5 continents. Les études récentes émanent pour un grand nombre des pays en développement, où il semble que persiste encore une grande diversité, comme en Amérique latine (Martinez-Romero *et al.*, 1991), au Mexique (Segovia *et al.*, 1993), en Chine (Chen *et al.*, 1988 ; 1991), sur le pourtour du bassin méditerranéen (Nour *et al.*, 1994 ; 1995 ; Rome *et al.*, 1996), en Afrique (Soudan, Sénégal, Maroc, Tunisie, Lybie, Afrique du Sud), et dans la région correspondant à l'ancienne URSS. Il reste certainement encore beaucoup à découvrir puisque seule une vingtaine d'espèces de rhizobiums sont jusqu'à présent nommées pour quelque 19000 légumineuses répertoriées. En particulier en ce qui

concerne les acacias, de nombreux nouveaux groupes de rhizobiums ont été identifiés par différentes équipes dans le monde, pour lesquels un travail de caractérisation polyphasique est nécessaire pour aboutir à une révision dans la taxonomie. D'ores et déjà, il est établi que les acacias peuvent être nodulés par trois espèces de *Sinorhizobium*, *S. teranga* bv. *acaciae* (de Lajudie *et al.*, 1994) et deux espèces non encore nommées (Nick *et al.*, en préparation), une espèce de *Mesorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1994), *M. huakuii* (Chen *et al.*, 1991), plusieurs groupes de *Bradyrhizobium* (Dupuy *et al.*, 1994; Ndiaye, 1996) et de nombreux groupes encore insuffisamment caractérisés.

## Abréviations

SDS-PAGE : Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulphate.

API : Appareils et Procédés d'Identification.

ARDRA : Amplified rDNA restriction analysis.

rep-PCR : Polymerase Chain Reaction utilisant les amorces rep.

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA.

## Bibliographie

ALLEN (O. N.), ALLEN (E. K.), 1936 - Root nodule bacteria of some leguminous plants : I Cross-inoculation studies with *Vigna sinensis* L. *Soil Sci.*, 42 : 61-77.

ALLEN (O. N.), ALLEN (E. K.), 1939 - Root nodule bacteria of some tropical leguminous plants : II Cross-inoculation tests within the cowpea group. *Soil Sci.*, 47 : 63-76.

BA (S.), 1996 - *L'analyse chromatographique des facteurs nod comme nouvel outil de*

*classification symbiotique des rhizobia; application à Sinorhizobium saheli, Rhizobium sp. et Bradyrhizobium sp. isolés d'acacias.* Diplôme d'études approfondies. Université Cheikh Anta Diop Dakar Sénégal, 56 p.

BOIVIN (C.), NDOYE (I.), MOLOUBA (F.), de LAJUDIE (P.), DUPUY (N.), DREYFUS (B. L.), 1997 - Stem nodulation in legumes : diversity, mechanisms, and unusual characteristics. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16: 1-30.

- CHEN (W. X.),  
YAN (G. H.), 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.), LI (J. L.), 1991 -  
*Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated  
from the root nodules of *Astragalus*  
*sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*,  
41 : 275-280.
- DANSO (S. K. A.),  
BOWEN (G. D.), SANGINGA (N.), 1992 -  
Biological nitrogen fixation in trees  
in agrosystems. *Plant Soil*,  
141 : 177-196.
- DEANS (J. D.),  
LINDLEY (D. K.), MUNRO (R. C.), 1994 -  
*Deep Beneath the Trees in Senegal*.  
Annual Report of the Institute of  
Terrestrial Ecology. NERC, U.K. :  
11-13.
- DE FARIA (S. M.), FRANCO (A. A.),  
DE JESUS (R. M.), MENANDRO (M. S.),  
BAITELLO (J. B.), MUCCI (E. S. F.),  
DÖBEREINER (J.), SPRENT (J. I.), 1984 -  
New nodulating legume trees from  
South-East Brazil. *New Phytol.*,  
98 : 317-328.
- DE FARIA (S. M.), LIMA (H. C.),  
FRANCO (A. A.), DE JESUS (R. M.),  
MUCCI (E. S. F.), SPRENT (J. I.), 1987 -  
Nodulation of legume trees from  
SE Brazil. *Plant Soil*, 99 : 347-356.
- DE LAJUDIE (P.), SY (A.),  
NDOYE (I.), SYLLA (S.), NDIAYE (A.),  
JEDER H, YATTARA (I.), NEYRA (M.),  
DREYFUS (B.), LINDSTROM (K.),  
GILLIS (M.), 1995 -  
"Characterization by comparative  
SDS-PAGE protein profiles of  
300 rhizobia isolated from nodules  
of 40 tropical *Leguminosae* species  
of arid regions of Africa."  
10th International Congress  
on Nitrogen Fixation, St Petersburg-  
Pushkin, Russia, May 28-June 3,  
1995.
- DE LAJUDIE (P.), WILLEMS (A.),  
NICK (G.), DETREZ (C.), NEYRA (M.),  
COLLINS (M. D.), DREYFUS (B.),  
LINDSTRÖM (K.), KERSTERS (K.),  
GILLIS (M.), 1996 -  
"A New species among tropical tree  
rhizobia." 2nd European Nitrogen  
Fixation Conference and NATO  
Advanced Research Workshop  
on Biological Fixation of Nitrogen  
for Ecology and Sustainable  
Agriculture Poznan, Poland,  
September 8-13, 1996.
- DE LAJUDIE (P.), WILLEMS (A.),  
POT (B.), DEWETTINCK (D.),  
MAESTROJUAN (G.), NEYRA (M.),  
COLLINS (M. D.), DREYFUS (B.),  
KERSTERS (K.), GILLIS (M.), 1994 -  
Polyphasic Taxonomy of Rhizobia :  
Emendation of the Genus  
*Sinorhizobium* and description  
of *Sinorhizobium melliloti* comb. nov.,  
*Sinorhizobium saheli* sp. nov.,  
*Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J.*  
*Syst. Bacteriol.*, 44 (4) : 715-733.
- DREYFUS (B. L.),  
DOMMERGUES (Y.), 1981 -  
Nodulation of *Acacia* species by fast-  
and slow-growing tropical strains of  
*Rhizobium*. *Appl. Environ Microbiol.*,  
41 : 97-99.
- DREYFUS (B.),  
GARCIA (J. L.), GILLIS (M.), 1988 -  
Characterization of *Azorhizobium*  
*caulinodans* gen. nov., sp. nov.,  
a stem-nodulating nitrogen-fixing  
bacterium isolated from *Sesbania*  
*rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*,  
38 : 89-98.
- DUPUY (N.), DREYFUS (B. L.), 1992 -  
*Bradyrhizobium* populations occur  
in deep soil under the leguminous  
tree *Acacia albida*. *Appl. Environ.*  
*Microbiol.*, 58 : 2415-2419.
- DUPUY (N.), 1993 -  
*Contribution à l'étude de la symbiose*  
*fixatrice d'azote entre Acacia albida*

- et Bradyrhizobium* sp. Thèse de doctorat, Université Lille Flandres Artois.
- DUPUY (N.), WILLEMS (A.), POT (B.), DEWETTINCK (D.), VENBRUAENÉ (I.), MAESTROJUAN (G.), DREYFUS (B. L.), KERSTERS (K.), COLLINS (M. D.), GILLIS (M.), 1994 - Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 : 461-473.
- DUPUY (N.), DETREZ (C.), NEYRA (M.), DE LAJUDIE (P.), DREYFUS (B. L.), 1991 - Les *Acacias* fixateurs d'azote du Sahel. *La Recherche*, 223 : 802-804.
- 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.*, 44 : 151-158.
- GRAHAM (P. H.), PARKER (C. A.), 1964 - Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant Soil*, 20 : 383-396.
- HARRIER (L. A.), WHITTY (P. W.), SUTHERLAND (J. M.), SPRENT (J. I.), 1995 - "A comparison of nodulating and non-nodulating african species of *Acacia* using morphological and molecular markers." In Nitrogen Fixation : Fundamentals and Applications. (I. A.) Tikhonovitch, (N. A.) Provorov, (V. I.) Romanov, (W. E.) Newton édés. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/Boston/London, p 483 .
- HAUKKA (K.), LINDSTRÖM (K.), 1994 - Pulse-field gel electrophoresis for genotypic comparison of *Rhizobium* bacteria that nodulate leguminous trees. *FEMS Microbiol. Lett.*, 119 : 215-220.
- JARVIS (B. D. W.), GILLIS (M.), DE LEY (J.), 1986 - Intra- and intergeneric similarities between the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36 : 129-138.
- JARVIS (B. D. W.), PANKHURST (C. E.), PATEL (J. J.), 1982 - *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32 : 378-380.
- JARVIS (B. D. W.), VAN BERKUM (P.), CHEN (W. X.), NOUR (S. M.), FERNANDEZ (M. P.), CLEYET-MAREL (J. C.), GILLIS (M.), 1997 - Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium hualini*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesarhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47 : 895-898
- JEDER (H.), DE LAJUDIE (P.), DREYFUS (B.), LE FLOC'H (E.), BEHAEGHE (T.), ZAAFOURI (M. S.), AKRIMI (N.), 1996 - Etude de la nodulation des légumineuses autochtones des régions arides de Tunisie. *Revue des Régions Arides*, 9 : 3-10.
- 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 - "*Rhizobiaceae* Conn 1938, 321AL." In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1st éd. (N. R.) Krieg, (J. G.) Holt édés. The Williams & Wilkins Co, Baltimore : 234-256.
- KHBAYA (B.), NEYRA (M.), FILALI-MALTOUF (A.), 1995 - « Etude de la diversité génétique d'une population naturelle de

- Rhizobium nodulant des Acacia du Maroc par analyse PCR/RFLP. » Deuxième Colloque National sur les Plantes Forestières. ENFI, Salé, Maroc.
- KUYKENDALL (L. D.), SAXENA (B.), DEVINE (T. E.), UDELL (S. E.), 1992 - Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 38 : 501-505.
- LINDSTRÖM (K.), 1989 - *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39 : 365-367.
- LINDSTRÖM (K.), VAN BERKUM (P.), GILLIS (M.), MARTINEZ (E.), NOVIKOVA (N.), JARVIS (B.), 1995 - "Report from the roundtable on *Rhizobium* taxonomy." In Nitrogen Fixation : Fundamentals and Applications. (I. A.) Tikhonovich, (N. A.) Provorov, (V. I.) Romanov, (W. E.) Newton éds. Kluwer Academic Publishers : 807-810.
- LINDSTRÖM (K.), ZAHKAN (H. H.), 1993 - Lipopolysaccharide patterns in SDS-PAGE of rhizobia that nodulate leguminous trees. *FEMS Microbiol. Lett.*, 107 : 327-330.
- LORTET (G.), MEAR (N.), LORQUIN (J.), DREYFUS (B.), DE LAJUDIE (P.), ROSENBERG (C.), BOVIN (C.), 1996a - "Host specificity characterization by Nod factor TLC profiling : application to rhizobia strains isolated from *Acacia* and *Sesbania*." 8th International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions Knoxville (USA), July 14-19, 1996.
- LORTET (G.), MEAR (N.), LORQUIN (J.), DREYFUS (B.), DE LAJUDIE (P.), ROSENBERG (C.), BOVIN (C.), 1996b - Nod factor thin-layer chromatography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains : application to *Sinorhizobium saheli*, *S. teranga* and *Rhizobium* sp strains isolated from *Acacia* and *Sesbania*. *MPMI*, 9 : 736-747.
- MAGALHAES (F. M. M.), 1986 - "Present state of knowledge on biological nitrogen fixation in Amazonia." In Proceedings of the 1st symposium on the humid tropics, Vol 1, Climate Soil, EMBRAPA/CPATU, Belem : 499-512.
- MARTINEZ-ROMERO (E.), SEGOVIA (L.), MERCANTE (F. M.), FRANCO (A. A.), GRAHAM (P.), PARDO (M. A.), 1991 - *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L beans and *Leucaena* sp trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41 : 417-426.
- MOREIRA (F. M. S.), SILVA (M. F.), FARIA (S. M.), 1992 - Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. *New Phytol.* 121 : 563-570.
- MOREIRA (F.), GILLIS (M.), POT (B.), KERSTERS (K.), FRANCO (A. A.), 1993 - Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical *Leguminosae* by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst. Appl. Microbiol.*, 16 : 135-146.
- NDIAYE (A.), 1996 - *Diversité et fixation d'azote des rhizobiums d'Acacia*. Mémoire de DEA, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal, 43 p.
- NDOYE (I.), GUEYE (M.), DANSO (S. K. A.), DREYFUS (B.), 1995 - Nitrogen fixation in *Faidherbia albida*, *Acacia raddiana*, *Acacia senegal* *Acacia seyal* estimated using the 15N isotope dilution technique. *Plant Soil*, 172 : 175-180.
- NEYRA (M.), DE LAJUDIE (P.), BOVIN (C.), DUPUY (N.), GILLIS (M.), DREYFUS (B. L.), 1996 - Characterization of rhizobia nodulating tropical leguminous trees. Proceedings of the National Seminar on the root microbiology of tropical

- nitrogen fixing trees in relation to nitrogen and phosphorus nutrition. (C. T.) Wheeler, (R.) Narayanan, (K. T.) Parthiban, (A.) Kesavan, (C.) Surendran édés. Coimbatore, déc. 6-9, 1994 : 26-35.
- NICK (G.), EARDLY (B. D.), GILLIS (M.), HAUKKA (K.), JARVIS (B. D. W.), JUSSILA (M. M.), DE LAJUDIE (P.), NIEMI (M.), PAULIN (L.), TIGHE (S. W.), YOUNG (J. P. W.), LINDSTRÖM (K.), 1996 - "Two new *Sinorhizobium* species described by a polyphasic approach." International Union of Microbiological Societies Congresses 96 8th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division Jerusalem, Israel, August : 18-23.
- NICK (G.), JARVIS (B. D. W.), TIGHE (S. W.), NIEMI (M.), DE LAJUDIE (P.), LINDSTRÖM (K.), 1995 - "Taxonomy of rhizobia isolated from the root nodules of leguminous trees in the Sudan." *In* Nitrogen Fixation : Fundamentals and Applications. (I. A.) Tikhonovich, (N. A.) Provorov, (V. I.) Romanov, (W. E.) Newton édés. Kluwer Academic Publishers, 715 p.
- NICK (G.), RÄSÄNEN (L. A.), DE LAJUDIE (P.), GILLIS (M.), LINDSTRÖM (K.), 1996 - "Screening biodiversity of rhizobia and *Agrobacterium*-like strains." 2 nd European Nitrogen Fixation Conference NATO Advanced Research Workshop on Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture, Poznan (Poland), September 8-13, 1996.
- NOUR (S. M.), CLEYET-MAREL (J. C.), NORMAND (P.), FERNANDEZ (M. P.), 1995 - Genomic heterogeneity of strains nodulating Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45 : 640-648.
- NOUR (S. M.), FERNANDEZ (M. P.), NORMAND (P.), CLEYET-MAREL (J. C.), 1994 - *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate Chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 : 511-522.
- PRIN (Y.), GALIANA (A.), DUCOUSSO (M.), DUPUY (N.), DE LAJUDIE (P.), NEYRA (M.), 1993 - Les rhizobiums d'Acacias. *Bois et Forêts des Tropiques*, 238 : 5-20.
- RINAUDO (G.), ORENGA (S.), FERNANDEZ (M.), MEUGNIER (H.), BARDIN (R.), 1991 - DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem- and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41 : 114-120.
- ROBERTSON (B. K.), DREYFUS (B. L.), ALEXANDER (M.), 1995 - Ecology of stem-nodulating *Rhizobium* and *Azorhizobium* in four vegetation zones of Senegal. *Microb. Ecol.*, 29 : 71-81.
- ROME (S.), FERNANDEZ (M. P.), BRUNEL (B.), NORMAND (P.), CLEYET-MAREL (J. C.), 1996 - *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46 : 972-980.
- SANGINGA (N.), BOWEN (G. D.), DANSO (S. K. A.), 1990 - Assessment of genetic variability for N<sub>2</sub> fixation between and within provenances of *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* estimated by using 15N labelling techniques. *Plant Soil*, 127 : 169-178.
- SAWADA (H.), IEKI (H.), OYAIJU (H.), MATSUMOTO (S.), 1993 - Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium*

*rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43 : 694-702.

SEGOVIA (L.), YOUNG (J. P. W.), MARTINEZ-ROMERO (E.), 1993 - Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43 : 374-377.

SUTHERLAND (J. M.), ODEE (D. W.), MCINROY (S. G.), KIMITI (J.), MACHUA (J.), MULUVI (G.), STANFORTH (A.), SPRENT (J. I.), 1995 - "Mixed inoculum development for african *Acacias*." In Nitrogen Fixation : Fundamentals Applications. (I. A.) Tikhonovitch, (N. A.) Provorov, (V. I.) Romanov, (W. E.) Newton édés. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/Boston/London, p. 738.

TRINICK (M. J.), 1965 - *Medicago sativa* nodulation with *Leucaena leucocephala* root-nodule bacteria. *Aust. J. Sci.*, 27 : 263-264.

TRINICK (M. J.), 1968 - Nodulation of tropical legumes. I Specificity in the *Rhizobium* symbiosis of *Leucaena leucocephala*. *Exp. Agric.*, 4 : 243-253.

TRINICK (M. J.), 1980 - Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp, *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bacteriol.*, 49 : 39-53.

TURK (D.), KEYSER (H. H.), 1992 - Rhizobia that nodulate tree legumes : specificity of the host for nodulation and effectiveness. *Can. J. Microbiol.*, 38 : 451-460.

VAN BERKUM (P.), BEYENE (D.), EARDLY (B. D.), 1996 - Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the

common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46 : 240-244.

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

WILLEMS (A.), COLLINS (M. D.), 1992 - Evidence for a close genealogical relationship between *Afpia* the causal organism of cat scratch disease, *Bradyrhizobium japonicum* and *Blastobacter denitrificans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 96 : 241-246.

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

XU (L. M.), GE (C.), CUI (Z.), LI (J.), FAN (H.), 1995 - *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45 : 706-711.

YANAGI (M.), YAMASATO (K.), 1993 - Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* 107 : 115-120.

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

ZAHARAN (H. H.), RÄSÄNEN (L. A.), KARSISTO (M.), LINDSTRÖM (K.), 1994 - Alteration of lipopolysaccharide protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic heat stress. *World J. Microbiol. Biotech.*, 10 : 100-105.

ZHANG (X.), HARPER (R.), KARSISTO (M.), LINDSTRÖM (K.), 1991 - Diversity of *Rhizobium* bacteria



isolated from root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41 : 104-113.

ZHANG (X.), KARSISTO (M.), LINDSTRÖM (K.), 1992 - Assessment of the competitiveness

of fast-growing rhizobia infecting *Acacia senegal* using antibiotic resistance and melanin production as an identification marker. *World J. Microbiol. Biotech.*, 8 : 199-205